

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **048004**

(13) **B1**

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

- (45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.10.21**
- (21) Номер заявки  
**201891134**
- (22) Дата подачи заявки  
**2016.11.11**
- (51) Int. Cl. *A61K 48/00* (2006.01)  
*A61P 21/00* (2006.01)  
*A61P 39/06* (2006.01)  
*C07K 14/435* (2006.01)

---

(54) **СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ**

---

- (31) **62/254,539; 62/419,793**
- (32) **2015.11.12; 2016.11.09**
- (33) **US**
- (43) **2018.11.30**
- (86) **PCT/US2016/061703**
- (87) **WO 2017/083776 2017.05.18**
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**РИСЕРЧ ИНСТИТЮТ ЭТ  
НЭШНУАЙД ЧИЛДРЕН'С  
ХОСПИТАЛ (US)**
- (72) Изобретатель:  
**Родио-Клапак Луиза (US)**
- (74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**
- (56) **US-A1-20110082192**  
**EP-A1-2859896**  
**US-A1-20100120627**  
**US-A1-20140323956**  
**US-A1-20150125429**

- 
- (57) Согласно изобретению предложены AAV-векторы, экспрессирующие ген ANO5, а также антиоксидантная терапия в качестве способов индукции регенерации мышц и способ лечения мышечной дистрофии.

**048004 B1**

**048004 B1**

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США №62/254539, поданной 12 ноября 2015 г., и предварительной заявке на патент США №62/419793, поданной 9 ноября 2016 г., которые полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки.

#### **Область техники**

В изобретении предложены векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV-векторы), экспрессирующие ген ANO5, а также антиоксидантная терапия в качестве способов индукции регенерации мышц и способ лечения мышечной дистрофии.

#### **Уровень техники**

Важность мышечной массы и мышечной силы для осуществления различных видов повседневной активности, таких как двигательная активность и дыхание, а также для обмена веществ во всем организме, не вызывает сомнений. Нарушения функции мышц вызывают мышечные дистрофии (МД), которые характеризуются слабостью и атрофией мышц и оказывают серьезное влияние на качество жизни. Наиболее подробно охарактеризованные МД вызваны мутациями в генах, кодирующих члены ассоциированного с дистрофином белкового комплекса (DAPC). Указанные МД вызваны непрочностью мембраны, связанной с утратой связывания (тетеринга) сарколеммы с цитоскелетом, которое обеспечивает DAPC. Напротив, МД другой подгруппы, как полагают, вызваны нарушениями процесса восстановления сарколеммы. Вследствие механического стресса, который возникает в сарколемме во время сокращения, даже здоровая мышца постоянно нуждается в механизмах восстановления, чтобы устранить разрывы поврежденной мембраны. Восстановление разрывов сарколеммы основано на слиянии мембранных везикул в участках повреждения, и ослабление этого процесса предположительно считается основной причиной дисферлинопатий, видов мышечной дистрофии, вызванных мутациями дисферлина.

Новый вид мышечной дистрофии, признаки которой сходны с таковыми при дисферлинопатиях, и которая характеризуется поражениями сарколеммы, был недавно связан с рецессивными мутациями в ANO5 (TMEM16E). Мутации ANO5 вызывают пояснично-тазовую мышечную дистрофию (мышечную дистрофию Лейдена) типа 2L (LGMD2L) и миопатическую дистрофию Миоши типа 3 (MMD3). Фенотип, связанный с мутациями ANO5, является изменчивым, однако заболевание обычно проявляется во взрослом возрасте (в возрасте от 20 до 50 лет) слабостью проксимальной группы мышц нижних конечностей, высоким уровнем креатинкиназы в сыворотке крови, асимметричной атрофией и слабостью мышц и обычно сопровождается поражениями сарколеммы, как и в случае дисферлинопатии (Bolduc et al., *American journal of human genetics* 86, 213-221 (2010)), Hicks et al., *Brain: a journal of neurology* 134, 171-182 (2011), Bouquet et al., *Revue neurologique* 168, 135-141 (2012)). В настоящее время ~72 различные мутации ANO5 были зарегистрированы у пациентов с МД, и скрининговые исследования для выявления мутаций ANO5 у пациентов с LGMD, у которых отсутствуют мутации в других известных генах LGMD, указывают на то, что мутации ANO5 могут быть одной из наиболее распространенных причин LGMD (Bolduc et al., *American journal of human genetics* 86, 213-221 (2010)), Hicks et al., *Brain: a journal of neurology* 134, 171-182 (2011), Penttila et al., *Neurology* 78, 897-903 (2012)).

Семейство анюктамин/TMEM16 было функционально разделено на две категории. Исходные члены семейства, ANO1 (TMEM16A) и ANO2 (TMEM16B), кодируют активируемые кальцием каналы, проницаемые для хлорида, в то время как другие ANO не способны проводить токи, обусловленные анионами хлора, и были выявлены благодаря их роли в перераспределении фосфолипидов (PLS). Однако было установлено, что ANO5 не демонстрирует ни один из двух указанных видов активности, что свидетельствует о его новой функции в скелетных мышцах. Учитывая новые данные, остается неясным, как потеря функции ANO5 индуцирует развитие фенотипа LGMD, и, в частности, почему клиническое проявление мутаций ANO5 сходно с таковым для МД, ассоциированных с дисферлином.

Аденоассоциированный вирус (AAV) представляет собой парвовирус, дефицитный по репликации, одноцепочечная геномная ДНК которого содержит примерно 4,7 т.п.н., включая инвертированный концевой повтор (ITR), состоящий из 145 нуклеотидов. Существует несколько серотипов AAV. Известны нуклеотидные последовательности геномов серотипов AAV. Например, нуклеотидная последовательность генома AAV серотипа 2 (AAV2) представлена в Srivastava et al., *J Virol*, 45: 555-564 (1983) и исправлена Ruffing et al., *J Gen Virol*, 75: 3385-3392 (1994). В качестве других примеров полный геном AAV-1 предоставлен 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 предоставлен в GenBank под номером доступа AF085716; полный геном AAV-6 представлен в GenBank под номером доступа NC\_001862; по меньшей мере части геномов AAV-7 и AAV-8 представлены в GenBank под номером доступа AX753246 и AX753249, соответственно (см. также патенты США №№7282199 и 7790449, относящиеся к AAV-8); геном AAV-9 представлен в Gao et al., *J. Virol.*, 78: 6381-6388 (2004); геном AAV-10 представлен в Mol. Ther., 13(1): 67-76 (2006); и геном AAV-11 предоставлен в *Virology*, 330(2):375-383 (2004). Последовательность генома AAV rh.74 представлена в настоящем документе. Цис-действующие последовательности, контролирующие репликацию вирусной ДНК (гер), инкапсидирование/упаковку и интеграцию в хромосому клетки-хозяина, содержатся в ITR. Три промотора AAV (называемые p5, p19 и p40 вследствие их относительных положений на карте генома) контролируют экспрессию двух внутренних открытых рамок считывания AAV, кодирующих

гены гер и сар. Два промотора гер (p5 и p19), совместно с дифференциальным сплайсингом одиночного интрона AAV (например, в нуклеотидах 2107 и 2227 AAV2), приводят к получению четырех белков гер (гер 78, гер 68, гер 52 и гер 40) в результате экспрессии гена гер. Белки гер обладают несколькими ферментативными свойствами, которые в конечном итоге отвечают за репликацию вирусного генома. Ген сар экспрессируется под контролем промотора p40 и кодирует три белка капсида VP1, VP2 и VP3. Альтернативный сплайсинг и неконсенсусные сайты начала трансляции обеспечивают выработку трех родственных белков капсида. Один консенсусный сайт полиаденилирования находится в положении 95 на карте генома AAV. Жизненный цикл и генетика AAV рассмотрены в Muzyczka, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158: 97-129 (1992).

AAV обладает уникальными особенностями, которые делают его предпочтительным в качестве вектора для доставки чужеродной ДНК в клетки, например, при генной терапии. Инфекция AAV клеток в культуре не является цитопатической, и инфекция человека и других животных в природе является скрытой и бессимптомной. Кроме того, AAV инфицирует многие клетки млекопитающих, что позволяет нацелено воздействовать на различные типы тканей в условиях *in vivo*. Помимо этого, AAV трансдуцирует медленно делящиеся и не делящиеся клетки и может по существу сохраняться в течение жизни этих клеток в качестве транскрипционно активной ядерной эписомы (внехромосомного элемента). Провирусный геном AAV является инфекционным в виде клонированной ДНК в плаزمиде, что позволяет конструировать рекомбинантные геномы. Кроме того, поскольку сигналы, контролирующие репликацию, инкапсидирование и интеграцию генома AAV, содержатся в ITR генома AAV, часть или вся внутренняя последовательность генома, содержащая приблизительно 4,3 т.п.н. (кодирующие контролирующие репликацию белки и структурные белки капсида, гер-сар), может быть заменена чужеродной ДНК, такой как генная кассета, содержащая промотор, представляющую интерес ДНК и сигнал полиаденилирования. Белки гер и сар могут быть обеспечены в транс-конфигурации. Еще одна важная особенность AAV заключается в том, что он является чрезвычайно стабильным и высококопийным вирусом. Он легко выдерживает условия, используемые для инактивации аденовируса (от 56°C до 65°C в течение нескольких часов), что уменьшает важность хранения AAV при низких температурах. AAV даже может быть лиофилизован.

Наконец, AAV-инфицированные клетки не резистентны к суперинфекции.

Результаты многочисленных исследований продемонстрировали долгосрочную (>1,5 года) экспрессию белка в мышцах, опосредованную рекомбинантным AAV. См. Clark et al., *Hum Gene Ther*, 8: 659-669 (1997); Kessler et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 14082-14087 (1996); и Xiao et al., *J Virol*, 70: 8098-8108 (1996). См. также Chao et al., *Mol Ther*, 2:619-623 (2000) и Chao et al., *Mol Ther*, 4:217-222 (2001). Более того, поскольку мышца сильно васкуляризована, трансдукция рекомбинантным AAV приводила к появлению трансгенных продуктов в системном кровотоке после внутримышечной инъекции, как описано в Herzog et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 5804-5809 (1997) и Murphy et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 13921-13926 (1997). Помимо этого в работе Lewis et al., *J Virol*, 76: 8769-8775 (2002) продемонстрировано, что скелетные мышечные волокна обладают необходимыми клеточными факторами для правильного гликозилирования, сворачивания (фолдинга) и секреции антител, это указывает на то, что мышца способна к устойчивой экспрессии секретируемых белковых терапевтических средств.

В настоящем документе показано, что повреждение гена *Ano5* у мышей вызывает развитие нескольких гистопатологических признаков дистрофии мышц, непереносимость физической нагрузки, дисфункцию восстановления сарколеммы и нарушение слияния миобластов. Помимо этого представленные данные демонстрируют, что указанные нарушения связаны с изменениями динамики субклеточной мембраны и/или мембраны и/или сарколеммальной мембраны, опосредованными ANO5. Настоящее изобретение относится к применению AAV-векторов, экспрессирующих ген *Ano5*, в способах индукции восстановления мышц и/или лечения МД.

### Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к AAV-векторам, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую белок ANO5 или его функционально активный фрагмент. Эксперименты, описанные в примерах 1-4, демонстрируют существенную роль *Ano5* в регенерации и восстановлении мышц. Потеря ANO5 вызывает развитие дистрофического фенотипа у мышей, напоминающего таковой у пациентов с LGMD2L, который характеризуется гистопатологией легкой степени тяжести, которая различается в зависимости от мышц, непереносимостью физической нагрузки, нарушенной регенерацией и повышенными уровнями креатинкиназы.

Патологические изменения митохондрий наблюдали у молодых и взрослых мышей *Ano5*<sup>-/-</sup>. Помимо структурного дефекта митохондрий, выявленного путем визуализации с помощью электронной микроскопии, количественные исследования цитратсинтазы также продемонстрировали, что митохондрии имеют функциональное нарушение. Количественный ферментный анализ цитратсинтазы указывает на присутствие поврежденных митохондрий. Полученные результаты свидетельствуют о том, что патологические изменения митохондрий могут быть вторичным эффектом, вызванным потерей белка аноктамина 5. Результаты экспериментов, описанных в настоящем документе, указывают на ослабление восстановления разрывов сарколеммы в мышечных волокнах *Ano5*<sup>-/-</sup>, которые восстанавливаются с помо-

шью вирусной экспрессии ANO5 человека, и свидетельствуют о том, что повреждение AnO5 нарушает способность первичных миобластов к слиянию.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к рекомбинантному AAV-вектору, содержащему полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты ANO5. Последовательность нуклеиновой кислоты ANO5 представлена в Genbank под номером доступа NM\_213599.2 (SEQ ID NO: 13). В качестве примера последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей белок ANO5, в векторе AAV представлена в последовательности SEQ ID NO: 1. Рекомбинантные векторы согласно настоящему изобретению содержат полинуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична нуклеиновой кислоте, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 13, или содержат нуклеотид, который гибридизуется в жестких условиях с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 13, или содержат фрагмент нуклеиновой кислоты, приведенной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 13, кодирующий белок, который проявляет активность ANO5.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения рекомбинантные AAV-векторы согласно настоящему изобретению представляют собой AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13 или AAV rh.74.

Рекомбинантные AAV-векторы согласно настоящему изобретению содержат фрагмент последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1, кодирующий белок, который содержит домен, участвующий в активности PLS, причем указанный белок сохраняет активность PLS. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения вектор AAV содержит фрагмент последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 13, кодирующий белок, который сохраняет активность ANO5.

Рекомбинантные AAV-векторы согласно настоящему изобретению содержат полинуклеотидную последовательность, которая, например, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% или 89%, более типично по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93% или 94% и даже более типично по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 13, причем указанный полинуклеотид кодирует белок, который сохраняет активность ANO5.

Рекомбинантные AAV-векторы согласно настоящему изобретению содержат полинуклеотидную последовательность, кодирующую белок ANO5, которая, например, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% или 89%, более типично по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93% или 94% и даже более типично по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 2, причем указанный полинуклеотид кодирует белок, который сохраняет активность ANO5.

Рекомбинантные AAV-векторы согласно настоящему изобретению содержат полинуклеотидную последовательность, которая гибридизуется в жестких условиях с последовательностью нуклеиновой кислоты, приведенной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 13, или комплементарными им последовательностями, фрагмент которых содержит более приблизительно 5 нуклеотидов, предпочтительно более 7 нуклеотидов, более предпочтительно более 9 нуклеотидов и наиболее предпочтительно более 17 нуклеотидов. В область настоящего изобретения включены фрагменты содержащие, например, 15, 17 или 20 нуклеотидов или более, которые являются селективными (т.е. специфично гибридизуются с любым из полинуклеотидов согласно настоящему изобретению), причем указанные фрагменты сохраняют активность ANO5. Зонды, способные специфично гибридизоваться с полинуклеотидом, могут устанавливать отличие полинуклеотидных последовательностей NTHi согласно настоящему изобретению от других полинуклеотидных последовательностей в одном и том же семействе генов или могут устанавливать отличие генов NTHi от других бактериальных генов и предпочтительно основаны на уникальных нуклеотидных последовательностях.

Термин "жесткий" используется для обозначения условий, которые обычно понимают в данной области техники как жесткие. Жесткость условий гибридизации в основном определяется температурой, ионной силой и концентрацией денатурирующих агентов, таких как формамид. Примеры жестких условий гибридизации и промывки включают 0,015 М хлорида натрия, 0,0015 М цитрата натрия при 65-68°C или 0,015 М хлорида натрия, 0,0015 М цитрата натрия и 50% формамида при 42°C. См. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, N.Y. 1989). Более жесткие условия (такие как более высокая температура, более низкая ионная сила, более высокая концентрация формамида или другого денатурирующего агента) также могут быть использованы, однако скорость гибридизации будет ухудшена. В тех случаях, когда рассматривают гибридизацию дезоксиолигонуклеотидов, дополнительные примерные жесткие условия гибридизации включают промывку в 6× SSC с добавлением 0,05% пиродифосфата натрия при 37°C (для 14-членных олигонуклеотидов), 48°C (для 17-членных олигонуклеотидов), 55°C (для 20-членных олигонуклеотидов) и 60 °C (для 23-членных олигонуклеотидов).

Другие агенты могут быть включены в буферы для гибридизации и промывки для уменьшения неспецифичной и/или фоновой гибридизации. Примеры включают 0,1% бычий сывороточный альбумин, 0,1% поливинилпирролидон, 0,1% пиродифосфат натрия, 0,1% додецилсульфат натрия, NaDodSO<sub>4</sub> (ДСН),

фиколл, раствор Денхардта, обработанную ультразвуком ДНК из спермы лосося (или другую некомплементарную ДНК) и сульфат декстрана, хотя могут быть использованы другие подходящие агенты. Концентрация и типы указанных добавок могут быть изменены без существенного влияния на жесткость условий гибридизации. Эксперименты по гибридизации обычно проводят при pH 6,8-7,4, однако при обычных условиях ионной силы скорость гибридизации практически не зависит от pH. См. Anderson et al., *Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach*, Ch. 4, IRL Press Limited (Oxford, England). Специалисты в данной области техники могут скорректировать условия гибридизации, чтобы приспособить указанные переменные и обеспечить образование гибридов ДНК, имеющих различную степень сходства последовательностей.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения рекомбинантные AAV-векторы согласно настоящему изобретению могут быть функционально соединены с регуляторным элементом, специфичным для мышц. Например, регуляторный элемент, специфичный для мышц, представляет собой элемент гена актина скелетных мышц человека, элемент гена актина мышц сердца, фактор, связывающийся с энхансером, специфичным для миоцитов (MEF), элемент энхансера креатинкиназы мышцы (MCK), тройные копии MCK (tMCK), элемент гена тропонина C быстро сокращающихся скелетных мышц, элемент гена тропонина C медленно сокращающихся мышц сердца, элемент гена тропонина I медленно сокращающихся мышц, индуцируемые гипоксией ядерные факторы, индуцируемый стероидом элемент или глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE).

Согласно другому варианту реализации настоящее изобретение относится к способам получения частицы рекомбинантного AAV-вектора, включающим культивирование клетки, которая была трансфицирована любым рекомбинантным AAV-вектором согласно настоящему изобретению, и выделение частиц рекомбинантного AAV из супернатанта трансфицированных клеток. Настоящее изобретение также относится к вирусным частицам, содержащим любой из рекомбинантных AAV-векторов согласно настоящему изобретению.

Согласно другому варианту реализации настоящее изобретение относится к способам лечения мышечной дистрофии, включающим введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества любого рекомбинантного AAV-вектора согласно настоящему изобретению. Согласно одному аспекту настоящего изобретения субъект, нуждающийся в лечении, имеет рецессивную мутацию в гене ANO5. Указанные способы могут обеспечить лечение дисферлин-ассоциированной мышечной дистрофии, пояснично-тазовой мышечной дистрофии типа 2L, миопатии Миоши типа 3, миопатии Бетлема, калпаинопатии, десмин-зависимой миопатии, дисферлинопатии, миофибриллярной миопатии, саркогликанопатии или связанной с ZASP миопатии. Помимо этого любой из вышеперечисленных способов лечения мышечной дистрофии дополнительно включает этап введения субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества композиции антиоксидантов. Например, композиция антиоксидантов содержит по меньшей мере один из кофермента Q10, липоевой кислоты, витамина, каротиноида, кофактора витамина, минерала, полифенола или флавоноида. В частности, композиция антиоксидантов содержит кофермент Q10, липоевую кислоту и витамин E.

Согласно другому варианту реализации настоящее изобретение относится к способам регенерации мышцы у субъекта, который нуждается в этом, включающим введение терапевтически эффективного количества любого рекомбинантного AAV-вируса согласно настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в этом. Согласно одному аспекту настоящего изобретения субъект, нуждающийся в лечении, имеет рецессивную мутацию в гене ANO5. Согласно другому аспекту настоящего изобретения субъект, нуждающийся в лечении, страдает мышечной дистрофией, такой как дисферлин-ассоциированная мышечная дистрофия, пояснично-тазовая мышечная дистрофия типа 2L, миопатия Миоши типа 3, миопатия Бетлема, калпаинопатия, десмин-зависимая миопатия, дисферлинопатия, миофибриллярная миопатия, саркогликанопатия или связанная с ZASP миопатия. Помимо этого любой из вышеперечисленных способов регенерации мышц дополнительно включает стадию введения терапевтически эффективного количества композиции антиоксидантов субъекту, нуждающемуся в этом. Например, композиция антиоксидантов содержит по меньшей мере один из кофермента Q10, липоевой кислоты, витамина, каротиноида, кофактора витамина, минерала, полифенола или флавоноида. В частности, композиция антиоксидантов содержит кофермент Q10, липоевую кислоту и витамин E.

Согласно другому варианту реализации настоящее изобретение относится к способам лечения хронической мышечной атрофии, включающим введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества любого из рекомбинантных AAV-векторов согласно настоящему изобретению. Согласно одному аспекту настоящего изобретения субъект, нуждающийся в лечении, имеет рецессивную мутацию в гене ANO5. Согласно другому аспекту настоящего изобретения субъект, нуждающийся в лечении, страдает мышечной дистрофией, такой как дисферлин-ассоциированная мышечная дистрофия, пояснично-тазовая мышечная дистрофия типа 2L или миопатия Миоши типа 3, миопатия Бетлема, калпаинопатия, десмин-зависимая миопатия, дисферлинопатия, миофибриллярная миопатия, саркогликанопатия или связанная с ZASP миопатия. Помимо этого любой из вышеперечисленных способов лечения хронической мышечной атрофии дополнительно включает этап введения терапевтически эффективного количества композиции антиоксидантов субъекту, нуждающемуся в этом. Например, композиция анти-

оксидантов содержит по меньшей мере один из кофермента Q10, липоевой кислоты, витамина, каротиноида, кофактора витамина, минерала, полифенола или флавоноида. В частности, композиция антиоксидантов содержит кофермент Q10, липоевую кислоту и витамин E.

Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей любой рекомбинантный AAV-вектор согласно настоящему изобретению для лечения мышечной дистрофии или синдрома хронической мышечной атрофии у субъекта, нуждающегося в этом. Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей любой рекомбинантный AAV-вектор согласно настоящему изобретению для регенерации мышцы у субъекта, нуждающегося в этом. Согласно одному аспекту настоящего изобретения композицию согласно настоящему изобретению вводят субъекту, имеющему рецессивную мутацию в гене ANO5. Согласно другому аспекту настоящего изобретения композицию согласно настоящему изобретению вводят субъекту, страдающему мышечной дистрофией, такой как дисферлин-ассоциированная мышечная дистрофия, пояснично-тазовая мышечная дистрофия типа 2L, миопатия Миоши типа 3, миопатия Бетлема, калпаинопатия, десмин-зависимая миопатия, дисферлинопатия, миофибриллярная миопатия, саркогликанопатия или связанная с ZASP миопатия. Любая из композиций согласно настоящему изобретению изготовлена для внутримышечной или внутривенной инъекции. Любая из композиций согласно настоящему изобретению дополнительно содержит терапевтически эффективное количество композиции антиоксидантов. Например, композиция антиоксидантов содержит по меньшей мере один из кофермента Q10, липоевой кислоты, витамина, каротиноида, кофактора витамина, минерала, полифенола или флавоноида. В частности, композиция антиоксидантов содержит кофермент Q10, липоевую кислоту и витамин E.

Согласно другому варианту реализации настоящее изобретение относится к применению любого рекомбинантного AAV-вектора согласно настоящему изобретению для получения лекарственного средства для лечения мышечной дистрофии или синдрома хронической мышечной атрофии у субъекта, нуждающегося в этом. Помимо этого настоящее изобретение относится к применению любого из рекомбинантных AAV-векторов согласно настоящему изобретению для получения лекарственного средства для регенерации мышцы у субъекта, нуждающегося в этом. Согласно одному аспекту настоящего изобретения лекарственное средство вводят субъекту, имеющему рецессивную мутацию в гене ANO5.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения лекарственное средство согласно настоящему изобретению вводят субъекту, страдающему мышечной дистрофией, такой как дисферлин-ассоциированная мышечная дистрофия, пояснично-тазовая мышечная дистрофия типа 2L, миопатия Миоши типа 3, миопатия Бетлема, калпаинопатия, десмин-зависимая миопатия, дисферлинопатия, миофибриллярная миопатия, саркогликанопатия или связанная с ZASP миопатия. Любое из лекарственных средств согласно настоящему изобретению изготовлено для внутримышечной или внутривенной инъекции. Любое из лекарственных средств согласно настоящему изобретению дополнительно содержит терапевтически эффективное количество композиции антиоксидантов. Например, композиция антиоксидантов содержит по меньшей мере один из кофермента Q10, липоевой кислоты, витамина, каротиноида, кофактора витамина, минерала, полифенола или флавоноида. В частности, композиция антиоксидантов содержит кофермент Q10, липоевую кислоту и витамин E.

Согласно другому варианту реализации настоящее изобретение относится к способам лечения мышечной дистрофии или хронической мышечной атрофии, включающим введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества композиции антиоксидантов. Композиция антиоксидантов содержит по меньшей мере один из кофермента Q10, липоевой кислоты, витамина, каротиноида, кофактора витамина, минерала, полифенола или флавоноида. Согласно некоторым аспектам композиция антиоксидантов содержит кофермент Q10, липоевую кислоту и витамин E. Согласно одному аспекту настоящего изобретения субъект, нуждающийся в лечении, имеет рецессивную мутацию в гене ANO5. Согласно другому аспекту настоящего изобретения окислительный стресс в скелетной мышце субъекта снижается. Согласно другому аспекту настоящего изобретения улучшается функция скелетной мышцы субъекта. Согласно другому аспекту настоящего изобретения субъект страдает дисферлин-ассоциированной мышечной дистрофией, пояснично-тазовой мышечной дистрофией типа 2L, миопатией Миоши типа 3, миопатией Бетлема, калпаинопатией, десмин-зависимой миопатией, дисферлинопатией, миофибриллярной миопатией, саркогликанопатией или связанной с ZASP миопатией.

Настоящее изобретение также относится к способам замедления прогрессирования мышечной дистрофии или хронической мышечной атрофии, включающим введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества композиции антиоксидантов. Композиция антиоксидантов содержит по меньшей мере один из кофермента Q10, липоевой кислоты, витамина, каротиноида, кофактора витамина, минерала, полифенола или флавоноида. Согласно некоторым аспектам композиция антиоксидантов содержит кофермент Q10, липоевую кислоту и витамин E. Согласно одному аспекту настоящего изобретения субъект, нуждающийся в лечении, имеет рецессивную мутацию в гене ANO5. Согласно другому аспекту настоящего изобретения окислительный стресс в скелетной мышце субъекта снижается. Согласно другому аспекту настоящего изобретения улучшается функция скелетной мышцы субъекта. Согласно другому аспекту настоящего изобретения субъект страдает дисферлин-ассоциированной мышечной дистрофией, пояснично-тазовой мышечной дистрофией типа 2L, миопатией Миоши типа 3,

миопатией Бетлема, калпаинопатией, десмин-зависимой миопатией, дисферлинопатией, миофибриллярной миопатией, саркогликанопатией или связанной с ZASP миопатией.

В любом из способов согласно настоящему изобретению композицию антиоксидантов вводят перорально. В любом из способов согласно настоящему изобретению антиоксиданты вводят в составе одной и той же композиции или антиоксиданты вводят в виде отдельных композиций. В некоторых случаях антиоксиданты вводят по отдельности, но совместно. Помимо этого в любом из способов согласно настоящему изобретению антиоксиданты вводят в разные моменты времени или последовательно. В любом из способов согласно настоящему изобретению композицию антиоксидантов вводят один раз в сутки, один раз в неделю, два раза в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели, ежемесячно или один раз каждые два месяца.

Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей терапевтически эффективное количество композиции антиоксидантов. Композиция антиоксидантов содержит по меньшей мере один из кофермента Q10, липоевой кислоты, витамина, каротиноида, кофактора витамина, минерала, полифенола или флавоноида для лечения мышечной дистрофии или синдрома хронической атрофии мышц у субъекта, нуждающегося в этом.

Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей терапевтически эффективное количество композиции антиоксидантов. Композиции антиоксидантов содержат по меньшей мере один из кофермента Q10, липоевой кислоты, витамина, каротиноида, кофактора витамина, минерала, полифенола или флавоноида для замедления прогрессирования мышечной дистрофии или хронической мышечной атрофии у субъекта, нуждающегося в этом. Согласно некоторым аспектам композиция антиоксидантов содержит кофермент Q10, липоевую кислоту и витамин E.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения любую из композиций согласно настоящему изобретению вводят субъекту, имеющему рецессивную мутацию в гене ANO5. Согласно другому аспекту настоящего изобретения окислительный стресс снижается в скелетной мышце субъекта после введения композиции. Согласно другому аспекту настоящего изобретения функция скелетной мышцы субъекта улучшается после введения композиции. Согласно другому аспекту настоящего изобретения любые из композиций согласно настоящему изобретению вводят субъекту, страдающему мышечной дистрофией, такой как дисферлин-ассоциированная мышечная дистрофия, пояснично-тазовая мышечная дистрофия типа 2L, миопатия Миоши типа 3, миопатия Бетлема, калпаинопатия, десмин-зависимая миопатия, дисферлинопатия, миофибриллярная миопатия, саркогликанопатия или связанная с ZASP миопатия. Любая из композиций согласно настоящему изобретению изготовлена для внутримышечной или внутривенной инъекции.

Согласно другому варианту реализации настоящее изобретение относится к применению композиции антиоксидантов для получения лекарственного средства для лечения мышечной дистрофии или синдрома хронической атрофии мышц у субъекта, нуждающегося в этом. Композиция антиоксидантов в любом из лекарственных средств согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере один из кофермента Q10, липоевой кислоты, витамина, каротиноида, кофактора витамина, минерала, полифенола или флавоноида.

Помимо этого настоящее изобретение относится к применению композиции антиоксидантов для получения лекарственного средства для регенерации мышцы у субъекта, нуждающегося в этом. Композиция антиоксидантов в любом из лекарственных средств согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере один из кофермента Q10, липоевой кислоты, витамина, каротиноида, кофактора витамина, минерала, полифенола или флавоноида. Согласно некоторым аспектам композиция антиоксидантов содержит кофермент Q10, липоевую кислоту и витамин E.

Помимо этого настоящее изобретение относится к применению композиции антиоксидантов для получения лекарственного средства для замедления прогрессирования мышечной дистрофии или синдрома атрофии мышц у субъекта, нуждающегося в этом. Композиция антиоксидантов в любом из лекарственных средств согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере один из кофермента Q10, липоевой кислоты, витамина, каротиноида, кофактора витамина, минерала, полифенола или флавоноида. Согласно некоторым аспектам композиция антиоксидантов содержит кофермент Q10, липоевую кислоту и витамин E.

Любое лекарственное средство согласно настоящему изобретению вводят субъекту, имеющему рецессивную мутацию в гене ANO5. Согласно другому аспекту настоящего изобретения окислительный стресс в скелетной мышце субъекта снижается. Согласно другому аспекту настоящего изобретения улучшается функция скелетной мышцы субъекта. Согласно другому аспекту настоящего изобретения любое из лекарственных средств согласно настоящему изобретению вводят субъекту, страдающему мышечной дистрофией, такой как дисферлин-ассоциированная мышечная дистрофия, пояснично-тазовая мышечная дистрофия типа 2L, миопатия Миоши типа 3, миопатия Бетлема, калпаинопатия, десмин-зависимая миопатия, дисферлинопатия, миофибриллярная миопатия, саркогликанопатия или связанная с ZASP миопатия. Помимо этого любое из лекарственных средств согласно настоящему изобретению изготовлено для внутримышечной или внутривенной инъекции.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения композицию антиоксидантов

вводят перорально. Согласно некоторым аспектам антиоксиданты входят в состав одной композиции. Согласно другим аспектам настоящего изобретения антиоксиданты входят в состав отдельных композиций. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения антиоксиданты указанной композиции антиоксидантов вводят совместно. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения антиоксиданты указанной композиции антиоксидантов вводят в разные моменты времени или последовательно. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения композицию антиоксидантов вводят один раз в сутки, один раз в неделю, два раза в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели, ежемесячно или один раз каждые два месяца.

#### Краткое описание чертежей

На фиг. 1A-1D представлена схема создания мышинной модели  $\text{Apo5}^{-/-}$ . На панели (a) представлен вектор, нацеленный к  $\text{Apo5}$ , содержащий экзогенный интрон и  $\text{lacZ}$ -кодирующий экзон с терминирующим сигналом полиаденилирования. Полученная мРНК заканчивается экзоном 8. На панели (b) представлена геномная ДНК, выделенная из кусочков хвостов животных в одном помете. Дорожка 1 - мышшь дикого типа (WT), дорожка 2 - мышшь  $\text{Apo5}^{+/+}$ , дорожка 3 - мышшь  $\text{Apo5}^{-/-}$ , фрагмент аллеля дикого типа массой 300 п.н., аллель  $\text{Apo5}$  - фрагмент массой 200 п.н. На панели (c) представлены продукты ОТ-ПЦР, которые свидетельствуют об отсутствии транскрипта  $\text{Apo5}$  в мышечной ткани  $\text{Apo5}^{-/-}$  при использовании двух наборов праймеров, нацеленных к  $\text{Apo5}$ . Дорожка 1: контроль GAPDH; дорожка 2 - праймеры e10-14, охватывающие экзоны 10-14; дорожка 3 - праймеры e17-20, охватывающие экзоны 17-20. На панели (d) представлены результаты, свидетельствующие о том, что >99% снижение относительной экспрессии  $\text{ANO5}$  на уровне РНК было подтверждено с помощью кОТ-ПЦР в четырехглавой мышце QD), икроножной мышце (GAS) и передней большеберцовой мышце (TA), полученной от мышши  $\text{Apo5}^{-/-}$  ( $P < 0,001$ ).

На фиг. 2A-2F представлены характеристики  $\text{Apo5}^{-/-}$ -дефицитных мышши. На панели (a) представлены результаты, указывающие на то, что уровни креатинкиназы в сыворотке крови значительно повышены у мышши  $\text{Apo5}^{-/-}$  через 9 месяцев ( $P < 0,05$ , t-тест). На панели (b) представлены результаты, указывающие на то, что удельная сила сжатия полосок диафрагмы от 9-месячных мышши  $\text{Apo5}^{-/-}$  была значительно уменьшена по сравнению с контрольными мышши ( $P < 0,01$ , t-тест). На панели (c) представлены результаты, указывающие на то, что удельная сила сжатия длинного разгибателя пальцев (EDL) и передней большеберцовой мышши (TA) 9-месячных мышши  $\text{Apo5}^{-/-}$  существенно не отличалась по сравнению с контрольными животными ( $P > 0,05$ , t-тест). На панели (d) изображены срезы ткани, окрашенные гематоксилином и эозином, которые демонстрируют дистрофическую патологию легкой степени тяжести, включая центральные ядра, изменчивость размеров волокон и области некроза в TA и GAS мышши  $\text{Apo5}^{-/-}$  по сравнению с контрольными животными дикого типа. Масштабная метка=50 мкм. На панели (e) представлены результаты измерения диаметра мышечных волокон, свидетельствующие об уменьшении диаметра волокон по сравнению с животными дикого типа, особенно в мышцах GAS ( $P < 0,0001$ , t-тест). На панели (f) представлены результаты, свидетельствующие о том, что мышши  $\text{Apo5}^{-/-}$  имели частые паузы во время проведения исследований для оценки утомления на беговой дорожке.

На фиг. 3A-3E представлена физиологическая характеристика мышши  $\text{Apo5}^{-/-}$ . Панель (a). Уровни молочной кислоты были незначительно снижены у мышши  $\text{Apo5}^{-/-}$  по сравнению с контрольными животными дикого типа после бега на беговой дорожке ( $P = 0,15$ ). Панель (b). Электрофизиологические характеристики мышши. Амплитуда СМАР существенно не различалась у мышши  $\text{Apo5}^{-/-}$  ( $45,1 \pm 2,2$  мВ) и мышши дикого типа ( $40,8 \pm 2,4$  мВ) ( $p = 0,22$ ). Потенциал фибрилляции не был обнаружен у мышши  $\text{Apo5}^{-/-}$  или мышши дикого типа. Панели (c-e). Характеристики сопротивления мышши при 50 кГц (фаза, реактивность, сопротивление, соответственно).

Не было обнаружено различий между волокнами у мышши  $\text{Apo5}^{-/-}$  ( $31,0 \pm 2,7$ ,  $248,1 \pm 37,8$  Ом,  $411,4 \pm 34,6$  Ом) и мышши дикого типа ( $31,7 \pm 3,9$ ,  $269,0 \pm 83,9$  Ом,  $424,3 \pm 73,9$  Ом) (фаза:  $p = 0,59$ , реактивность:  $p = 0,44$ , сопротивление:  $p = 0,59$ ). Не было обнаружено различий при 100 кГц между волокнами мышши  $\text{Apo5}^{-/-}$  ( $36,5 \pm 2,4$ ,  $216,2 \pm 27,3$  Ом,  $290,7 \pm 22,0$  Ом) и мышши дикого типа ( $37,0 \pm 4,8$ ,  $228,4 \pm 63,9$  Ом,  $295,8 \pm 36,1$  Ом) (фаза:  $p = 0,77$ , реактивность:  $p = 0,55$ , сопротивление:  $p = 0,68$ ).

На фиг. 4A-4G представлены результаты оценки субклеточной гистопатологии в мышце мышши  $\text{Apo5}^{-/-}$ . На панели (a) представлены результаты трехцветной окраски по Гомори мышц TA 10-месячных мышши  $\text{Apo5}^{-/-}$  и мышши дикого типа. Мышца  $\text{Apo5}^{-/-}$  содержит мембранные агрегаты (стрелки). Масштабная метка=20 мкм. На панели (b) представлены результаты определения количества волокон, содержащих агрегаты в мышцах TA и GAS мышши  $\text{Apo5}^{-/-}$  по сравнению с мышши дикого типа ( $p < 0,0001$ , однофакторный дисперсионный анализ). На панелях (c, d) представлены изображения, полученные с помощью электронной микроскопии, демонстрирующие присутствие мембранных агрегатов в мышцах  $\text{Apo5}^{-/-}$ . Агрегаты были либо рыхло упакованы, соединяя трубчатые образования с нечеткими внутренними трубчатками (белые стрелки), либо представляли собой плотно упакованные скопления везикулярных или трубчатых мембран (черные стрелки). Масштабные метки=500 нм. На панели (e) представлены результаты, свидетельствующие о том, что субсарколеммальные скопления митохондрий (стрелки) и разрушающихся митохондрий (звездочка) часто выявляли с помощью электронной микроскопии в мышцах  $\text{Apo5}^{-/-}$ . Масштабные метки=500 нм (слева) и 2 мкм (справа). На панели (f) предоставлены результаты



окрашивания сукцинатдегидрогеназы мышц ТА 10-месячных мышей  $Ano5^{-/-}$ , свидетельствующие о присутствии утолщения сарколеммы и уплотненных областей в волокнах, которые отсутствовали у мышей дикого типа. Масштабные метки=10 мкм. На панели (д) представлены криосрезы мышцы ТА 10-месячных мышей  $Ano5^{-/-}$ , окрашенные для выявления сукцинатдегидрогеназы (SDH). Стрелки указывают на агрегаты, которые лишены окраски SDH (слева). Последовательные срезы от 10-месячных мышей  $Ano5^{-/-}$  свидетельствуют о том, что многие мембранные агрегаты (белые стрелки), наблюдаемые при трехцветном окрашивании, являются положительными в отношении SERCA1 (справа), это указывает на то, что они получены из саркоплазматического ретикулума. Масштабная метка=40 мкм.

На фиг. 5A-4E представлены результаты, свидетельствующие о том, что у мышей  $Ano5^{-/-}$  нарушено восстановление мембраны. На панели (а) представлены изображения мышечных волокон мышей  $Ano5^{-/-}$  и мышей дикого типа через 5 с и 19 с после повреждения лазерным импульсом. Красные стрелки указывают участок повреждения, при этом краситель FM1-43 накапливался быстрее в мышцах мышей  $Ano5^{-/-}$  по сравнению с мышцами дикого типа. Масштабная метка=50 мкм. На панели (b) представлены результаты измерения интенсивности флуоресценции после лазерного повреждения. Мышца  $Ano5^{-/-}$  статистически достоверно отличается от волокон мышей дикого типа и волокон AAV.ANO5 во всех временных точках через >100 секунд после повреждения (двухфакторный дисперсионный анализ,  $P<0,001$ ). На панели (c) представлены уровни экспрессии ANO5-FLAG в мышцах  $Ano5^{-/-}$ , инъецированных  $5 \times 10^{10}$  генома вектора AAV.ANO5.FLAG. Иммунофлуоресцентные исследования с применением антитела к FLAG выявили экспрессию ANO5-FLAG на поверхности клеток в обработанной мышце (сверху), которая отсутствовала в необработанной мышце  $Ano5^{-/-}$  (внизу). Масштабная метка=40 мкм. На панели (d) представлены результаты, указывающие на восстановление мышц от повреждения, вызванного кардиотоксином. Представлены срезы тканей, окрашенные гематоксилином и эозином, мышц ТА мышей дикого типа и  $Ano5^{-/-}$  через 1, 3, 7, 14, 30 и 90 дней после инъекции кардиотоксина (представлены данные для 3, 7, 14 и 30 дня). Мышца  $Ano5^{-/-}$  была повреждена более сильно и проявила нарушение регенерации по сравнению с диким типом. На панели (e) представлены результаты, свидетельствующие о том, что размер мышечных волокон остается достоверно меньшим в мышце  $Ano5^{-/-}$  по сравнению с диким типом через 30 дней (кардиотоксин D30) и 90 дней (кардиотоксин D90) после инъекции кардиотоксина ( $P<0,05$ , t-тест).

На фиг. 6 представлены результаты исследования произвольной активности мышей  $Ano5^{-/-}$ , получавших антиоксидантную терапию или рацион с плацебо. На графике представлены результаты исследования произвольной активности (количество раз, когда мыши пересекали горизонтальные и/или вертикальные лазерные лучи в течение 45 минут) для мышей  $Ano5^{-/-}$ , получавших антиоксидантную диету или плацебо-контроль в течение 12 и 16 недель. Мыши  $Ano5^{-/-}$ , получавшие тройную антиоксидантную терапию, имели значительно повышенную активность по сравнению с мышцами, получавшими плацебо, через 16 недель.

На фиг. 7 представлены результаты измерения удельной силы на диафрагме мышей  $Ano5^{-/-}$ , получавших тройную антиоксидантную терапию или рацион с плацебо, и контрольных мышей дикого типа, получавших рацион с плацебо. Мыши  $Ano5^{-/-}$ , получавшие тройную антиоксидантную терапию, имели значительно повышенную удельную силу диафрагмы по сравнению с мышцами, получавшими плацебо, через 16 недель.

На фиг. 8A-8B представлены результаты исследования влияния тройной антиоксидантной терапии на биогенез и функцию митохондрий. Ткань икроножной мышцы самцов мышей использовали для измерения маркера митохондриального биогенеза, экспрессии маркера митохондриального биогенеза PGC-1 $\alpha$  и активности цитратсинтазы у мышей, получавших рацион с тройной антиоксидантной терапией. На панели (а) представлены результаты оценки экспрессии PGC-1 $\alpha$  у мышей, получавших тройную антиоксидантную терапию или рацион с плацебо. На панели (b) представлены результаты оценки активности цитратсинтазы (CS) у самцов и самок мышей  $Ano5^{-/-}$  и дикого типа, получавших тройную антиоксидантную терапию или рацион с плацебо.

#### Подробное описание изобретения

ANO5 играет существенную роль в восстановлении мышц, и согласно настоящему изобретению предложены AAV-векторы, содержащие ген ANO5, для лечения МД. Разрушение ANO5 точно фенотипирует потерю экспрессии дисферлина в мышечных моделях, и мутации дисферлина вызывают МД, сходные с миопатиями, связанными с ANO5 (пояснично-тазовая мышечная дистрофия типа 2B (LGMD2B) и миопатическая дистрофия Миоши типа 1 (MMD1) в сравнении с пояснично-тазовой мышечной дистрофией типа 2L (LGMD2L) и миопатической дистрофией Миоши типа 3 (MMD3)).

Мыши  $Ano5^{-/-}$  представляют собой важную модель для исследования ANO5-миопатии, восстановления сарколеммы и слияния миогенных клеток. Экспериментальные данные, представленные в приведенных ниже примерах, поддерживают способы генной заместительной терапии в качестве стратегии лечения ANO5-миопатии путем частичного спасения фенотипа восстановления мембраны при лечении мышей  $Ano5^{-/-}$  с помощью AAV.ANO5-FLAG. AAV.

В настоящей заявке термин "AAV" является стандартной аббревиатурой для аденоассоциированного вируса. Аденоассоциированный вирус представляет собой парвовирус, содержащий одноцепочечную ДНК, который размножается только в клетках, в которых определенные функции обеспечены коинфици-

рующим вспомогательным вирусом. В настоящее время существует тринадцать охарактеризованных серотипов AAV, которые представлены ниже в табл. 1. Общая информация и обзоры AAV могут быть найдены, например, в Carter, 1989, Handbook of Parvoviruses, Vol. 1, pp. 169-228, и Berns, 1990, Virology, pp. 1743-1764, Raven Press, (New York). Однако без сомнений ожидается, что аналогичные принципы будут применимы к дополнительным серотипам AAV, поскольку хорошо известно, что различные серотипы довольно тесно связаны структурно и функционально даже на генетическом уровне. (См., например, Blacklowe, 1988, pp. 165-174 of Parvoviruses and Human Disease, J.R. Pattison, ed.; и Rose, Comprehensive Virology 3:1-61 (1974)). Например, все серотипы AAV очевидно обладают очень сходными репликативными свойствами, опосредованными гомологичными генами гер; и все они имеют три родственных капсидных белка, таких как те, которые экспрессируются в AAV2. Степень родства дополнительно подтверждается с помощью гетеродуплексного анализа, который выявляет интенсивную кросс-гибридизацию между серотипами по всей длине генома, а также присутствием аналогичных сегментов, способных к внутримолекулярной ренатурации на концах, которые соответствуют "последовательностям инвертированных концевых повторов" (ITR). Сходные характеристики инфекционности также позволяют предположить, что функции репликации в каждом серотипе находятся под сходным регуляторным контролем.

В настоящей заявке термин "AAV-вектор" относится к вектору, содержащему один или более представляющих интерес полинуклеотидов (или трансгенов), которые фланкированы последовательностями концевых повторов AAV (ITR). Подходящие AAV-векторы могут быть реплицированы и упакованы в инфекционные вирусные частицы, когда они присутствуют в клетке-хозяине, которая была трансфицирована вектором, кодирующим и экспрессирующим продукты генов гер и сар.

Термин "вирион AAV" или "вирусная частица AAV" или "частица AAV-вектора" относится к вирусной частице, состоящей из по меньшей мере одного капсидного белка AAV и инкапсидированного полинуклеотида AAV-вектора. Если частица содержит гетерологичный полинуклеотид (т.е. полинуклеотид, отличный от генома AAV дикого типа, такой как трансген, который должен быть доставлен в клетку млекопитающего), его, как правило, называют "частицей AAV-вектора" или просто "AAV-вектором". Следовательно, получение частицы AAV-вектора обязательно включает получение AAV-вектора, поскольку такой вектор содержится в частице AAV-вектора.

AAV-вектор может представлять собой одноцепочечную или двухцепочечную нуклеиновую кислоту, содержащую 5'-концевую последовательность инвертированного концевого повтора (ITR) AAV и 3'-концевую ITR AAV, фланкирующие последовательность, кодирующую белок, функционально соединенную с регуляторными элементами транскрипции, т.е. с одним или более промоторами и/или энхансерами, и с последовательностью полиаденилирования и, необязательно, с одним или более интронами, вставленными между экзонами последовательности, кодирующей белок. Одноцепочечный AAV-вектор относится к нуклеиновым кислотам, которые присутствуют в геноме вирусной частицы AAV, и может представлять собой смысловую цепь или антисмысловую цепь последовательности нуклеиновых кислот, раскрытых в настоящем документе. Размер подходящих одноцепочечных нуклеиновых кислот предоставлен в виде количества пар нуклеотидов. Двухцепочечный AAV-вектор относится к нуклеиновым кислотам, которые присутствуют в ДНК плазмид, например, pUC19, или в геноме двухцепочечного вируса, например, бакуловируса, используемого для экспрессии или переноса нуклеиновых кислот AAV-вектора. Размер подходящих двухцепочечных нуклеиновых кислот представлен в виде количества пар нуклеотидов (п.н.).

В настоящей заявке термин "инвертированный концевой повтор" (ITR) относится к областям, принятым в данной области техники, обнаруженным на 5'- и 3'-концах генома AAV, которые функционируют как цис-элементы в качестве точек начала репликации ДНК и в качестве сигналов упаковки для вирусного генома. AAV ITR, совместно с участком, кодирующим гер AAV, обеспечивают эффективное вырезание, восстановление и интеграцию нуклеотидной последовательности, помещенной между двумя фланкирующими ITR в геном клетки-хозяина. Последовательности некоторых AAV-ассоциированных ITR раскрыты в работе Y Yan et al., J. Virol. 79(1):364-379 (2005), которая полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки.

Термин "элемент, контролирующий транскрипцию" относится к нуклеотидным последовательностям гена, вовлеченным в регуляцию генетической транскрипции, включая промотор, а также элементы ответа, активаторные и энхансерные последовательности для связывания транскрипционных факторов, чтобы облегчить связывание РНК-полимеразы и стимулировать экспрессию, а также последовательности операторов или сайленсеров, с которыми связываются репрессорные белки, чтобы блокировать присоединение РНК-полимеразы и предотвратить экспрессию.

Гены "гер" и "сар" AAV представляют собой гены, кодирующие белки, участвующие в репликации и инкапсидировании, соответственно. Гены гер и сар AAV были обнаружены во всех серотипах AAV, изученных на сегодняшний день, и описаны в настоящем документе и в процитированных ссылках. В AAV дикого типа гены гер и сар обычно обнаруживаются в вирусном геноме рядом друг с другом (т.е. они "соединены" как смежные или перекрывающиеся транскрипционные единицы), и они обычно являются консервативными среди серотипов AAV. Гены гер и сар AAV также индивидуально и в совокупно-

сти называются "генами упаковки AAV". Ген сар AAV в соответствии с настоящим изобретением кодирует белок Сар, который способен упаковывать AAV-векторы в присутствии вспомогательных функциональных элементов гер и аденовируса и способен связываться с клеточными рецепторами-мишенями. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ген сар AAV кодирует белок капсида, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из определенного серотипа AAV, например, серотипов, представленных в табл. 1 и AAV rh.74 (см. патент США №9434928). В область настоящего изобретения также включены другие типы вариантов гAAV, например, гAAV с мутациями капсида. См., например, Marsic et al., *Mol Ther*, 22(11): 1900-1909 (2014).

Таблица 1  
Серотипы AAV

Серотип AAV	Номер доступа в Genbank
AAV-1	NC_002077.1
AAV-2	NC_001401.2
AAV-3	NC_001729.1
AAV-3B	AF028705.1
AAV-4	NC_001829.1
AAV-5	NC_006152.1
AAV-6	AF028704.1
AAV-7	NC_006260.1
AAV-8	NC_006261.1
AAV-9	AX753250.1
AAV-10	AY631965.1
AAV-11	AY631966.1
AAV-12	DQ813647.1
AAV-13	EU285562.1

Последовательности AAV, применяемые для получения AAV, могут быть получены из генома любого серотипа AAV. Обычно серотипы AAV имеют геномные последовательности со значительной гомологией на уровнях аминокислот и нуклеиновых кислот, обеспечивают аналогичный набор генетических функций, вырабатывают вирионы, которые по существу физически и функционально эквивалентны, и реплицируются и собираются с помощью практически идентичных механизмов. Геномную последовательность серотипов AAV и обсуждение сходных геномных элементов можно найти, например, в GenBank под номером доступа U89790; в GenBank под номером доступа J01901; в GenBank под номером доступа AF043303; в GenBank под номером доступа AF085716; Chlorini et al., *J. Vir.* 71: 6823-33(1997); Srivastava et al., *J. Vir.* 45:555-64 (1983); Chlorini et al., *J. Vir.* 73:1309-1319 (1999); Rutledge et al., *J. Vir.* 72:309-319 (1998); и Wu et al., *J. Vir.* 74: 8635-47 (2000).

Геномная организация всех известных серотипов AAV очень сходна. Геном AAV представляет собой линейную одноцепочечную молекулу ДНК, которая содержит менее 5000 нуклеотидов (нк.) в длину. Инвертированные концевые повторы (ITR) фланкируют уникальные кодирующие нуклеотидные последовательности для неструктурных белков репликации (Rep) и структурных (VP) белков. Белки VP образуют капсид. Концевые 145 нуклеотидов являются самокомплементарными и организованы так, что может быть образован энергетически стабильный внутримолекулярный дуплекс, образующий Т-образную шпильку. Упомянутые шпильчатые структуры функционируют как точка начала репликации вирусной ДНК, выполняя функцию праймеров для клеточного комплекса ДНК-полимеразы. Гены Rep кодируют белки Rep, Rep78, Rep68, Rep52 и Rep40. Rep78 и Rep68 транскрибируются с промотора p5, и Rep 52 и Rep40 транскрибируются с промотора p19. Гены сар кодируют белки VP, VP1, VP2 и VP3. Гены сар транскрибируются с промотора p40.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок капсида AAV, функционально соединена с последовательностями, контролирующими экспрессию, для экспрессии в определенном типе клеток, таких как клетки линии Sf9 или HEK. Для практического применения настоящего изобретения могут быть использованы методики, известные специалисту в данной области техники, для экспрессии чужеродных генов в клетках-хозяевах насекомых или клетках-хозяевах млекопитающих. Методология молекулярной инженерии и экспрессии полипептидов в клетках насекомых описана, например, в Summers and Smith. 1986. *A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Culture Procedures*, Texas Agricultural Experimental Station Bull. No. 7555, College Station, Tex.; Luckow. 1991. В Prokop et al., *Cloning and Expression of Heterologous Genes in Insect Cells with Baculovirus Vectors' Recombinant DNA Technology and Applications*, 97-152; King, L.A. and R.D.

Possee, 1992, *The baculovirus expression system*, Chapman and Hall, United Kingdom; O'Reilly, D.R., L. K. Miller, V. A. Luckow, 1992, *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*, New York; W.H. Freeman and Richardson, C.D., 1995, *Baculovirus Expression Protocols, Methods in Molecular Biology*, volume 39; патентах США №№ 4745051; US2003148506; и WO 03/074714. Особенно подходящим промотором для транскрипции нуклеотидной последовательности, кодирующей белок капсида AAV, является, например, промотор полиэдрина. Однако в область настоящего изобретения включены другие промоторы, которые активны в клетках насекомых, известные в данной области техники, например, промоторы p10, p35 или IE-1, а также дополнительные промоторы, описанные в вышеупомянутых ссылках.

Применение клеток насекомых для экспрессии гетерологичных белков, а также способы введения нуклеиновых кислот, таких как векторы, например, векторы, совместимые с клетками насекомых, в такие клетки и способы поддержания таких клеток в культуре, хорошо документированы. См., например, *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*, ed. Richard, Humana Press, NJ (1995); O'Reilly et al., *BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS, A LABORATORY MANUAL*, Oxford Univ. Press (1994); Samulski et al., *J. Vir.* 63:3822-8 (1989); Kajigaya et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 88: 4646-50 (1991); Ruffing et al., *J. Vir.* 66:6922-30 (1992); Kirnbauer et al., *Vir.* 219:37-44 (1996); Zhao et al., *Vir.* 272:382-93 (2000); и Samulski et al., патент США №6204059. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая AAV в клетках насекомых, представляет собой вектор, совместимый с клетками насекомых. В настоящей заявке термин "вектор, совместимый с клеткой насекомого" или "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной к продуктивной трансформации или трансфекции насекомого или клетки насекомого. Примерные биологические векторы включают плазмиды, линейные молекулы нуклеиновых кислот и рекомбинантные вирусы. Любой вектор может быть применен, если он совместим с клетками насекомых. Вектор может интегрироваться в геном клеток насекомых, однако присутствие вектора в клетке насекомых не обязательно должно быть постоянным, и временные эпизодические векторы также включены в область настоящего изобретения. Векторы могут быть введены любыми известными способами, например, путем химической обработки клеток, электропорации или инфекции. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вектор представляет собой бакуловирус, вирусный вектор или плазмиду. Согласно более предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вектор представляет собой бакуловирус, т.е. конструкция представляет собой бакуловирусный вектор.

Бакуловирусные векторы и способы их применения описаны в приведенных выше ссылках по молекулярной модификации клеток насекомых.

Бакуловирусы представляют собой покрытые оболочкой ДНК-вирусы членистоногих, два члена из которых являются хорошо известными векторами экспрессии для получения рекомбинантных белков в клеточных культурах. Бакуловирусы имеют кольцевые двухцепочечные геномы (80-200 т.п.н.), которые могут быть модифицированы так, чтобы обеспечить доставку большого фрагмента генома в конкретные клетки. Вирусы, применяемые в качестве вектора, обычно представляют собой многокапсидный нуклео-полиэдровирус *Autographa californica* (AcMNPV) или *Bombux mori* (Bm) NPV (Kato et al., 2010).

Бакуловирусы обычно применяют для инфицирования клеток насекомых, чтобы экспрессировать рекомбинантные белки. В частности, экспрессию гетерологичных генов у насекомых можно осуществлять, как описано, например, в патенте США №4745051; Friesen et al (1986); EP 127,839; EP 155476; Vlask et al (1988); Miller et al (1988); Carbonell et al (1988); Maeda et al (1985); Lebacqz-Verheyden et al (1988); Smith et al (1985); Miyajima et al (1987); и Martin et al (1988). Многочисленные штаммы и варианты бакуловирусов и соответствующие чувствительные клетки-хозяева насекомых, которые могут быть использованы для получения белка, описаны в Luckow et al (1988), Miller et al (1986); Maeda et al (1985) и McKenna (1989).

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к геномам гAAV. Геномы гAAV содержат один или более ITR AAV, фланкирующих полинуклеотидную последовательность, кодирующую белок ANO5. Если полинуклеотид кодирует белок ANO5, то указанный полинуклеотид функционально соединен с ДНК, контролирующей транскрипцию, в частности промоторной ДНК и последовательностью ДНК сигнала полиаденилирования, которые являются функциональными в клетках-мишенях, например, мышечных клетках, с образованием генной кассеты. Генная кассета также может содержать интронные последовательности, чтобы облегчить процессинг транскрипта РНК при экспрессии в клетках млекопитающих. Например, геном AAV содержит один или более ITR AAV, фланкирующих один или более экзонов гена ANO5, таких как экзон 8 и экзон 9 гена ANO5. Геном AAV может также содержать один или более из следующих: интрон, ген-репортер, такой как Lac-z $\beta$ -галактозидаза, или ген устойчивости к неомицину, сайты рекомбинации CRE-Lox, такие как LoxP, и сайт внутренней посадки рибосомы (IRES).

#### Способы получения рекомбинантных AAV

Согласно настоящему изобретению предложены материалы и способы получения рекомбинантных AAV в клетках насекомых или млекопитающих. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вирусная конструкция дополнительно содержит промотор и сайт рестрикции, расположенный после промотора, чтобы обеспечить возможность введения полинуклеотида, кодирующего один или

более представляющих интерес белков, причем промотор и сайт рестрикции расположены в направлении 3'-конца относительно 5'-концевого ITR AAV и в направлении 5'-конца относительно 3'-концевого ITR AAV. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вирусная конструкция дополнительно содержит посттранскрипционный регуляторный элемент, расположенный в направлении 3'-конца относительно сайта рестрикции и в направлении 5'-конца относительно 3'-концевого ITR AAV. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вирусная конструкция дополнительно содержит полинуклеотид, введенный в сайт рестрикции и функционально соединенный с промотором, причем указанный полинуклеотид содержит кодирующую область белка, представляющего интерес. Специалист в данной области техники поймет, что любой из AAV-векторов, раскрытых в настоящей заявке, может быть использован в способе согласно настоящему изобретению в качестве вирусной конструкции для получения рекомбинантного AAV. ДНК-плазмиды переносят в клетки, чувствительные к инфицированию, с помощью вспомогательного вируса AAV (например, аденовируса, аденовируса, дефицитного по E1, или герпесвируса), для сборки генома gAAV в инфекционные вирусные частицы. Методики получения частиц gAAV, в которых в клетке обеспечен геном AAV, который должен быть упакован, гены гер и сар, и функциональные элементы вспомогательного вируса, являются стандартными в данной области техники. Для получения gAAV необходимо присутствие в одной клетке (обозначенной в настоящем документе как упаковывающая клетка) следующих компонентов: генома gAAV, генов гер и сар AAV, отделенных от (т.е. не входящих в состав) генома gAAV, и функциональных элементов вспомогательного вируса.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вспомогательные функции обеспечены одной или более вспомогательными плазмидами или вспомогательными вирусами, содержащими аденовирусные или бакуловирусные вспомогательные гены. Неограничивающие примеры аденовирусных или бакуловирусных вспомогательных генов включают, но не ограничиваются ими, E1A, E1B, E2A, E4 и VA, которые могут обеспечивать вспомогательные функции для упаковки AAV.

Вспомогательные вирусы AAV известны в данной области техники и включают, например, вирусы семейства *Adenoviridae* и семейства *Herpesviridae*. Примеры вспомогательных вирусов AAV включают, но не ограничиваются ими, вспомогательный вирус SAdV-13 и вспомогательный вирус, сходный с SAdV-13, описанный в публикации US20110201088 (содержание которой включено в настоящую заявку посредством ссылки), вспомогательные векторы rHELP (Applied Viromics). Специалист в данной области техники поймет, что любой вспомогательный вирус или вспомогательная плаزمида AAV, которая может обеспечить надлежащую вспомогательную функцию для AAV, могут быть использованы согласно настоящему изобретению.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гены сар AAV присутствуют в плазмиде. Плаزمида может дополнительно содержать ген гер AAV. Гены сар и/или ген гер из любого серотипа AAV (включая, но не ограничиваясь ими, AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV rh.74 и любые их варианты) могут быть использованы согласно настоящему изобретению для получения рекомбинантного AAV. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гены сар AAV кодируют капсид из серотипа 1, серотипа 2, серотипа 4, серотипа 5, серотипа 6, серотипа 7, серотипа 8, серотипа 9, серотипа 10, серотипа 11, серотипа 12, серотипа 13 или их варианта.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка насекомого или млекопитающего может быть трансфицирована вспомогательной плазмидой или вспомогательным вирусом, вирусной конструкцией и плазмидой, кодирующей гены сар AAV; и рекомбинантный вирус AAV может быть собран в различные моменты времени после совместной трансфекции. Например, рекомбинантный вирус AAV может быть собран через приблизительно 12 часов, приблизительно 24 часа, приблизительно 36 часов, приблизительно 48 часов, приблизительно 72 часа, приблизительно 96 часов, приблизительно 120 часов или в любой момент времени в период между любыми из двух указанных временных точек после совместной трансфекции.

Рекомбинантный AAV также может быть получен с использованием любых стандартных способов, известных в данной области техники, подходящих для получения инфекционного рекомбинантного AAV. В некоторых случаях рекомбинантный AAV может быть получен с использованием клетки насекомого или млекопитающего, которая стабильно экспрессирует некоторые из необходимых компонентов для получения частиц AAV. Например, в геном клетки может быть интегрирована плазмида (или несколько плазмид), содержащая гены гер и сар AAV, и селективный маркер, такой как ген устойчивости к неомицину. Клетка насекомого или млекопитающего затем может быть совместно инфицирована вспомогательным вирусом (например, аденовирусом или бакуловирусом, обеспечивающим вспомогательные функции), и вирусным вектором, содержащим 5'-концевые и 3'-концевые ITR AAV (и нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок, если необходимо). Преимущества указанного способа заключаются в том, что клетки могут быть отобраны и пригодны для крупномасштабного производства рекомбинантного AAV. В качестве еще одного неограничивающего примера, аденовирус или бакуловирус, а не плазмиды, могут быть использованы, чтобы ввести гены гер и сар в упаковывающие клетки. В качестве еще одного неограничивающего примера, вирусный вектор, содержащий 5'-концевые

и 3'-концевые LTR AAV, и гены гер-сар могут быть стабильно интегрированы в ДНК вырабатывающих клеток, и вспомогательные функции могут быть обеспечены аденовирусом дикого типа для получения рекомбинантного AAV.

Способ создания упаковывающей клетки заключается в создании линии клеток, которые стабильно экспрессируют все необходимые компоненты для получения частиц AAV. Например, плазмиду (или несколько плазмид), содержащую геном gAAV, лишенный генов гер и сар AAV, гены гер и сар AAV, отделенные от генома gAAV, и селективный маркер, такой как ген устойчивости к неомицину, интегрируют в геном клетки. Геномы AAV были введены в бактериальные плазмиды с помощью таких процедур как присоединение GC (Samulski et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:2077-2081), добавление синтетических линкеров, содержащих сайты расщепления эндонуклеазами (Laughlin et al., 1983, Gene, 23:65-73) или с помощью прямого лигирования тупых концов (Senapathy & Carter, 1984, J. Biol. Chem., 259:4661-4666). Линию упаковывающих клеток затем инфицируют вспомогательным вирусом, таким как аденовирус. Преимущества указанного способа заключаются в том, что клетки могут быть отобраны и подходят для крупномасштабного получения gAAV. Другие примеры подходящих способов основаны на применении аденовируса или бакуловируса, а не плазмиды, для введения геномов gAAV и/или генов гер и сар в упаковывающие клетки.

Общие принципы получения gAAV рассмотрены, например, в Carter, 1992, Current Opinions in Biotechnology, 1533-539; и Muzyczka, 1992, Curr. Topics in Microbial. and Immunol., 158:97-129). Различные подходы описаны в Ratschin et al., Mol. Cell. Biol. 4:2072 (1984); Hermonat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6466 (1984); Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5:3251 (1985); McLaughlin et al., J. Virol., 62:1963 (1988); и Lebkowski et al., 1988 Mol. Cell. Biol., 7:349 (1988). Samulski et al. (1989, J. Virol., 63:3822-3828); патенте США №5173414; WO 95/13365 и соответствующем патенте США №5655876; WO 95/13392; WO 96/17947; PCT/US98/18600; WO 97/09441 (PCT/US96/14423); WO 97/08298 (PCT/US96/13872); WO 97/21825 (PCT/US96/20777); WO 97/06243 (PCT/FR96/01064); WO 99/11764; Perrin et al. (1995) Vaccine 13:1244-1250; Paul et al. (1993) Human Gene Therapy 4:609-615; Clark et al. (1996) Gene Therapy 3:1124-1132; патенте США №5786211; патенте США №5871882; и патенте США №6258595. Вышеупомянутые документы полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки, причем особое внимание уделено разделам документов, относящимся к получению gAAV.

Следовательно, согласно настоящему изобретению предложены упаковывающие клетки, которые вырабатывают инфекционный gAAV. Согласно одному варианту реализации упаковывающие клетки могут представлять собой стабильно трансформированные раковые клетки, такие как клетки линии HeLa, клетки линии HEK293 и клетки линии PerC.6 (линия, родственная 293). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения упаковывающие клетки представляют собой клетки, которые не являются трансформированными раковыми клетками, такими как клетки HEK293 на ранних этапах пассирования (клетки мезонефроса человека, трансформированные E1 аденовируса), клетки MRC-5 (фетальные фибробласты человека), клетки WI-38 (фетальные фибробласты человека), клетки Vero (клетки почек обезьян) и клетки FRhL-2 (фетальные клетки легких макака-резусов).

gAAV может быть очищен с помощью способов, стандартных в данной области техники, таких как колоночная хроматография или градиенты хлорида цезия. Способы очистки векторов gAAV от вспомогательного вируса известны в данной области техники и включают способы, описанные, например, в Clark et al., Hum. Gene Ther., 10(6): 1031-1039 (1999); Schenpp and Clark, Methods Mol. Med., 69 427-443 (2002); патенте США №6566118 и WO 98/09657.

Типы клеток, используемые в получении AAV

Вирусные частицы, содержащие AAV-векторы согласно настоящему изобретению, могут быть введены с использованием любого типа клеток беспозвоночных, которые позволяют получать AAV или биологические продукты и которые можно поддерживать в культуре. Например, используемая линия клеток насекомых может быть получена из *Spodoptera frugiperda*, например, SF9, SF21, SF900+, линий клеток дрозофилы, линий клеток москитов, например, линии клеток, полученные из *Aedes albopictus*, линий клеток домашнего шелкопряда, например, линии клеток *Bombux mori*, линий клеток *Trichoplusia ni*, таких как клетки High Five, или линий клеток *Lepidoptera*, таких как линии клеток *Ascalapha odorata*. Предпочтительными клетками насекомых являются клетки из видов насекомых, которые восприимчивы к бакуловирусной инфекции, включая High Five, Sf9, Se301, SeIZD2109, SeUCR1, Sf9, Sf900+, Sf21, B1-TN-5B1-4, MG-1, Tn368, HzAm1, BM-N, Na2302, Hz2E5 и Ao38.

Бакуловирусы представляют собой покрытые оболочкой ДНК-вирусы членистоногих, два из которых являются хорошо известными векторами экспрессии для получения рекомбинантных белков в клеточных культурах. Бакуловирусы имеют кольцевые двухцепочечные геномы (80-200 т.п.н.), которые могут быть модифицированы так, чтобы обеспечить доставку большого фрагмента генома в конкретные клетки. Вирусы, используемые в качестве вектора, обычно представляют собой многокапсидный нуклеополиэдровирус *Autographa californica* (AcMNPV) или *Bombux mori* (Bm NPV) (Kato et al., 2010).

Бакуловирусы обычно используют для инфицирования клеток насекомых, чтобы экспрессировать рекомбинантные белки. В частности, экспрессию гетерологичных генов у насекомых можно осуществлять, как описано, например, в патенте США №4745051; Friesen et al (1986); EP 127,839; EP 155,476; Vlax

et al (1988); Miller et al (1988); Carbonell et al (1988); Maeda et al (1985); Lebacqz-Verheyden et al (1988); Smith et al (1985); Miyajima et al (1987); и Martin et al (1988). Многочисленные штаммы и варианты бакуловирусов и соответствующие чувствительные клетки-хозяева насекомых, которые могут быть использованы для получения белка, описаны в Luckow et al (1988), Miller et al (1986); Maeda et al (1985) и McKenna (1989).

Согласно другому аспекту настоящего изобретения способы согласно настоящему изобретению также осуществляют с использованием любого типа клеток млекопитающих, которые обеспечивают репликацию AAV или выработку биологических продуктов и которые можно поддерживать в культуре. Предпочтительные клетки млекопитающих могут представлять собой клетки линий HEK293, HeLa, CHO, NS0, SP2/0, PER.C6, Vero, RD, BHK, HT 1080, A549, Cos-7, ARPE-19 и MRC-5.

#### Композиции

Согласно другому варианту реализации в область настоящего изобретения включены композиции, содержащие гAAV и/или антиоксиданты согласно настоящему изобретению. Указанные композиции можно применять для регенерации, усиления или восстановления мышц и/или улучшения функции мышц.

Композиции согласно настоящему изобретению содержат гAAV в фармацевтически приемлемом носителе. Композиции также могут содержать другие ингредиенты, такие как разбавители и адъюванты. Приемлемые носители, разбавители и адъюванты являются нетоксичными для реципиентов и предпочтительно являются инертными в используемых дозировках и концентрациях и включают буферы, такие как фосфат, цитрат или другие органические кислоты; антиоксиданты; низкомолекулярные полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как Твин, плуроновые кислоты или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

В область настоящего изобретения включены способы трансдукции клетки-мишени с использованием гAAV, в условиях *in vivo* или в условиях *in vitro*. Способы в условиях *in vivo* включают этап введения эффективной дозы, или нескольких эффективных доз, композиции, содержащей гAAV, согласно настоящему изобретению животному (включая пациента-человека), нуждающемуся в этом. Эффективная доза, или несколько эффективных доз, комбинации композиций, содержащих гAAV, согласно настоящему изобретению для субъекта представляет собой дозу, которая предотвращает, замедляет прогрессирование или улучшает (устраняет или снижает) мышечную патологию, связанную с заболеванием, которое лечат. Влияние на мышечную патологию может быть продемонстрировано на основании улучшения одного или более показателей, стандартных в данной области техники, таких как: абсолютная удельная сила мышц; декремент силы при эксцентрических сокращениях мышц; уровень СК в сыворотке крови; уровень тропонина в сыворотке крови; уровень ММР9 в сыворотке крови; сила сцепления; вращение конечности; подвижность или гибкость конечности; ходьба; ходьба в течение 6 минут; сила сгибателя или разгибателя колена; максимальное произвольное изометрическое сокращение мышц; показатели амбулаторного обследования "Северная Звезда"; мышечная масса, уменьшение количества жира или отека, согласно показателям T2-взвешенных снимков МРТ; мышечные контрактуры; угол сустава конечности; сердечная функция (пульс, сердечный выброс, фракция укорочения в процентах, систолический объем); дыхание (включая частоту дыхания, оксигенацию крови, потребность в дополнительном кислороде); некроз мышц; регенерация мышц; атрофия мышц; воспаление мышц; кальцификация мышц; мышечная центральная нуклеация; размер мышц или размер мышечных волокон; продолжительность жизни; и экспрессия суррогатного белка дистрофина или ламинина альфа 2 (утрофин, плектин 1, ламинин альфа 5, агрин). См., например, Forbes et al., *Radiology*, 269(1): 198-207 (2013); Govoni et al., *Cell Mol. Life Sci.*, 70(23): 4585-4602 (2013); и Chandrasekharan and Martin, *Methods Enzymol.*, 479: 291-322 (2010). Если дозу вводят до развития заболевания, введение является профилактическим. Если дозу вводят после развития заболевания, введение является терапевтическим. Следовательно, лечение субъекта с помощью способов, описанных в настоящем документе, предназначено для предотвращения, замедления или предотвращения прогрессирования, уменьшения интенсивности, обеспечения ремиссии (частичной или полной) и/или продления выживания для заболевания, которое лечат.

В область настоящего изобретения также включены способы комбинированной терапии. Комбинированная терапия, используемая согласно настоящему изобретению, включает одновременное лечение и последовательное лечение. Комбинации способов согласно настоящему изобретению со стандартными медицинскими препаратами (например, кортикостероидами для лечения мышечных дистрофий) конкретно включены в область настоящего изобретения, также как и комбинации с новыми способами терапии. В этом отношении возможной является индукция экспрессии ANO5, чтобы уменьшить или ингибировать повреждение мышц, чтобы усилить мышцу или индуцировать восстановление мышц, и затем обеспечить дополнительное лечение. Подходящие дополнительные способы лечения мышечной дистрофии могут включать использование антиоксидантов (например, липоевой кислоты, кофермента Q10 и  $\alpha$ -

токоферола), IGF-1, подходы на основе интерферирующих РНК, пропуск экзона, ингибирование калпаина, активацию дистрофина и экспрессию дистрогликана. Помимо этого можно использовать добавки к экспрессии ANO5, чтобы увеличить эффект усиления мышц. Например, можно добавлять IGF-1 или другие трофические факторы или инъекции клеток-предшественников мышц.

Доза гAAV, которая будет введена в способах, описанных в настоящем документе, будет варьироваться в зависимости, например, от конкретного гAAV, способа введения, цели лечения, индивидуума и типа (типов) клетки-мишени, и может быть определена с помощью способов, известных в данной области техники. Титры каждого введенного гAAV могут варьироваться от 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  $1 \times 10^{13}$ , приблизительно  $1 \times 10^{14}$  и до приблизительно  $1 \times 10^{15}$  или более ДНКаз-резистентных частиц (DRP) на 1 мл. Дозировки также могут быть выражены в единицах вирусных геномов (в.г.) (т.е.  $1 \times 10^7$  в.г.,  $1 \times 10^8$  в.г.,  $1 \times 10^9$  в.г.,  $1 \times 10^{10}$  в.г.,  $1 \times 10^{11}$  в.г.,  $1 \times 10^{12}$  в.г.,  $1 \times 10^{13}$  в.г.,  $1 \times 10^{14}$  в.г.,  $1 \times 10^{15}$  в.г., соответственно). Способы титрования AAV описаны в Clark et al., Hum. Gene Ther., 10: 1031-1039 (1999).

Введение эффективной дозы композиций можно осуществлять с помощью стандартных путей введения, включая, но не ограничиваясь ими, внутримышечный, парентеральный, внутривенный, пероральный, буккальный, назальный, легочной, внутричерепной, внутрикостный, внутриглазной, ректальный или вагинальный путь введения. Путь (пути) введения и серотип (серотипы) компонентов AAV в гAAV (в частности, ITR AAV и белок капсида) согласно настоящему изобретению могут быть выбраны и/или подобраны специалистами в данной области техники с учетом патологического состояния, которое лечат, и целевой клетки/ткани (тканей), которые должны экспрессировать белок ANO5. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения путь представляет собой одну или более внутримышечных инъекций в четырехглавую мышцу пациента. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения путь представляет собой одну или более внутримышечных инъекций в каждую из трех основных групп мышц четырехглавой мышцы пациента.

В частности, фактическое введение гAAV согласно настоящему изобретению может быть выполнено с использованием любого физического способа, который будет переносить рекомбинантный вектор гAAV в ткань-мишень животного. Введение в соответствии с настоящим изобретением включает, но не ограничивается ими, инъекцию в мышцу, кровоток и/или непосредственно в печень. Было показано, что простое ресуспендирование гAAV в забуференном фосфатом физиологическом растворе является достаточным для того чтобы обеспечить носитель, подходящий для экспрессии в мышечной ткани, при этом отсутствуют какие-либо известные ограничения в отношении носителей или других компонентов, которые могут быть введены совместно с гAAV (однако, как правило, при введении гAAV следует избегать использования композиций, которые разрушают ДНК). Капсидные белки гAAV могут быть модифицированы так, чтобы гAAV был нацелен к конкретной ткани-мишени, представляющей интерес, такой как мышца. См., например, WO 02/053703, содержание указанного документа включено в настоящую заявку посредством ссылки. Фармацевтические композиции могут быть получены в виде составов для инъекций или в виде составов для местного введения, которые должны быть доставлены в мышцы с помощью трансдермального транспорта. Многочисленные составы для внутримышечной инъекции и трансдермального транспорта были разработаны ранее и могут быть использованы при осуществлении настоящего изобретения. гAAV можно использовать с любым фармацевтически приемлемым носителем для удобства введения и манипуляций.

Для внутримышечной инъекции могут быть использованы растворы в адьюванте, таком как кунжутное или арахисовое масло, или в водном растворе пропиленгликоля, а также стерильные водные растворы. При необходимости указанные водные растворы могут быть забуферены, и жидкий разбавитель сначала делают изотоническим с помощью солевого раствора или глюкозы. Растворы гAAV в виде свободной кислоты (ДНК содержит кислые фосфатные группы) или фармакологически приемлемой соли могут быть получены в воде, подходящим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсия гAAV также может быть получена в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, а также в маслах. При обычных условиях хранения и использования указанные препараты содержат консервант, чтобы предотвратить размножение микроорганизмов. В этой связи, применяемые стерильные водные среды могут быть легко получены с помощью стандартных методов, хорошо известных специалистам в данной области техники.

Фармацевтические формы, пригодные для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Во всех случаях форма должна быть стерильной и должна быть текучей в той степени, чтобы обеспечить прохождение через иглу. Форма должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть устойчива к загрязнению микроорганизмами, такими как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), их подходящие смеси и растительные масла. Надлежащую текучесть можно поддерживать,



например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Влияние микроорганизмов может быть предотвращено с помощью различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, тимеросала и т.п. Во многих случаях предпочтительным является включение изотонических агентов, например, сахаров или хлорида натрия. Пролонгированное всасывание композиций для инъекций может быть достигнуто за счет использования агентов, замедляющих всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные растворы для инъекций получают путем включения гAAV в необходимом количестве в соответствующий растворитель совместно с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, при необходимости с последующей стерилизацией путем фильтрации. Обычно дисперсии получают путем включения стерилизованного активного ингредиента в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и методика сублимационной сушки, которые позволяют получить порошок активного ингредиента с любым дополнительным желательным ингредиентом из его раствора, стерилизованного путем фильтрования ранее.

Трансдукцию с применением гAAV также можно осуществлять в условиях *in vitro*. Согласно одному варианту реализации желательные мышечные клетки-мишени субъекта выделяют, трансдуцируют гAAV и повторно вводят указанному субъекту. В другом варианте можно применять сингенные или ксеногенные мышечные клетки, если указанные клетки не будут вызывать неприемлемый иммунный ответ у субъекта.

Подходящие способы трансдукции и повторного введения трансдуцированных клеток субъекту известны в данной области техники. Согласно одному варианту реализации клетки могут быть трансдуцированы в условиях *in vitro* путем комбинирования гAAV с мышечными клетками, например, в соответствующих средах, и проведения скрининга для выявления клеток, несущих ДНК, представляющую интерес, с использованием стандартных методик, таких как Саузерн-блоттинг и/или ПЦР, или с использованием селективных маркеров. Затем трансдуцированные клетки могут быть изготовлены в виде фармацевтических композиций, и указанная композиция может быть введена субъекту с помощью различных методик, таких как внутримышечная, внутривенная, подкожная и внутрибрюшинная инъекция, или путем инъекции в гладкую мышцу и сердечную мышцу, используя, например, катетер.

Трансдукция клеток с применением гAAV согласно настоящему изобретению приводит к устойчивой экспрессии белка ANO5. Следовательно, согласно настоящему изобретению предложены способы введения/доставки гAAV, которые экспрессируют ANO5, животному, предпочтительно человеку. Подходящие способы включают трансдукцию тканей (включая, но не ограничиваясь ими, ткани, такие как мышцы, органы, такие как печень и мозг, и железы, такие как слюнные железы) с применением одного или более гAAV согласно настоящему изобретению. Трансдукцию можно осуществлять с помощью генных кассет, содержащих специфичные для ткани регуляторные элементы. Например, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложены способы трансдукции мышечных клеток и мышечных тканей, направленные с помощью специфичных для мышц регуляторных элементов, включая, но не ограничиваясь ими, те, которые получены из семейств генов актина и миозина, например, из семейства генов *myoD* [См. Weintraub et al., *Science*, 251: 761-766 (1991)], фактор, связывающийся с энхансером, специфичным для миоцитов, MEF-2 [Cserjesi and Olson, *Mol Cell Biol* 11: 4854-4862 (1991)], регуляторные элементы, полученные из гена актина скелетных мышц человека [Muscat et al., *Mol Cell Biol*, 7: 4089-4099 (1987)], гена актина сердечной мышцы, элементы последовательности креатинкиназы мышц [см. Johnson et al., *Mol Cell Biol*, 9:3393-3399 (1989)] и элемент энхансера креатинкиназы мышцы (mCK), такой как MCK7 или tMCK, который представляет собой тройную копию mCK мышцы, регуляторные элементы, полученные из гена тропонина С быстро сокращающихся скелетных мышц, гена тропонина С медленно сокращающихся сердечных мышц и гена тропонина I медленно сокращающихся мышц, индуцируемые гипоксией ядерные факторы (Semenza et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 5680-5684 (1991)), индуцируемые стероидами элементы и промоторы, включая глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE) [см. Mader and White, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5603-5607 (1993)], а также другие регуляторные элементы.

Мышечная ткань является привлекательной мишенью для доставки генов в условиях *in vivo* и генной терапии, поскольку она не является жизненно важным органом и легко доступна. В область настоящего изобретения включена устойчивая экспрессия биологически активных белков ANO5 из трансдуцированных мышечных волокон.

Под термином "мышечная клетка" или "мышечная ткань" понимают клетку или группу клеток, полученных из мышцы любого вида (например, скелетной мышцы и гладкой мышцы, например, из пищеварительного тракта, мочевого пузыря, кровеносных сосудов или ткани сердца). Указанные мышечные клетки могут быть дифференцированными или недифференцированными, такими как миоциты, миотрубочки, кардиомиоциты и кардиомиоциты. Поскольку мышечная ткань легко доступна для системы кровообращения, то белок, вырабатываемый и секретируемый мышечными клетками и тканью в

условиях *in vivo*, следовательно, попадает в кровоток для системной доставки, обеспечивая тем самым устойчивые терапевтические уровни секреции белка из мышцы.

Термин "трансдукция" используется для обозначения введения/доставки ДНК ANO5 в клетку-реципиент в условиях *in vivo* или в условиях *in vitro* посредством дефицитного по репликации гAAV согласно настоящему изобретению, что приводит к экспрессии функционального белка ANO5 клеткой-реципиентом.

#### Композиции антиоксидантов

Выработка активных форм кислорода во время сокращения скелетных мышц хорошо доказана. Во время продолжительной физической нагрузки повышенные количества указанных окислителей вызывают повреждение белков и липидов и приводят к активации множества сигнальных путей ответа на стресс (Powers et al., *Free Radic Biol Med* 51: 942-50 (2011)). Следовательно, в нескольких исследованиях было изучено использование добавки антиоксидантов в течение длительного времени в качестве средства облегчения окислительного стресса в скелетных мышцах. В одном недавнем исследовании сообщалось, что состав из трех антиоксидантов (витамин E,  $\alpha$ -липовая кислота и кофермент Q10), добавленный к рациону самок мышей, улучшил результативность бега, а также маркеры митохондриальной функции (Abadi et al., *PLoS One*. 8:e60722 (2013)). Однако в других исследованиях сообщалось, что аналогично модифицированный рацион (витамин E+ $\alpha$ -липовая кислота) приводил к снижению митохондриального биогенеза у крыс (Strobel et al., *Med Sci Sports Exerc.* 43:1017-24 (2011)). В настоящее время в данной области техники отсутствует единое мнение относительно влияния добавки антиоксидантов в течение длительного времени на здоровье скелетных мышц, и очень мало внимания уделялось мышцам, ослабленным заболеванием. Однако в настоящем изобретении представлены доказательства того, что антиоксидантная диета оказывает благотворное влияние на скелетную мышцу мышей  $\text{Apo5}^{-/-}$ .

#### Антиоксиданты

Согласно настоящему изобретению предложено введение композиции антиоксидантов для улучшения физиологии и функции мышц у субъекта, страдающего мышечной дистрофией. В композиции антиоксидантов, описанной в настоящем документе, применяется по меньшей мере один антиоксидант. Помимо этого согласно настоящему изобретению предложены композиции антиоксидантов (антиоксидантные композиции), которые содержат по меньшей мере два или по меньшей мере три антиоксиданта, и в указанных композициях антиоксиданты будут иметь разные клеточные функции. Предпочтительными антиоксидантами являются те, которые, как было показано, специфично обращают повреждение митохондрий в результате старения. Например, согласно настоящему изобретению предложены композиции антиоксидантов, содержащие по меньшей мере один из кофермента Q10,  $\alpha$ -липовой кислоты, каротиноидов ( $\alpha$ -каротин,  $\beta$ -каротин, ликопин, лютеин, астаксантин, кантаксантин и зеаксантин), витаминов, таких как витамин A (ретинол, 3,4-дидегидроретинол и 3-гидроксиретинол), витамина C (аскорбиновая кислота) и витамина E ( $\alpha$ -токоферол), кофакторов витаминов, полифенолов и флавоноидов (ресвератол, гингерол, куркумин) или минералов (железо, магний, селен, цинк, марганец, йодид).

Согласно предпочтительным вариантам реализации указанные антиоксиданты включают кофермент Q10, витамин E,  $\alpha$ -липоевую кислоту.

Кофермент Q10, также известный как Q10, витамин Q10, убихинон, убидекаренон или кофермент Q, представляет собой жирорастворимое вещество. Кофермент Q10 представляет собой соединение, участвующее в переносе электронов, которое является особенно важным для цепи переноса электронов (ETC). ETC управляет синтезом АТФ, который является жизненно важным источником энергии для клетки. Витамин E, также известный как  $\alpha$ -токоферол, является важным компонентом мембран (включая мембраны митохондрий) и удаляет свободные радикалы липидов.

$\alpha$ -Липоевая кислота, также известная как тиоктовая кислота, представляет собой сероорганическое соединение, полученное из октановой кислоты, которая является важным кофактором для митохондриальных дегидрогеназ, таких как пируватдегидрогеназа, для правильного функционирования цикла Кребса, что в конечном итоге приводит к синтезу АТФ.  $\alpha$ -Липоевая кислота также непосредственно влияет на скелетные мышцы, активируя AMPK, сенсор энергии в клетке, который регулирует митохондриальный биогенез посредством PGC1 $\alpha$ .

Полифенолы включают феноловую кислоту и флавоноиды. Например, феноловые кислоты включают протокатеховую кислоту, галловую кислоту, гидроксибензойную кислоту, гидроксикоричную кислоту, например, кофейную кислоту, хлорогеновую кислоту, кумаровую кислоту, феруловую кислоту, синаповую кислоту, антоцианины, такие как цианидин, пеларгонидин, пеонидин, дельфинидин и мальвидин. Примеры флавоноидов включают флавонолы, такие как кверцетин, кемпферол, мирицетин, флавоны, такие как апигенин и лютеолин, флавононы, такие как гесперетин, нарингенин и эридиктиол, изофлавоны, такие как даидзеин, генистеин и глицитеин, и мономерные флавонолы, такие как катехин и эпикатехин.

#### Введение и дозировка

Согласно настоящему изобретению предложены материалы и способы лечения мышечной дистрофии и хронической мышечной атрофии с использованием по меньшей мере одного антиоксиданта. При-

мерные композиции и способы лечения мышечной дистрофии включают введение по меньшей мере одного антиоксиданта или введение по меньшей мере двух антиоксидантов, или введение по меньшей мере трех антиоксидантов. Например, согласно настоящему изобретению предложены композиции антиоксидантов, содержащие  $\alpha$ -липоевую кислоту, кофермент Q10 и  $\alpha$ -токоферол (также известный как витамин E). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения композиция антиоксидантов, описанная в настоящем документе, может быть введена отдельно или в комбинации с AAV-векторами, содержащими нуклеотидную последовательность, кодирующую белок ANO5 или его функционально активный фрагмент.

Способы согласно настоящему изобретению осуществляют с использованием любых средств, приемлемых с медицинской точки зрения, для непосредственного или косвенного введения агентов субъекту-млекопитающему, включая, но не ограничиваясь ими, инъекции, пероральный прием, интраназальное, местное, трансдермальное, парентеральное введение, введение с помощью ингаляционного спрея, вагинальное или ректальное введение. В настоящей заявке термин "парентеральный" включает подкожные, внутривенные, внутримышечные и интрацестеральные инъекции, а также методики введения с помощью катетера или инфузии. В область настоящего изобретения также включено введение путем внутрикожной, внутривагинальной, интратекальной, ретробульбарной, внутрилегочной инъекции и/или хирургической имплантации в конкретном месте.

Согласно одному варианту реализации введение осуществляют в пораженную ткань (например, мышцу), нуждающуюся в лечении, путем прямой инъекции в конкретное место или с помощью механизма с замедленной доставкой или с замедленным высвобождением, который может обеспечить доставку состава внутрь организма. Например, биоразлагаемые микросферы или капсулы или другие биоразлагаемые полимерные конфигурации, способные к замедленной доставке композиции (например, растворимого полипептида, антитела или малой молекулы), могут быть включены в составы согласно настоящему изобретению, имплантированные в пораженную ткань или вблизи нее.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения совместное введение антиоксидантов и AAV-векторов, содержащих ANO5, не требует одновременного введения агентов или введения с помощью аналогичного пути, при условии, что периоды времени, в течение которых агенты оказывают свое терапевтическое действие, перекрываются. В область настоящего изобретения включено одновременное или последовательное введение, а также введение в разные дни или недели.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения композиции антиоксидантов и/или AAV-векторов также могут быть доставлены пациенту в нескольких местах. Несколько введений можно осуществлять одновременно или в течение определенного периода времени. В некоторых случаях непрерывный поток терапевтической композиции является благоприятным. Дополнительную терапию можно вводить в течение определенных периодов, например, ежедневно, через день, два раза в неделю, три раза в неделю, еженедельно, каждые 2 недели, каждые 3 недели, ежемесячно или в течение более длительного периода.

В область настоящего изобретения включено одновременное введение агентов согласно настоящему изобретению в одном составе. В область настоящего изобретения также включено введение агентов в различных составах и совместное введение, при этом совместное введение относится к агентам, вводимым с интервалом в 30 минут.

Соответственно, согласно настоящему изобретению предложены способы введения пациенту, нуждающемуся в этом, эффективной дозы (или доз, вводимых по существу одновременно, или доз, вводимых с определенными интервалами) gAAV, которые кодируют, например, ANO5, и/или антиоксидантов.

Количество антиоксидантов в композициях в конкретной дозировке может варьироваться в зависимости от размера индивидуума, которому вводят терапию, а также характеристик расстройства, которое лечат. В примерных способах лечения может потребоваться применение антиоксидантной диеты, содержащей приблизительно 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1,0% липоевой кислоты, приблизительно 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1,0% кофермента Q10 и приблизительно 10, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 ME  $\alpha$ -токоферола или витамина E. Указанные концентрации можно вводить в виде единичной стандартной лекарственной формы или в виде нескольких доз. Стандартные исследования зависимости ответа от дозы, проведенные сначала на моделях у животных и затем в клинических условиях, выявили оптимальные дозировки для конкретных патологических состояний и популяций пациентов.

Также будет очевидно, что дозирование может быть модифицировано, если стандартные терапевтические средства вводят в комбинации с терапевтическими средствами согласно настоящему изобретению.

### Примеры

#### Пример 1

Выведение и создание мышечной модели  $Ano5^{-/-}$

Модель с подавленным геном  $Ano5$  создавали с использованием вектора, нацеленного к  $Ano5$  от экзона 8 до экзона 9, чтобы получить укороченный транскрипт, как показано на фиг. 1a. Нацеленную кон-

струкцию разрабатывали как условную готовую конструкцию "knock-out first" так, что нулевой аллель создавали путем сплайсинга с элементом для обнаружения, lacZ, как описано Tesla et al. (Genesis 38, 151-158 (2004)). Нацеленный вектор Apo5:tm1a (KOMP)Wtsi, содержащий указанный lacZ-меченый мутантный аллель, получали из хранилища UC Davis KOMP (PG00097\_Z\_1\_G0; Karnes. Nature 474, 337-342 (2011)). Кассету для нацеливания вставляли после экзона 8, при этом фланкирующие сайты FRT и loxP присутствовали, чтобы создать условный аллель, если была отмечена эмбриональная летальность.

После нацеливания и переноса эмбриональных стволовых клеток генотипы подтверждали с помощью геномной ПЦР (фиг. 1b). Клоны подвергали скринингу с помощью ОТ-ПЦР с использованием следующих наборов праймеров, охватывающих экзоны 1-6 (e1-6) или экзоны 17-20 (e17-20), которые формировали ампликон, содержащий 300 п.н., с эндогенного локуса Apo5 и ампликон, содержащий 200 п.н., с локуса вставки кассеты Apo5, как показано на фиг. 1c:

генотипирование F 5'-AGTCCTTTTCAGCACAGTCTTTG-3' (SEQ ID NO: 3) генотипирование R 5'-TGAGGCAGTGTGGAGTGAGTA- 3' (SEQ ID NO: 4) DF38700 5'-GCCAATCATATGGTCTCAGT-3' (SEQ ID NO: 5) LR-loxP R 5'-ACTGATGGCGAGCTCAGACC-3' (SEQ ID NO: 6) Успешно нацеленные эмбриональные стволовые клетки затем инъецировали в бластоцисты мышей линии C57BL/6, и эмбрионы переносили для получения химер для передачи зародышевой линии. Трансгенных гетерозиготных животных проверяли с помощью генотипирования и скрещивали четыре раза с мышами C57BL/6 дикого типа, перед селекцией для получения гомозиготности. Ядра линий животных Apo5<sup>-/-</sup> и C57BL/6 разводили и поддерживали как гомозиготных животных в стандартизованных условиях в виварии в RINCH. Колонии поддерживали на рационе для грызунов Teklad Global (корм, содержащий 3,8% волокон, 18,8% белка, 5% жиров) с циклом свет/тьма 12:12 ч.

Количественную ПЦР проводили и анализировали с помощью системы Fast Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific). Реакции проводили с использованием коктейлей праймер-краситель FAM (Applied Biosystems) для Apo5 (Mm00 62 4 62 9\_m1, Mm01335981\_m1), Apo6 (Mm00614693\_m1) и Gapdh (Mm99999915\_g1), в трех повторах для каждого образца. Способ  $\Delta\Delta C_t$  использовали для расчета нормированного относительного снижения уровня мРНК Apo5 и Apo6 в мышцах Apo5<sup>-/-</sup> по сравнению с диким типом. Общую РНК выделяли из срезов свежзамороженной мышцы с использованием тризола (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния, США), согласно протоколу производителя. РНК затем очищали на колонке с использованием способа RNeasy (Qiagen, Валенсия, Калифорния, США) и количество определяли методом спектрофотометрии с использованием NanoDropLite (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). кДНК получали с помощью высокопроизводительного набора для обратной транскрипции кДНК (Thermo Fisher Scientific) с использованием эквивалентных количеств образца РНК на реакцию (200-500 нг). Для полуколичественной ПЦР равные объемы кДНК подвергали 30 циклам ПЦР с последующим электрофорезом в агарозном геле. Использовали праймеры:

m $\beta$ Act-rt-5' CCTGGCCGTGTCAGGCAGAT (SEQ ID NO: 7) m $\beta$ Act-rt-3' GACATGGAGAA-GATCTGGCACC (SEQ ID NO: 8) mApo5-rt-F1

CCAACAGAAATGAGAACCT (SEQ ID NO: 9) mApo5-rt-R1

GACAGGGGTGGGTACTTTGG (SEQ ID NO: 10) mApo5-rt-F3

CGTTGGCAGCAAGATCAT (SEQ ID NO: 11) mApo5-rt-R3

GGGTACCTATAATCTCTGTACCTGC (SEQ ID NO: 12)

Результаты количественной ОТ-ПЦР выявили ~80% снижение уровня прекассетного транскрипта и снижение >99% посткассетного транскрипта ANO5 во всех испытанных мышцах (фиг. 1d). Не было отмечено эмбриональной летальности или проблем с размножением. Поскольку последовательность Apo5 значительно гомологична Apo6, и Apo6, как известно, экспрессируется в скелетных мышцах при некоторых условиях, ОТ-ПЦР проводили для измерения относительной экспрессии кДНК ANO6 мышц Apo5<sup>-/-</sup>. Результаты количественной ОТ-ПЦР выявили умеренное, но статистически недостоверное, повышение количества транскрипта Apo6 в дефицитных по Apo5 мышцах.

#### Пример 2

Клиническая и гистопатологическая оценка мышцы Apo5<sup>-/-</sup>. Мышь Apo5<sup>-/-</sup> проявляет многие особенности, характерные для ANO5-миопатии человека, включая повышенные уровни креатинкиназы сыворотки крови, изменчивую слабость разных мышц, измененный диаметр мышечных волокон и непереносимость физической нагрузки. У мышей Apo5<sup>-/-</sup> уровень креатинкиназы в сыворотке крови повышается приблизительно в 2 раза (фиг. 2a).

Оценки силы тетанического сокращения получали для разгибателя большого пальца (EDL) 10-месячных мышей (n=6 мышей на линию), передней большеберцовой мышцы (TA) 4-месячных мышей (n=5 мышей на линию) и мышц диафрагмы 10-месячных мышей Apo5<sup>-/-</sup> и мышей дикого типа (n=4 мыши на линию). EDL иссекали возле сухожилий и исследовали с использованием физиологического протокола для оценки функции, как описано ранее Rodino-Klapac et al. (J. Transl. Med. 5: 45, 2007) и Liu et al. (Mol. Ther. 11:245-256, 2005) с изменениями. Во время выполнения протокола для оценки эксцентрического сокращения процедуру 5% растяжения-повторного удлинения выполняли в течение 500-700 мс (5% растяжение в течение 100 мс с последующим возвращением к оптимальной длине в течение 100 мс).

После протокола для оценки тетанического и эксцентрического сокращения мышц подвергали эвтаназии и мышцы иссекали, взвешивали в увлажненном состоянии, закрепляли на патроне с использованием трагаканта, и затем замораживали в метилбутане, охлажденном в жидком азоте. Измерения силы в ТА выполняли, как описано Hakim et al. (J. Appl. Physiol. 110: 1656-1663, 2011) и Wein et al. (Nat. Med. 20:992-1000, 2014).

Для измерения силы диафрагмы мышц подвергали эвтаназии, и диафрагму иссекали, сохраняя интактными реберные связки и центральное сухожилие, и помещали в буфер Кребса-Хенселейта (КН), как описано ранее Beastrom et al. (Am. J. Pathol. 179: 2464-2474, 2011), Rafeal-Fortney et al. (Circ. 124: 582-588, 2011) и Grose et al. (Ann. Clin. Trans. Neurol. 1: 34-44, 2014). Выделяли срезы диафрагмы шириной 2-4 мм. Полоски диафрагмы прочно связывали плетеным хирургическим шелком (6/0, Surgical Specialties, Ридинг, Пенсильвания, США) в центральном сухожилии и сшивали через часть реберной кости, прикрепленной к дистальному концу полосы. Каждую мышцу переносили в водяную баню, наполненную насыщенным кислородом раствором КН, который поддерживали при 37°C. Мышцы выравнивали горизонтально и привязывали непосредственно между неподвижным штифтом и работающим в двух режимах преобразователем силы-серводвигателем (305C; Aurora Scientific, Аврора, Онтарио, Канада). Два платиновых пластинчатых электрода помещали в ванну с органом, чтобы фланкировать длину мышцы. Мышцу растягивали до оптимального натяжения 1 г и затем оставляли в покое на 10 минут до начала протокола тетанического сокращения. После стабилизации мышцу подвергали подготовительной стимуляции, состоящей из трех сокращений при 1 Гц каждые 30 секунд, за которыми следовали три сокращения при 150 Гц каждую минуту. После периода покоя в течение 3 мин диафрагму стимулировали при 20, 50, 80, 120, 150, 180 Гц с периодом покоя в течение 2 мин между каждым стимулом, каждый длительностью 250 мс, чтобы определить максимальную тетаническую силу. Измеряли длину и массу мышцы. Силу нормировали для массы и длины мышцы ( $CSA: \text{мышечная масса (мг)} / \{Lf \text{ (мм)} \times \text{плотность мышц (1,06 мг/мм}^3)\}$ ). Статистическую значимость оценивали с использованием непарного t-критерия Стьюдента для удельной силы и двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями для устойчивости к протоколу эксцентрического сокращения.

Удельная сила сокращения мышцы значительно уменьшилась на ~15% в диафрагме (фиг. 2b), однако по существу не изменилась в разгибателе большого пальца (EDL) и передней большеберцовой мышце (ТА) (фиг. 2c) мышцей  $Ano5^{-/-}$ . Такая изменчивость среди мышц характерна для миопатий, связанных с ANO5, а также наблюдалась при гистологическом анализе различных мышц. По сравнению с диким типом (WT) средний диаметр мышечного волокна был значительно меньше в икроножной мышце (GAS) у мышцей  $Ano5^{-/-}$  ( $Ano5^{-/-}$   $35,8 \pm 8,3$  мкм, WT:  $41,8 \pm 11,0$  мкм,  $P < 0,001$ ) и в меньшей степени в ТА мышце ( $Ano5^{-/-}$   $38,1 \pm 11,8$  мкм, WT:  $44,3 \pm 12,2$  мкм,  $P < 0,001$ ) (фиг. 2d,e). Мышцы  $Ano5^{-/-}$  проявили умеренную гистопатологию, включая центральные ядра и случайные некротические волокна (фиг. 2d,e).

Для оценки переносимости физической нагрузки мышцей  $Ano5^{-/-}$  и мышцей дикого типа, в возрасте 7,5 месяца в обеих группах, еженедельно подвергали физической нагрузке в течение 1 ч на протяжении 2 месяцев. Каждая мышца проходила исследование на результативность бега один раз в неделю при угле наклона беговой дорожки  $-10^\circ$  со скоростью 15 м/мин, которую увеличивали на 1 м каждую минуту до тех пор, пока не было достигнуто истощение ( $n=3$  мыши на линию). Каждый индивидуальный тест останавливали, когда мышца оставалась на электрошоковой пластине (Columbus Instruments) при электрическом стимуле, установленном на 20 В, более чем на 10 секунд без попытки продолжить физическое упражнение. Перерывы определяли как время, когда мыши переставали бежать и отдыхали до тех пор, пока беговая дорожка не возвращалась к электрошоковой пластине. В то время как контрольные мыши дикого типа бежали с постоянной скоростью без перерывов, мыши  $Ano5^{-/-}$  были склонны к частым перерывам на беговой дорожке (14 пауз/мин), где они переставали бежать до тех пор, пока беговая дорожка не возвращалась к электрошоковой пластине (фиг. 2f).

Электрофизиологическое исследование проводили на мышцах 6-8 месячных мышцей  $Ano5^{-/-}$  и контрольных мышцей, используя способы, аналогичные описанным в Arnold et al. (Ann. Clin. Trans. Neurol. 1:34-44, 2014). Мышцей анестезировали с использованием ингаляционного изофлурана и размещали в положении лежа на животе с задними конечностями, вытянутыми на  $45^\circ$  от тела животного. Амплитуды суммарных потенциалов действия мышцы (СМАР) измеряли от билатеральных трехглавых мышц голени после супрамаксимальной стимуляции седалищного нерва у мутированных ( $n=6$  животных, 12 задних конечностей) и контрольных ( $n=7$  животных, 14 задних конечностей) мышцей. Игловую электромиографию проводили в правой мышце GAS для оценки присутствия или отсутствия потенциалов фибрилляции. Локализованные измерения сопротивления, или миографию электрического сопротивления (EIM) выполняли в билатеральных мышцах GAS при частоте от 1000 Гц до 10 МГц с помощью системы Skulpt Inc EIM1103 (Сан-Франциско, Калифорния, США) с использованием способов, аналогичных тем, которые ранее были описаны в мышечных моделях амиотрофического бокового склероза и мышечной дистрофии (Li et al. PLoS One 8:e65976, 2013; Li et al. Muscle & Nerve 49: 829-835, 2014).

Вместо поверхностных электродов использовали неподвижную электродную матрицу с четырьмя изолированными электромиографическими игольчатыми электродами 26 калибра (Natus, Миддлетон,

Висконсин, США), расположенными на расстоянии 1 мм друг от друга. Электродную матрицу вставляли в брюшко билатеральных икроножных мышц в продольной конфигурации относительно направления мышечного волокна, и в каждой мышце измерения сопротивления проводили с двумя повторами и усредняли с получением одного значения в каждой конечности ( $n=6$  животных, 12 задних конечностей для каждой группы). Используя стандартные процедуры из ранее опубликованных исследований EIM и для упрощения, реактивность, сопротивление и фазу анализировали при двух значениях частоты тока 50 кГц и 100 кГц. Амплитуды СМАР и характеристики сопротивления сравнивали с использованием двухстороннего  $t$ -теста. Игольчатую электромиографию, регистрацию индуцированных суммарных потенциалов действия мышц, а также миографию электрического сопротивления проводили в задних конечностях мышей  $Ano5^{-/-}$  и мышей дикого типа, однако не было обнаружено значительных изменений, сходных с таковыми при заболевании человека (фиг. 3).

Другой характерной особенностью зависимой от ANO5 миопатии человека является присутствие чрезмерного количества мышечных волокон с внутримышечными отложениями. Диаметры поперечного сечения мышц определяли в мышцах ТА и икроножной мышце (GAS) 6-месячных мышей  $Ano5^{-/-}$  и мышей дикого типа ( $n=3$  мыши на линию). Мышцы нарезали на срезы и окрашивали гематоксилином и эозином (H&E). Четыре случайных изображения при 20-кратном увеличении на срез для каждого животного получали с помощью камеры Zeiss AxioCam MRC5. Диаметры волокон определяли путем измерения кратчайшего расстояния поперек мышечного волокна с помощью программного обеспечения Zeiss Axiovision LE4. Гистограммы распределения диаметров волокон получали в среднем от 500-600 волокон для ТА и 600-700 волокон для GAS. Непарный  $t$ -тест использовали для проверки статистической достоверности различий между размерами волокон  $Ano5^{-/-}$  и мышей дикого типа ( $****p < 0,0001$ ).

Агрегаты в мышцах определяли количественно. Срезы мышц ТА и GAS 10-месячных мышей  $Ano5^{-/-}$  и мышей дикого типа ( $n=3$  мыши на ткань и линию) окрашивали с помощью способа трехцветного окрашивания по Гомори. Получали четыре изображения при 20-кратном увеличении, количество волокон с одним или более агрегатами подсчитывали с использованием программного обеспечения ImageJ и выражали в процентах от общего количества волокон. Статистическую значимость различий между волокнами  $Ano5^{-/-}$  и дикого типа проверяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа, используя программное обеспечение GraphPad Prism ( $****p < 0,0001$ ).

Помимо этого окрашивание для выявления сукцинатдегидрогеназы (SDH) проводили на агрегатах и мышце: переднюю большеберцовую мышцу (ТА) и четырехглавую мышцу разрезали на 18 мкм срезы и окрашивали раствором для выявления SDH, состоящим из 0,2% нитросинего тетразолия (NBT), растворенного в 0,1 М янтарной кислоты и 0,1 М фосфатного буфера с pH 7,4, и инкубировали при 37°C в течение 3 часов. После инкубации срезы промывали водой и обезвоживали в последовательных разведениях спирта, затем очищали ксилолом. Изображения срезов получали с помощью камеры Zeiss AxioCam MRC5.

Сегменты мышцы ТА от 4- и 10-месячных мышей  $Ano5^{-/-}$  и контрольных мышей извлекали, растягивали до их длины в условиях *in situ* поперек деревянного шпателя и погружали в 3% глутаровый альдегид в 0,1 М фосфатном буфере с pH 7,0 на 4 часа. Мышцу нарезали на блоки ткани длиной 2 мм, хранили в 0,1 М фосфатном буфере с pH 7,4 в течение ночи, и затем после фиксации обрабатывали 1% тетраоксидом осмия в течение 2 ч и обезвоживали в растворах этанола различной концентрации до заливки пластиком. Поперечные срезы толщиной 1 мкм окрашивали толуидиновым синим, исследовали методом световой микроскопии, и срезы тканей из выбранных блоков исследовали под электронным микроскопом Hitachi H-7650 TEM с использованием камеры и программного обеспечения Advanced Microscopy Techniques.

В мышце мыши  $Ano5^{-/-}$  упомянутые структуры выглядят как четко определенные, нерегулярно очерченные области, окрашенные в красный цвет с помощью модифицированного трехцветного окрашивания, описанного в Pavlosicova et al. (Gen. Physiol. Biophysics 22: 425-440, 2003). Цитоплазматические агрегаты были очевидны уже с 9-месячного возраста и увеличивались с течением времени (фиг. 4а). Поскольку агрегаты сходного внешнего вида были отмечены у нормальных старых мышей, количество агрегатов определяли количественно. Приблизительно 25% волокон  $Ano5^{-/-}$  проявляли неправильно очерченные красные области при трехцветном окрашивании, в то время как  $<0,02\%$  контрольных волокон имели указанные агрегаты (фиг. 4б). Результаты исследования методом электронной микроскопии (ЭМ) выявили, что указанные агрегаты состоят из мембранного материала. Многие мышечные волокна  $Ano5^{-/-}$  имели плотно упакованные скопления везикулярных или трубчатых мембран или случайно ориентированные и неплотно упакованные соединительные трубчатые образования с нечеткими внутренними трубчатками, которые соответствовали агрегатам, наблюдаемым при световой микроскопии (фиг. 4с,д). Мыши  $ANOP5^{-/-}$  имели аналогичные результаты гистопатологического исследования, сходные с результатами пациентов, у которых диагностирован дефицит ANO5. Результаты исследования методом электронной микроскопии мышцы пациента со сложной гетерозиготной двукратной мутацией [c.155A>G (p.Asn52Ser)]+[c.191dupA (p.Asn64Lysfs\*15)] в кодирующей области гена ANO5 выявили многочисленные агрегаты и множественные участки, имеющие области разрушающихся митохондрий. Агрегаты в мышце  $Ano5^{-/-}$  имели положительные результаты окрашивания для выявления SERCA1, но не активности

сукцинатдегидрогеназы (SDH), это указывает на то, что они происходят из саркоплазматического ретикулума, а не из митохондрий (фиг. 4g). Однако помимо указанных мембранных агрегатов у мышей  $Apo5^{-/-}$  наблюдали разрушающиеся митохондрии и субсарколеммальное накопление митохондрий (фиг. 4e). Субсарколеммальное накопление митохондрий подтверждали путем окрашивания замороженных срезов для выявления SDH, которая была локализована в плотных пятнах вблизи поверхности мышечных волокон (фиг. 4f). Чтобы выявить, имеет ли наблюдаемое разрушение митохондрий функциональное значение, активность цитратсинтазы количественно определяли в качестве меры оценки интактных митохондрий и обнаружили значительное уменьшение активности фермента в экстрактах мышц  $Apo5^{-/-}$  по сравнению с контролем дикого типа.

### Пример 3

$Apo5$  облегчает восстановление мембраны

У здоровых индивидуумов нормальные физические нагрузки приводят к небольшим повреждениям в плазматической мембране, которые заживляются с помощью двух процессов: (i) небольшие разрывы повторно закрываются путем сборки новой плазматической мембраны и (ii) участки с более серьезным нарушением восстанавливаются спутниковыми клетками, которые дифференцируются в миобластоподобные клетки и сливаются для регенерации многоядерных мышечных волокон. Для того чтобы протестировать как потеря экспрессии  $ANO5$  влияет на восстановление мембраны, исследовали эффект повреждения мембраны, полученного с помощью интенсивного лазерного импульса, нанесенного на выделенное мышечное волокно короткого сгибателя пальцев (FDB). Криосрезы размером 12 мкм помещали на предметные стекла микроскопа Fisher Superfrost и блокировали 10% козьей сывороткой и 0,1% твин-20 в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) в течение 1 ч при комнатной температуре. Стекла инкубировали в растворе первичного антитела в течение 1 часа при комнатной температуре (антитело к FLAG F7425 Sigma-Aldrich, 1: 175), Sercal CaF2-5D2 (Developmental Studies Hybridoma Bank, 1:50). Стекла затем промывали 3 раза с использованием ФСБ в течение 1 часа при комнатной температуре с последующим блокированием в течение 30 мин. Вторичные козы антитела к иммуноглобулину мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 594 (A21125, Life Technologies), или вторичные козы антитела к иммуноглобулину кролика, конъюгированные с Alexa Fluor 568 (A11011, Life Technologies), разводили в соотношении 1:250 в блокирующем растворе и инкубировали в течение 45 мин, затем промывали 3 раза с использованием ФСБ в течение 1 ч. Срезы закрепляли с использованием сред для закрепления Vectashield (Vector Labs, Берлингем, Калифорния, США) и анализировали с помощью микроскопа Zeiss Axioskop 2 с использованием фильтра Cy5 (возбуждение 578 нм-590 нм, эмиссия 603 нм-671 нм) (Zeiss, Торнвуд, Нью-Йорк, США). Время экспозиции изображения стандартизировали с использованием положительного контроля для каждого антитела каждый день. Изображения получали с использованием программного обеспечения Axiovision 4.5.

Повреждение мембран оценивали по накоплению FM1-43, стирилового катионного красителя, не способного пересечь мембрану, который не является флуоресцентным в водном растворе, однако ярко флуоресцирует в липидной среде и широко использовался для изучения восстановления мембраны. Небольшой участок, испускающий флуоресцентный сигнал, детектировали в месте повреждения в волокнах дикого типа и  $Apo5^{-/-}$  сразу же после лазерного повреждения (фиг. 5a). Увеличение интенсивности флуоресценции было более значительным и происходило с ~2-кратно более высокой начальной скоростью в мышечных волокнах  $Apo5^{-/-}$ , по сравнению с волокнами дикого типа. В то время как флуоресцентный сигнал выходил на плато через 190 сек в волокнах дикого типа, интенсивность флуоресценции продолжала увеличиваться в волокнах  $Apo5^{-/-}$  на всем протяжении эксперимента (фиг. 5b).

Чтобы проверить, связано ли нарушение восстановления мембраны непосредственно с экспрессией  $ANO5$ , кДНК  $ANO5$  человека экспрессировали с помощью аденоассоциированного вируса (AAV) в мышцах  $Apo5^{-/-}$  (фиг. 4b,c). кДНК  $ANO5$  человека (SEQ ID NO: 1) клонировали в плазмиду AAV2 ITR с использованием сайтов рестрикции Not1 между промотором МНСК7 и сигналом полиаденилирования. гAAV-векторы получали с помощью модифицированного подхода перекрестной упаковки, в соответствии с которым ITR AAV типа 2 могут быть упакованы в несколько серотипов капсида AAV, как описано в Rabinowitz et al. (J. Virol. 76: 791-801, 200). Получение осуществляли с использованием стандартного способа осаждения 3-плазмидной ДНК с  $Ca_3(PO_4)_2$  с использованием клеток линии HEK293. Клетки HEK293 поддерживали в DMEM с добавлением 10% сыворотки теленка Cosmic calf (CCS, Hyclone). Плазмиды для получения вектора включали: (i) pAAV.МНСК7.ANO5, (ii) rep2-cap8 модифицированные AAV-вспомогательные плазмиды, кодирующие изолят rh.74, сходный с cap серотипа 8, и (3) вспомогательную плазмиду аденовируса типа 5 (pAdhelper), экспрессирующую гены аденовируса E2A, E4 ORF6 и VA I/II RNA. Векторы очищали из осветленных клеточных лизатов HEK293 путем последовательной очистки в градиенте йодиксанола и с помощью колоночной анионообменной хроматографии с использованием линейного градиента соли NaCl, как описано ранее в Clark et al. (Human Gene Ther. 10: 1031-10398, 1999). Способ титрования на основе количественной ПЦР использовали для определения титра инкапсидированного векторного генома (в.г.) с использованием детекторной системы Prism 7500 Taqman (PE Applied Biosystems, Карлсбад, Калифорния, США).

AAV-вектор доставляли с помощью внутримышечной инъекции в мышцу мыши. Мыши  $Apo5^{-/-}$  в

возрасте 4-5 недель получали внутримышечную инъекцию  $1 \times 10^{11}$  в.г. rAAVrh.74.MHCK7.huANO5.FLAG в мышцы TA (n=4) или FDB (n=4). Мышцы TA собирали через 4 недели после инъекции и обрабатывали для гистологического и иммунофлуоресцентного исследования.

Мышечные волокна короткого сгибателя пальцев (FDB) собирали через 10 недель после лечения и подвергали лазерному повреждению. Количественное исследование восстановления мембраны проводили на левой и правой мышцах FDB  $Ano5^{-/-}$  (n=4) и подобранных по возрасту мышей C57BL6 (n=4), как описано Sondergaard et al. (Ann. Clin. Trans. Neurol. 2:256-270, 2015). В общих чертах, волокна FDB выделяли с использованием раствора, содержащего 2% мас./об. коллагеназы типа I, суспензированной в DMEM. После диссоциации мышцы волокна помещали в чашку со стеклянным дном, содержащую 2,5 мкМ красителя FM1-43 в ФСБ в модификации Дульбекко (без Ca/Mg), дополненной 1,5 мМ  $Ca^{2+}$ . Волокна подвергали лазерному повреждению с использованием двухфотонного конфокального лазерного сканирующего микроскопа FluoView® FV1000 (Olympus). Волокна повреждали, используя точку размером 4,479 мм лазера с длиной волны 850 нм при мощности 20%, и получали изображения каждые 5 секунд в течение 190 с, чтобы визуализировать поглощение красителя FM1-43. В среднем визуализировали 7-10 волокон на мышцу на одну мышь (всего 31 волокно дикого типа, 39 волокон  $Ano5^{-/-}$  и 30 волокон  $Ano5^{-/-}$ , восстановленных с помощью AAV-ANO5). Интенсивность флуоресценции инфильтратов красителя, окружающих участки повреждения на мембране, анализировали с помощью программного обеспечения ImageJ путем измерения интегральной плотности интенсивности пикселей в пределах определенной области. Для проведения указанного анализа с помощью ImageJ прямоугольный блок размером 0,75 пикселя на 1,00 пиксель рисовали в условиях двукратного увеличения и использовали для измерения интенсивности красителя в этом участке. Интенсивность флуоресценции в отдельный момент времени, измеренную в ходе анализа, нормировали к исходной интенсивности, измеренной при  $t=-5$  с (до повреждения). При анализе интенсивности флуоресценции значения для всех волокон из каждой линии усредняли. Для определения статистической значимости различий между обработанными и необработанными волокнами в каждый момент времени проводили двухфакторный дисперсионный анализ ( $p < 0,001$ ). Чтобы количественно оценить изменение интенсивности флуоресценции точки данных аппроксимировали к уравнению Хилла с использованием Origin Pro9.1. Все кривые аппроксимировали с использованием скорректированного  $R^2 > 0,998$ . Волокна  $Ano5^{-/-}$ , волокна WT и волокна  $Ano5^{-/-}$  обработанные AAV.ANO5, значительно различались, начиная с 100 секунды после повреждения. AAV.ANO5 частично восстанавливал повторное запечатывание мембраны мышцы  $Ano5^{-/-}$  (фиг. 5a,b,c).

#### Пример 4

##### Нарушение регенерации у мышей $Ano5$ KO

Чтобы изучить, нарушена ли регенерация мышц также у мышей  $Ano5^{-/-}$ , исследовали способность мышц к восстановлению после травмы, полученной путем инъекции кардиотоксина (фиг. 5d). Мышей анестезировали с помощью ингаляционного изофлурана и кардиотоксин (разведенный до концентрации 10 мкМ стерильным физиологическим раствором) вводили путем инъекции каждые две недели в общей сложности в 3 этапа. По 30 мкл и 50 мкл кардиотоксина вводили в левую мышцу TA и левую мышцу GAS, соответственно, 8-недельным мышам  $Ano5^{-/-}$  и подобранным по возрасту контрольным мышам. Стерильный физиологический раствор вводили путем инъекции в контралатеральную мышцу в качестве плацебо-контроля. Группы мышей подвергали эвтаназии, и их мышцы собирали через 1, 3, 7, 14, 30 и 90 дней после последней инъекции кардиотоксина (n=3 мыши на линию на точку данных). Получали четыре изображения TA при 20-кратном увеличении, и диаметр волокна измеряли на криосрезах, окрашенных

гемаоксилином и эозином, через 1 и 3 месяца после последней инъекции кардиотоксина с использованием AxioVision 4.8. Измеряли в среднем 500-600 мышечных волокон, и статистическую значимость различий между размером мышечного волокна пораженных мышей  $Ano5^{-/-}$  и пораженных контрольных мышей определяли с помощью непарного t-теста (GraphPad Prism) (\*\*\* $p < 0,0001$ ).

Чтобы отслеживать временные изменения некроза и регенерации, в мышцы TA и GAS 8-недельных мышей 3 раза вводили кардиотоксин с двухнедельным интервалом между введениями. Ткани собирали через 1, 3, 7, 14, 30 и 90 дней после последней инъекции (фиг. 5d). Контралатеральную сторону использовали в качестве контрольной стороны, в которую вводили только физиологический раствор. Мышца дикого типа регенерировала после обработки кардиотоксином, так, что к 1 месяцу после обработки мышца в целом имела нормальный вид, за исключением центральных ядер в новых регенерированных волокнах. Однако у мышей  $Ano5^{-/-}$  наблюдали значительную задержку регенерации и длительный некроз. Через 3 месяца средний диаметр волокна мышцы  $Ano5^{-/-}$  оставался значительно сниженным по сравнению с диким типом, и многие волокна проявляли центральные ядра (фиг. 5d,e).

#### Пример 5

##### Оценка действия антиоксидантной терапии

Чтобы исследовать потенциальные преимущества тройной антиоксидантной диеты на скелетной мышце дефицитных по аноктамину 5 мышей ( $Ano5^{-/-}$ ), когорты 2-месячных мышей дикого типа (WT) BL6 и мышей  $Ano5^{-/-}$  получали нормальный корм для мышей или рацион с добавлением тройной композиции антиоксидантов, содержащей 1000 МЕ витамина E, 0,1%  $\alpha$ -липовоевой кислоты и 0,25% кофермента



Q10 (в виде восстановленной формы, убихинола). Мыши проходили испытания на беговой дорожке до изнеможения в течение 3 дней подряд каждую 4-ю неделю в течение 16 недель, и животных умерщвляли для исследования выходных функциональных показателей, связанных со здоровьем мышц (активность и сила диафрагмы) и окислительным стрессом (активность цитратсинтазы и экспрессия pgc1 $\alpha$ ).

Лазерный мониторинг активности в клетке с открытым полем Камеру для оценки активности в открытом поле использовали для определения общей активности экспериментальных мышей в соответствии с ранее описанным протоколом (Kobayashi et al., *Nature* 456: 511-5 (2008); Beastro et al., *Am J Pathol* 179: 2464-74 (2011)) с несколькими модификациями. Всех мышей испытывали в одно и то же время дня ранним утром, непосредственно перед завершением ночного цикла, когда мыши наиболее активны. Всех мышей испытывали в изолированной комнате, при неярком свете, каждый раз в присутствии одного и того же исследователя. Помимо этого авторы настоящего изобретения испытывали мышей, которые не были индивидуально размещены (Voikar et al., *Genes Brain Behav* 4: 240-52(2005)), в соответствии с процедурой, описанной в предыдущих отчетах, чтобы уменьшить беспокойство и свести к минимуму поведенческие переменные, что может потенциально повлиять на нормальную активность мышей и, следовательно, результаты анализа. Активность мышцей контролировали с использованием Photobeam Activity System (San Diego Instruments, Сан-Диего, Калифорния, США). В данной системе используется сетка невидимых инфракрасных световых лучей, которые пересекают камеру животного спереди назад и слева направо, чтобы следить за положением и движением мыши в плоскости XYZ. Активность регистрировали в циклах продолжительностью 1 ч с 5-минутными интервалами. Мышей акклиматизировали к комнате для исследования активности для начальной 1-часовой сессии за несколько дней до начала сбора данных. Мышей испытывали в отдельных камерах в группах по 4 особи. Оборудование для испытаний очищали между каждым использованием, чтобы уменьшить реакционные поведенческие переменные мыши, которые могли бы изменить результаты авторов настоящего изобретения. Собранные данные конвертировали в рабочий лист Microsoft Excel, и все вычисления выполняли в программе Excel. Индивидуальные пересечения луча света для движения в плоскостях X и Y добавляли для каждой мыши, чтобы представить общую траекторию движения, и пересечения луча света в плоскости Z добавляли для получения вертикальной активности в течение 1-часового интервала времени.

В конце 12 и 16 недели двух мышей из каждой группы помещали в клетку для оценки активности для мониторинга произвольной активности. Общую активность мышцей измеряли как количество раз, когда мыши пересекали горизонтальные и/или вертикальные лазерные лучи в течение 45-минутного периода после изнурения на беговой дорожке (фиг. 6). Было обнаружено, что через 16 недель мыши Apo5<sup>-/-</sup>, получавшие антиоксидантный рацион, были более активными, чем мыши, получавшие стандартный корм (плацебо), это указывает на то, что антиоксиданты оказали положительное влияние на произвольную активность после изнурения.

Тетаническое сокращение диафрагмы для функциональной оценки

Несмотря на то, что результаты поведенческих количественных исследований указывали на определенное терапевтическое действие, указанные показатели исхода зависят от нескольких переменных, не связанных с рационом. Для того чтобы исследовать влияние антиоксидантов на функцию скелетных мышц, проводили измерения силы на диафрагме мышцей Apo5<sup>-/-</sup> и мышцей дикого типа (фиг. 7). Диафрагма была выбрана, поскольку ранее было показано, что мыши Apo5<sup>-/-</sup> имеют недостаточную силу диафрагмы, но не мышц конечностей (Griffin et al., *Hum Mol Genet* 25: 1900-1911 (2016)).

Мышей подвергали эвтаназии, и диафрагму иссекали с реберными связками и центральным сухожилием и помещали в буфер КН, как описано ранее (Beastro et al., *Am J Pathol* 179: 2464-74 (2011); Rafael-Fortney et al., *Circulation* 124: 582-8 (2011); Moorwood et al., *Journal of Visualized Experiments* 71: e50036 (2013)). Выделяли срезы диафрагмы шириной 2-4 мм. Полоски диафрагмы прочно связывали плетеным хирургическим шелком (6/0, Surgical Specialties, Ридинг, Пенсильвания, США) в центральном сухожилии и сшивали через часть реберной кости, прикрепленной к дистальному концу полосы. Каждую мышцу переносили в водяную баню, наполненную насыщенным кислородом раствором КН, который поддерживали при 37°C. Мышцы выравнивали горизонтально и привязывали непосредственно между неподвижным штифтом и работающим в двух режимах преобразователем силы - серводвигателем (305C; Aurora Scientific, Аврора, Онтарио, Канада). Два платиновых пластинчатых электрода помещали в ванну с органом, чтобы фланкировать длину мышцы. Мышцу растягивали до оптимального натяжения, чтобы измерить судорожные сокращения, и затем оставляли на 10 минут в покое до начала протокола тетанического сокращения. После стабилизации мышцу растягивали до оптимальной длины 1 г и подвергали подготовительной стимуляции, состоящей из трех сокращений при 1 Гц каждые 30 секунд, за которыми следовали три сокращения при 150 Гц каждую минуту. После периода покоя в течение 3 мин диафрагму стимулировали при 20, 50, 80, 120, 150, 180 Гц с периодом покоя в течение 2 мин между каждым стимулом, каждый длительностью 250 мс, чтобы определить максимальную тетаническую силу. Измеряли длину и массу мышцы. Силу нормировали для массы и длины мышцы. Значительное улучшение удельной силы диафрагмы наблюдали у мышцей Apo5<sup>-/-</sup>, получавших рацион с композицией трех антиоксидантов, по сравнению с мышцами Apo5<sup>-/-</sup>, получавшими плацебо (фиг. 7).

Митохондриальный биогенез

После установления связи тройной антиоксидантной терапии с содержанием окислительных волокон, исследовали биогенез и функции митохондрий. Результаты предыдущих исследований выявили, что упражнения стимулируют пути, ведущие к митохондриальному биогенезу, в то время как антиоксидантная терапия снижает указанную передачу сигналов. Результаты, полученные на ткани икроножной мышцы самцов, подтверждают, что лечение антиоксидантами уменьшает экспрессию ключевого регулятора митохондриального биогенеза PGC-1 $\alpha$  (фиг. 8a). Интересно отметить, что было обнаружено, что активность цитратсинтазы выше у мышей, получавших рацион с антиоксидантами, среди всех комбинаций генотип-пол (фиг. 8b). Данный факт можно объяснить тем, что увеличение доли окислительных волокон, которые имеют высокое содержание митохондрий, маскирует любое уменьшение митохондриального биогенеза в индивидуальном волокне.

В заключение следует отметить, что было обнаружено, что тройная антиоксидантная терапия оказывает значительное влияние на некоторые показатели физиологии и функции мышц, включая производную активность, прочность диафрагмы, размер волокна, состав волокна и активность митохондриального фермента. Было обнаружено, что полученные результаты, в некоторых случаях, зависят от пола. LGMD2L имеет гендерную специфику, поскольку самцы подвержены этому заболеванию в большей степени.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения пояснично-тазовой мышечной дистрофии типа 2L, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества рекомбинантного вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV-вектора), содержащего 1) последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 85% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1; или 2) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок, который имеет по меньшей мере 85% идентичность аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, где субъект имеет рецессивную мутацию в гене ANO5.

2. Способ по п.1, где последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 95% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1.

3. Способ по п.1 или 2, где последовательность нуклеиновой кислоты кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный AAV содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1.

5. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный AAV-вектор представляет собой AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV rh.74 или их варианты.

6. Способ по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный AAV-вектор содержит полинуклеотид, функционально связанный с регуляторным элементом, специфичным для мышц.

7. Способ по п.6, отличающийся тем, что указанный регуляторный элемент, специфичный для мышц, представляет собой элемент гена актина скелетных мышц человека, промотор tMCK, промотор MHSK7, элемент гена актина мышц сердца, фактор, связывающийся с энхансером, специфичным для миоцитов (MEF), элемент энхансера креатинкиназы мышцы, элемент гена тропонина С быстро сокращающихся скелетных мышц, элемент гена тропонина С медленно сокращающихся мышц сердца, элемент гена тропонина I медленно сокращающихся мышц, индуцируемый гипоксией элемент, индуцируемый стероидом элемент или глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE).

8. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный AAV-вектор вводят путем внутримышечной или внутривенной инъекции.

9. Способ по любому из пп.1-8, дополнительно включающий этап введения терапевтически эффективного количества антиоксидантов субъекту, нуждающемуся в этом.

10. Способ по п.9, отличающийся тем, что антиоксидант представляет собой один или несколько из кофермента Q10, липоевой кислоты, витамина, каротиноида, кофактора витамина, минерала, полифенола или флавоноида.

11. Способ по п.10, отличающийся тем, что вводят три антиоксиданта, и антиоксидант представляет собой кофермент Q10, липоевую кислоту и витамин E.

12. Способ по любому из пп.9-11, отличающийся тем, что указанный антиоксидант вводят перорально.

13. Способ по пп.10, 11 или 12, отличающийся тем, что антиоксиданты вводят в одной и той же композиции.

14. Способ по п.10 или 11, отличающийся тем, что указанные антиоксиданты вводят отдельно.

15. Способ по любому из пп.9-11, отличающийся тем, что указанные антиоксиданты вводят совместно.

16. Способ по любому из пп.9-11, отличающийся тем, что указанные антиоксиданты вводят в раз-

ное время или последовательно.

17. Способ по любому из пп.9-11, отличающийся тем, что антиоксидант вводят один раз в сутки, один раз в неделю, два раза в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели, один раз в месяц или один раз каждые два месяца.

18. Применение композиции, содержащей терапевтически эффективное количество рекомбинантного AAV-вектора, содержащего 1) последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 85% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1; или 2) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок, который имеет по меньшей мере 85% идентичность аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, для лечения пояснично-тазовой мышечной дистрофии типа 2L у субъекта, нуждающегося в этом, где субъект имеет рецессивную мутацию в гене ANO5.

19. Применение по п.18, где последовательность нуклеиновой кислоты имеет по меньшей мере 95% идентичность последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1.

20. Применение по п.19, где последовательность нуклеиновой кислоты кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

21. Применение по любому из пп.18-20, отличающееся тем, что указанный рекомбинантный AAV содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1.

22. Применение по любому из пп.18-21, отличающееся тем, что указанный рекомбинантный AAV-вектор представляет собой AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV rh.74 или их варианты.

23. Применение по любому из пп.18-22, отличающееся тем, что указанный рекомбинантный AAV-вектор содержит полинуклеотид, функционально связанный с регуляторным элементом, специфичным для мышц.

24. Применение по п.23, отличающееся тем, что указанный регуляторный элемент, специфичный для мышц, представляет собой элемент гена актина скелетных мышц человека, промотор tMCK, промотор MHCK7, элемент гена актина мышц сердца, фактор, связывающийся с энхансером, специфичным для миоцитов (MEF), элемент энхансера креатинкиназы мышцы, элемент гена тропонина С быстро сокращающихся скелетных мышц, элемент гена тропонина С медленно сокращающихся мышц сердца, элемент гена тропонина I медленно сокращающихся мышц, индуцируемый гипоксией элемент, индуцируемый стероидом элемент или глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE).

25. Применение по любому из пп.18-24, отличающееся тем, что композиция приготовлена для внутримышечной или внутривенной инъекции.

26. Применение по любому из пп.18-24, отличающееся тем, что композиция дополнительно содержит терапевтически эффективное количество антиоксиданта.

27. Применение по п.26, отличающееся тем, что указанная композиция содержит по меньшей мере один из кофермента Q10, липоевой кислоты, витамина, каротиноида, кофактора витамина, минерала, полифенола или флавоноида.

28. Применение по п.26 или 27, отличающееся тем, что указанная композиция содержит кофермент Q10, липоевую кислоту и витамин Е.

29. Применение по любому из пп.26-28, где антиоксидант приготовлен для перорального введения.

30. Применение по п.27 или 28, отличающееся тем, что антиоксиданты входят в состав одной и той же композиции.

31. Применение по любому из пп.26-28, отличающееся тем, что антиоксиданты входят в состав отдельных композиций.

32. Применение по любому из пп.26-28, отличающееся тем, что указанные антиоксиданты вводят совместно.

33. Применение по любому из пп.26-28, отличающееся тем, что указанные антиоксиданты вводят в разное время или последовательно.

34. Применение по любому из пп.29-33, отличающееся тем, что антиоксидант вводят один раз в сутки, один раз в неделю, два раза в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели, ежемесячно или один раз каждые два месяца.

35. Способ по любому из пп.12-17, дополнительно включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества рекомбинантного AAV-вектора, содержащего 1) последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 85% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1, 2) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок, который имеет по меньшей мере 85% идентичность аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, в комбинации с терапевтически эффективным количеством антиоксиданта.

36. Способ по п.35, отличающийся тем, что антиоксидант представляет собой по меньшей мере один из кофермента Q10, липоевой кислоты, витамина, каротиноида, кофактора витамина, минерала, полифенола или флавоноида.

37. Способ по п.35 или 36, отличающийся тем, что антиоксидант содержит кофермент Q10, липоевую кислоту и витамин Е.

38. Способ по любому из пп.35-37, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный AAV-

вектор содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1.

39. Способ по любому из пп.35-38, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный AAV-вектор представляет собой AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13 или AAV rh.74.

40. Способ по любому из пп.35-38, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный AAV-вектор вводят с помощью внутримышечной или внутривенной инъекции.

41. Способ по любому из пп.37-40, отличающийся тем, что антиоксидант вводят перорально.

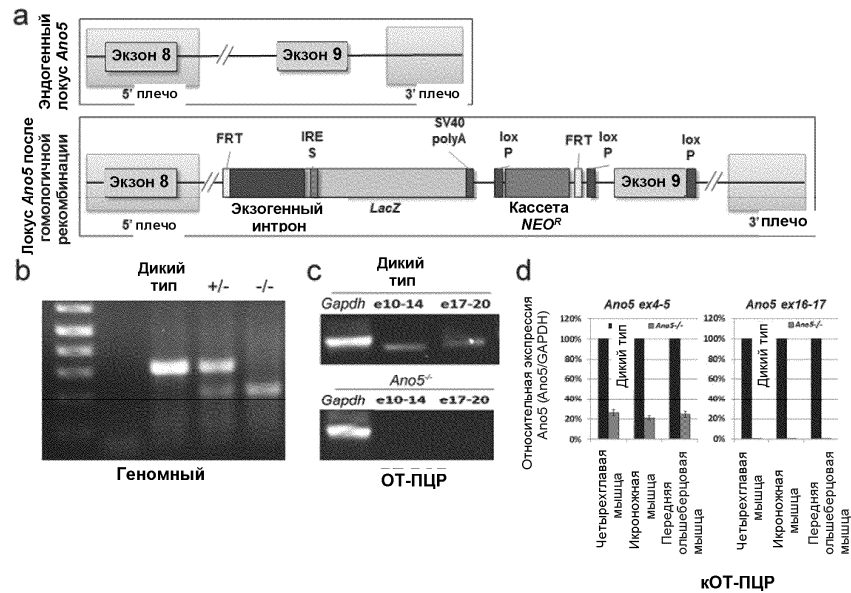
42. Способ по любому из пп.35-40, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный AAV-вектор и антиоксидант входят в состав одной и той же композиции.

43. Способ по любому из пп.35-41, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный AAV-вектор и антиоксидант входят в состав отдельных композиций.

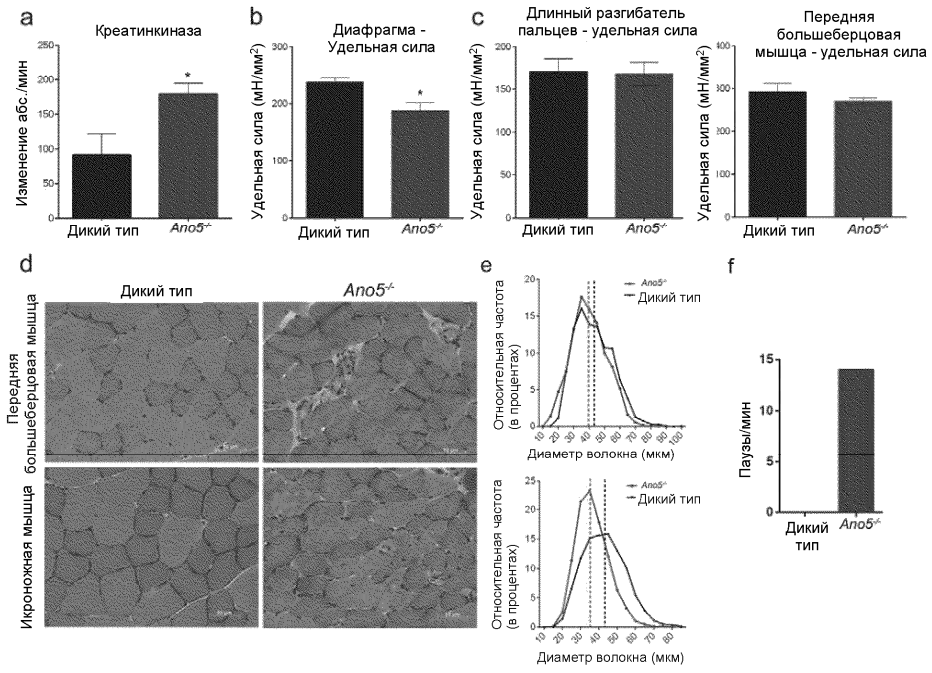
44. Способ по любому из пп.35-41, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный AAV-вектор и антиоксидант вводят совместно.

45. Способ по любому из пп.35-41, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный AAV-вектор и антиоксидант вводят в разные моменты времени или последовательно.

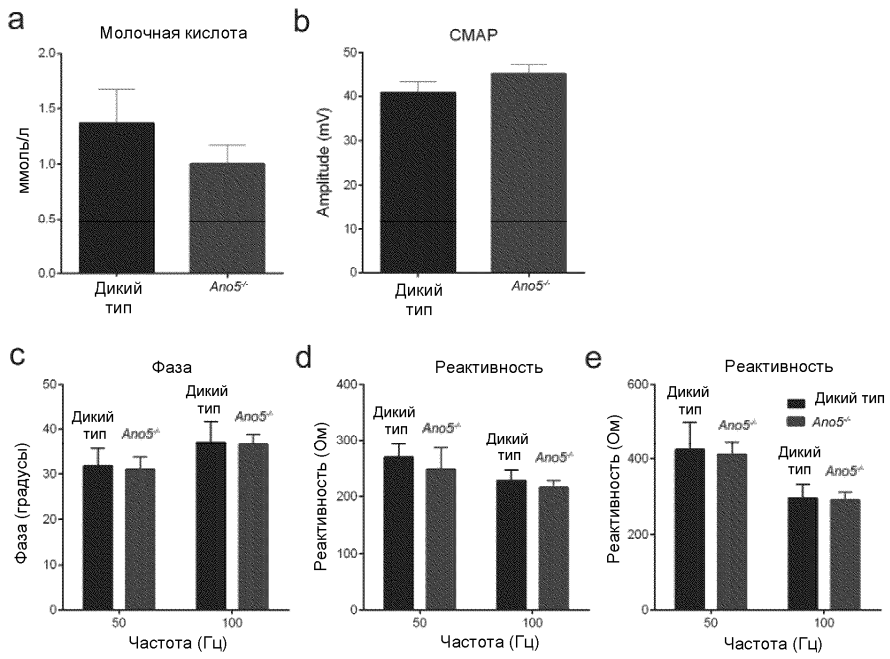
46. Способ по любому из пп.35-45, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный AAV-вектор и антиоксидант вводят один раз в сутки, один раз в неделю, два раза в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели, ежемесячно или один раз каждые два месяца.



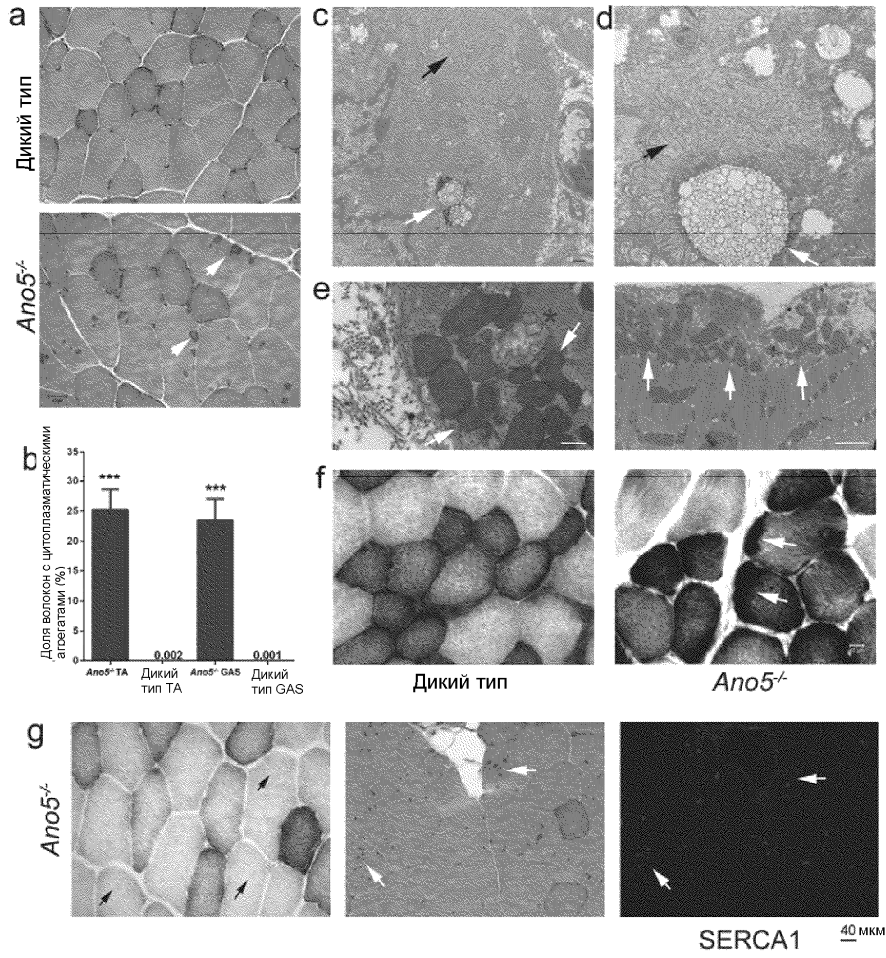
Фиг. 1



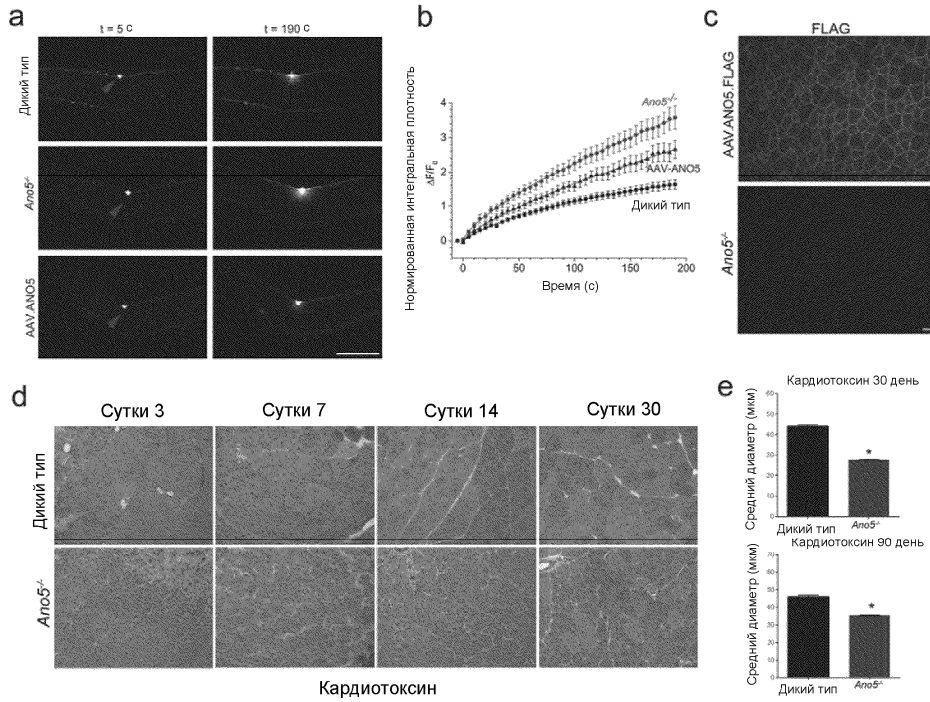
Фиг. 2



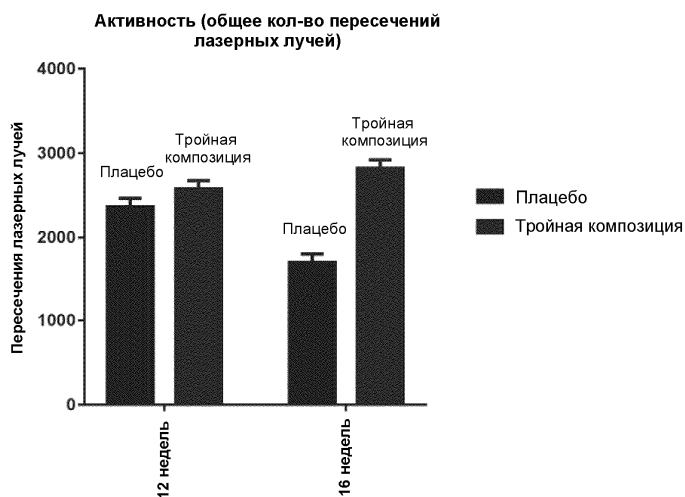
Фиг. 3



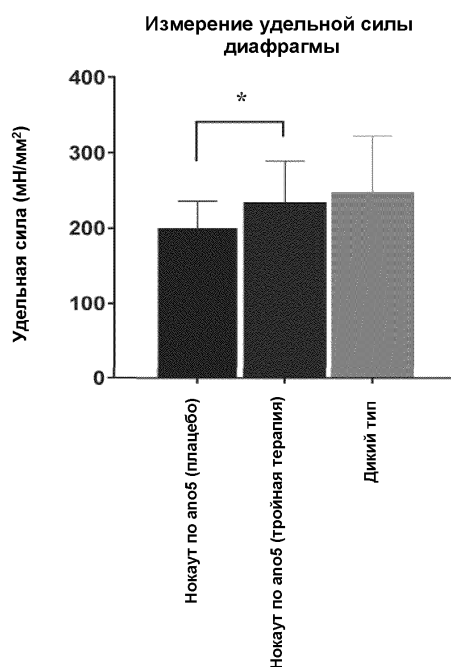
Фиг. 4



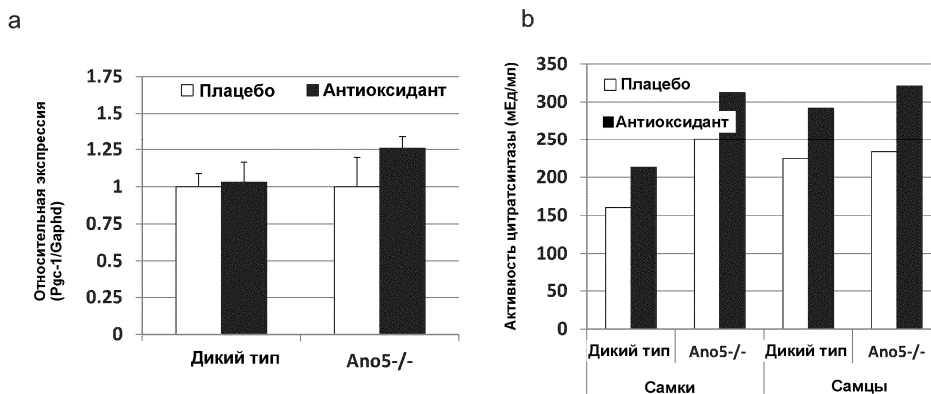
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

