

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **048262**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2024.11.13**

**(21)** Номер заявки  
**202391858**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2021.12.21**

**(51)** Int. Cl. **C12N 15/864** (2006.01)  
**A61K 38/50** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)  
**A61K 38/55** (2006.01)

---

**(54) ПОВЫШЕННАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ УПАКОВКИ ВЕКТОРА ДЛЯ ГЕНОТЕРАПИИ  
СЕРДЕЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

---

**(31)** 63/130,109

**(32)** 2020.12.23

**(33)** US

**(43)** 2023.08.08

**(86)** PCT/US2021/064637

**(87)** WO 2022/140402 2022.06.30

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ЮНИВЕРСИТИ ОФ ФЛОРИДА  
РИСЕРЧ ФАУНДЕЙШН,  
ИНКОРПОРЕЙТЕД (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Суини Хью Ли (US)**

**(74)** Представитель:  
**Гизатуллина Е.М., Угрюмов В.М.,  
Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,  
Костюшенкова М.Ю., Джермакян Р.В.  
(RU)**

**(56)** WO-A1-2019237067  
WO-A1-2020176896  
WO-A1-2019073058  
WO-A1-2021016126

SLEEPER MEG M.: "Status of Therapeutic Gene Transfer to Treat Cardiovascular Disease in Dogs and Cats", VETERINARY CLINICS OF NORTH AMERICA: SMALL ANIMAL PRACTICE., vol. 47, no. 5, 1 September 2017 (2017-09-01), pages 1113-1121, XP055915896, US ISSN: 0195-5616, DOI: 10.1016/j.cvsm.2017.04.005 Retrieved from the Internet: URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvsm.2017.04.005>>the whole document

---

**(57)** Настоящее изобретение относится к композициям и способам, полезным при лечении сердечных заболеваний. Раскрытые композиции и способы основаны на генотерапии, содержащей вектор на основе рекомбинантного AAV для доставки двух или более трансгенов в сердце индивидуума, где трансгены кодируют белок S100A1 и ингибитор апоптоза, сердечный репрессор апоптоза с доменом рекрутирования каспазы (сARC), соответственно. В различных вариантах осуществления композиции и способы, раскрытые в настоящем документе, содержат векторы, содержащие последовательности кДНК S100A1 и/или сARC, которые оптимизированы по кодонам для экспрессии у людей. В различных вариантах осуществления композиции и способы, раскрытые в настоящем документе, содержат векторы с улучшенной эффективностью упаковки. В некоторых аспектах воздействие на несколько источников одного или нескольких состояний сердца может обеспечить синергические преимущества во время лечения.

---

**B1**

**048262**

**048262**

**B1**

### **Ссылка на родственные заявки**

Эта заявка испрашивает приоритет в соответствии с 35 U.S.C. § 119(e) по отношению к предварительной патентной заявке США № 63/130109, зарегистрированной 23 декабря 2020 года, таким образом, полностью включенной посредством ссылки.

### **Перечень последовательностей**

В соответствии с 37 C.F.R. 1.52(e)(5), настоящее описание содержит ссылку на Перечень последовательностей (представленный в электронном виде в виде файла .txt с именем "U1197.70172WO00-SEQ"). Файл .txt датирован 14 декабря 2021 года и имеет размер 57573 байт. Перечень последовательностей полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

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

Кардиомиопатия является второй наиболее частой причиной заболеваемости сердца у субъектов, и единственным терапевтическим вариантом является медикаментозное лечение вторичных признаков. Прогноз для заболевших субъектов зависит от стадии заболевания и, у собак, от породы. Функция сердца критически зависит от кальций-зависимой передачи сигнала. Во время работы сердца нарушение функции кальциевых каналов в клетках сердца способствует нарушениям кальциевого цикла, еще больше угнетая функцию сердца. Стратегии переноса генов для уменьшения нарушений кальциевого цикла показали улучшение состояния сердца на моделях малых и больших животных, а также в клинических испытаниях на людях.

Дилатационная кардиомиопатия (ДКМП) является наиболее распространенным типом кардиомиопатии человека, встречающимся в основном у взрослых в возрасте от 20 до 60 лет. ДКМП также присутствует у псовых (например, у собак), в особенности у собак крупных пород. Как у людей, так и у собак ДКМП представляет собой заболевание сердечной мышцы, которое поражает желудочки и предсердия сердца, нижние и верхние камеры сердца, соответственно, приводя к ослаблению сокращений и снижению насосной функции. По мере прогрессирования ДКМП камеры сердца увеличиваются, могут протекать один или несколько клапанов, развиваются признаки хронической сердечной недостаточности. У собак причина ДКМП в большинстве случаев неясна, но некоторые породы имеют наследственную (например, генетическую) предрасположенность.

У людей большинство форм ДКМП возникают по ряду причин, включая ишемическую болезнь сердца, инфаркт миокарда, высокое артериальное давление, диабет, заболевание щитовидной железы, вирусный гепатит и вирусную инфекцию, которые вызывают воспаление сердечной мышцы. Злоупотребление алкоголем и некоторыми препаратами, такими как кокаин и амфетамины, а также, по меньшей мере, два лекарства, используемые для лечения рака (доксорубин и даунорубин), также могут привести к ДКМП. Кроме того, существует ряд генетических форм ДКМП включающих в качестве неограничивающих примеров ДКМП, ассоциированную с мышечными дистрофиями Дюшенна и Беккера. В случае некоторых форм миодистрофии Беккера, а также в большинстве случаев миодистрофии Дюшенна, кардиомиопатия может в итоге ограничить выживаемость пациента.

### **Краткое раскрытие настоящего изобретения**

У людей дилатационная кардиомиопатия является наиболее распространенным типом кардиомиопатии и может возникать в результате ряда приобретенных, а также генетических заболеваний. Как и у собак, так и у других моделей на животных, хотя причины заболевания лежат в дисфункции обмена кальция, окончательное прогрессирование заболевания обусловлено митохондриальной дисфункцией и/или вызванным растяжением апоптозом кардиомиоцитов. Хотя лечение обмена кальция само по себе может быть эффективным на ранних стадиях заболевания, решение проблемы сочетания обмена кальция, митохондриальной дисфункции и апоптоза будет необходимо для лечения всех форм ДКМП и на всех стадиях прогрессирования заболевания.

В настоящем документе предлагаются улучшенные подходы к доставке генов для лечения субъектов с кардиомиопатией, и, в некоторых вариантах осуществления, с хронической сердечной недостаточностью. Эти подходы относятся к экспрессии S100A1 для решения проблемы обмена кальция и экспрессии ARC (репрессор апоптоза с доменом рекрутирования каспазы), чтобы блокировать все источники апоптоза и нормализовать функцию митохондрий (см. также патентную публикацию США № 2021/0260215, полностью включенную в настоящий документ посредством ссылки). Экспрессия трансгенов S100A1 и ARC с помощью раскрытого подхода с самокомплементарным AAV вектором происходит быстро (т.е. в течение часов), что имеет решающее значение для противодействия эффектам конечной стадии сердечной недостаточности, и ограничена сердцем. Таким образом, эти подходы нацелены на все три фактора возникновения и прогрессирования ДКМП, и, таким образом, должны быть применимы к любой форме ДКМП на любой стадии прогрессирования.

Кроме того, в настоящем документе предлагаются наборы трансгенов для доставки генов, которые кодируют белок ARC и S100A1. Эти трансгены могут содержать последовательности кДНК, и эти последовательности могут быть доставлены и экспрессированы с использованием векторной системы на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV). Раскрытые последовательности кДНК можно доставлять с любым типом вектора для доставки генов, включая в качестве неограничивающих примеров все формы AAV, лентивирусы, липосомы и экзосомы.

В конкретных вариантах осуществления эти последовательности можно экспрессировать с помощью самокомплементарной версии ДНК вектора на основе AAV, которая содержит i) кДНК дикого типа или оптимизированную кДНК, кодирующую ARC человека, и ii) кДНК дикого типа или оптимизированную кДНК, кодирующую S100A1 человека. Последовательности кДНК ARC и s100A1 могут быть расположены таким образом, что ARC содержит первую кДНК, а S100A1 содержит вторую кДНК в направлении от 5' к 3', или наоборот. В других вариантах осуществления эти последовательности кДНК можно экспрессировать с помощью двух промоторов вместо промотора и IRES.

Экспрессию этих последовательностей кДНК может функционально контролировать промотор сердечного тропонина Т (сTnT), расположенный на 5'-конце первой кДНК, и/или участок внутренней посадки рибосом (IRES), расположенный на 5'-конце второй кДНК. Промотор сTnT ограничивает экспрессию двух трансгенов кардиомиоцитами, когда AAV вводят через кровоток в сердце и другие ткани или путем прямой инъекции. Возникающая в результате экспрессия ARC предотвращает апоптоз при экспрессии в кардиомиоцитах и помогает нормализовать мембранный потенциал митохондрий, уменьшая образование свободных радикалов и улучшая функцию митохондрий. Экспрессия S100A1 приводит к улучшению перекачки кальция в саркоплазматический ретикулум (CP) кардиомиоцитов с помощью  $Ca^{2+}$ -АТФазного насоса сарко/эндоплазматического ретикулума (SERCA) (например, насоса SERCA, изоформа 2a, или SERCA2a) и уменьшению утечки кальция из CP через канал рецептора рианоина. Комбинация позволяет нормализовать обработку кальция кардиомиоцитами и улучшить систолическую и диастолическую функции сердца.

Комбинированные эффекты отсутствия апоптотических эффектов, улучшения митохондриальной функции и улучшения обработки кальция замедляют прогрессирование сердечной недостаточности и улучшают сердечную функцию. Раскрытые векторы на основе gAAV могут быть эффективны при всех формах кардиомиопатии и сердечной недостаточности у человека. Таким образом, раскрытые векторы на основе gAAV можно доставлять субъекту, например, человеку, страдающему от заболевания, нарушения или состояния, включающего плохую сердечную функцию, например, кардиомиопатию и сердечную недостаточность человека.

Таким образом, в некоторых аспектах настоящего раскрытия предлагаются векторы на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (gAAV) для доставки трансгенов в сердце субъекта. В некоторых вариантах осуществления такие векторы на основе gAAV содержат, по меньшей мере, два трансгена, один, кодирующий белки семейства S100, и один, кодирующий ингибитор апоптоза. Такие векторы на основе gAAV могут содержать, последовательно от 5' к 3', первую последовательность инвертированного концевого повтора (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), промотор, функционально связанный с трансгенами, и вторую последовательность инвертированного концевого повтора (ITR) AAV. В некоторых вариантах осуществления два трансгена функционально связаны с одним и тем же промотором. В других вариантах осуществления каждый трансген функционально связан с отдельным промотором. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе gAAV также содержит, по меньшей мере, один сигнал полиаденилирования (например, в положении 3' двух трансгенов, экспрессируемых с одного промотора, или в положении 3' одного или обоих трансгенов, экспрессируемых с разных промоторов). В аспектах раскрытия, таким образом, предлагаются векторы на основе нуклеиновой кислоты рекомбинантного аденоассоциированного вируса (gAAV) для доставки двух или более трансгенов в сердце субъекта, где указанные векторы содержат, от 5' к 3', первую последовательность инвертированного концевого повтора (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), два или более трансгена и промотор, функционально связанный с двумя или более трансгенами, сигнал полиаденилирования и вторую последовательность инвертированного концевого повтора (ITR) AAV, где два или более трансгенов кодируют белок семейства S100 и ингибитор апоптоза, соответственно.

Трансгены по настоящему раскрытию могут кодировать белок семейства S100 и/или ингибитор апоптоза. Например, белок семейства S100 может включать сердечный кальций-связывающий белок S100 A1 (сS100A1), или его вариант. В другом примере ингибитор апоптоза может включать сердечный репрессор апоптоза с доменом рекрутирования каспазы (сARC) или его вариант.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько трансгенов по настоящему раскрытию являются природными последовательностями или последовательностями дикого типа. В некоторых вариантах осуществления один или несколько трансгенов (например, трансген сARC) оптимизированы по кодонам для экспрессии у людей.

В различных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются векторы на основе gAAV, содержащие промотор, сигнал полиаденилирования (полиА) и полинуклеотид, содержащий два или более трансгенов. В некоторых вариантах осуществления первый трансген кодирует белок семейства S100 (например, сS100A1 или его вариант), а второй трансген кодирует сARC. В конкретных вариантах осуществления трансгены белка семейства S100 и сARC получены от людей (например, homo sapiens). В конкретных вариантах осуществления трансгены белка семейства S100 и сARC получены от псовых (например, canis lupus familiaris).

В некоторых вариантах осуществления первый трансген (кодирующий белок семейства S100) полинуклеотида содержит нуклеотидную последовательность, представленную в виде SEQ ID NO: 5. Аль-

тернативно, первый трансген может содержать нуклеотидную последовательность, представленную в виде SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления, первый трансген может содержать нуклеотидную последовательность, представленную в виде SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления первый трансген может содержать нуклеотидную последовательность, представленную в виде SEQ ID NO: 26.

Таким образом, в настоящем документе предлагаются векторы на основе нуклеиновой кислоты gAAV для доставки двух или более трансгенов в сердце субъекта, где указанные векторы содержат, последовательно от 5' до 3', первую последовательность инвертированного концевой повтора (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), два или более трансгенов и промотор, функционально связанный с двумя или более трансгенами, сигнал полиаденилирования (полиА) и вторую последовательность инвертированного концевой повтора (ITR) AAV, где два или более трансгенов кодируют белок семейства S100 и ингибитор апоптоза, соответственно, и где трансген, кодирующий белок семейства S100, содержит последовательность, которая является, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99,5% идентичной любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 25 и 26.

В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий белок семейства S100, расположен 5' относительно трансгена, кодирующего ингибитор апоптоза. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий ингибитор апоптоза, расположен 5' относительно трансгена, кодирующего белок семейства S100.

В некоторых вариантах осуществления вектор на основе gAAV кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95% или, по меньшей мере, на 99,5%, идентичную аминокислотным последовательностям из SEQ ID NO: 13 или 14. В некоторых вариантах осуществления, вектор на основе gAAV кодирует белок, содержащий аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 13 или 14. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе gAAV кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, или, по меньшей мере, на 99,5% идентичную аминокислотным последовательностям из SEQ ID NO: 24 или 29. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе gAAV кодирует белок, содержащий аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 24 или 29.

В некоторых вариантах осуществления первый трансген (кодирующий белок семейства S100) может содержать нуклеотидную последовательность, которая, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95% или, по меньшей мере, на 99,5% идентична любой из нуклеотидных последовательностей из SEQ ID NO: 19-21. Первый трансген может содержать нуклеотидную последовательность из любой из SEQ ID NO: 19-21. В конкретных вариантах осуществления первый трансген может содержать нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 21.

В некоторых вариантах осуществления первый трансген (кодирующий белок семейства S100) может содержать нуклеотидную последовательность, которая, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95% или, по меньшей мере, на 99,5% идентична нуклеотидной последовательности из любой из SEQ ID NO: 25 и 26. В некоторых вариантах осуществления первый трансген, кодирующий белок семейства S100, содержит любую из нуклеотидных последовательностей, представленных в виде SEQ ID NO: 25 и 26.

В некоторых вариантах осуществления первый трансген, кодирующий белок семейства S100, содержит последовательность, имеющую сниженное содержание гуанозина (G) и цитозина (C) (G/C), относительно любой из нуклеотидных последовательностей из SEQ ID NO: 5, 8 или 19-20. В некоторых вариантах осуществления содержание G/C снижено на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% или 15% относительно любой из нуклеотидных последовательностей из SEQ ID NO: 5, 8 или 19-20. В некоторых вариантах осуществления содержание G/C снижено приблизительно на 1-15%, 1-10%, 1-5%, 2-10%, 3-15%, 3-10%, 5-15%, 5-10%, 5-13%, 7-15% или 7-10% относительно любой из нуклеотидных последовательностей из SEQ ID NO: 5, 8 или 19-20.

В некоторых вариантах осуществления ингибитором апоптоза является сердечный репрессор апоптоза с доменом рекрутирования каспазы (ARC) или его вариант. В некоторых вариантах осуществления второй трансген, кодирующий ингибитор апоптоза, содержит последовательность, которая, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95% или, по меньшей мере, на 99,5% идентична любой нуклеотидной последовательности из SEQ ID NO: 3, 6, 7 или 15-18. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий ингибитор апоптоза, содержит любую нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 3, 6, 7 или 15-18.

В некоторых вариантах осуществления сигнал полиА содержит нуклеотидную последовательность, которая, по меньшей мере, на 90%, 92,5%, 95%, 98% или 99% идентична нуклеотидной последовательности из SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления сигнал полиА содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 28.

В некоторых вариантах осуществления участок внутренней посадки рибосомы (IRES) присутствует между двумя или более трансгенами (например, между трансгеном S100A1 и трансгеном сARC). В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий белок семейства S100, находится 5' относительно трансгена, кодирующего ингибитор апоптоза. В других вариантах осуществления трансген, кодирующий ингибитор апоптоза, находится 5' относительно трансгена, кодирующего белок семейства S100.

В некоторых вариантах осуществления промотор гAAV представляет собой промотор, ограниченный сердечной тканью. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор, ограниченный сердечной тканью, выбранный из сердечного тропонина C, сердечного тропонина I и сердечного тропонина T (сTnT). В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор, ограниченный сердечной тканью, полученный из гена, выбранного из группы, состоящей из гена тяжелой цепи  $\alpha$ -миозина, гена тяжелой цепи  $\beta$ -миозина, гена легкой цепи 2v миозина, гена легкой цепи 2a миозина, гена CARP, гена сердечного  $\alpha$ -актина, гена сердечного m2-мускаринового рецептора ацетилхолина, ANF, гена сердечной Ca-АТФазы саркоплазматического ретикулула и гена скелетного  $\alpha$ -актина; или является искусственным сердечным промотором, полученным из гена MLC-2v. В некоторых вариантах осуществления промотором является сTnT.

В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV является одноцепочечным. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV является самокомплементарным.

В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV содержит нуклеотидную последовательность, которая, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95% или, по меньшей мере, на 99,5% идентична любой из нуклеотидных последовательностей из SEQ ID NO: 22 и 23. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23.

Далее в настоящем документе предлагаются векторы на основе гAAV, содержащие один или несколько трансгенов (например, трансген S100A1 и трансген cARC), которые обладают улучшенной или усиленной эффективностью упаковки. В некоторых вариантах осуществления трансгены специфичны для homo sapiens или canis lupus familiaris. В некоторых вариантах осуществления эти векторы на основе гAAV обладают улучшенной эффективностью упаковки за счет их более короткой длины, например, за счет укорочения длины последовательности полиА. В некоторых вариантах осуществления эти векторы на основе гAAV имеют улучшенную эффективность упаковки за счет пониженного содержания гуанина/цитозина, например, пониженного содержания G/C, в одном или обоих трансгенах, относительно трансгена дикого типа или трансгена, оптимизированного по кодонам для экспрессии в конкретном организме-хозяине. В некоторых вариантах осуществления векторы на основе гAAV имеют сниженное содержание G/C в первом трансгене (например, трансгене, кодирующем S100A1). Далее предлагаются частицы гAAV, которые были упакованы с любым из этих векторов на основе гAAV. Повышение эффективности упаковки вектора можно измерять путем оценки титра генома вектора из полученной композиции частиц гAAV, упакованных с этим вектором, или любым другим способом, известным в данной области.

В некоторых вариантах осуществления повышенная эффективность упаковки раскрытых векторов приводит к композициям, содержащим повышенные титры частиц гAAV, относительно векторов известного уровня техники, например, повышенные приблизительно от двух до приблизительно пяти раз. В некоторых вариантах осуществления повышенная эффективность упаковки раскрытых векторов приводит к получению композиций, содержащих титры частиц гAAV от  $2 \times 10^{13}$  до  $5 \times 10^{13}$  копий векторного генома/мл (вг/мл).

Далее в настоящем документе предлагаются частицы гAAV, содержащие векторы на основе гAAV, описываемые в настоящем документе, инкапсулированные в капсиды AAV. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV содержит белок капсида, полученный из серотипов AAV1, AAV2, AAV3, AAV6, AAV8, AAVrh.74, AAVrh.10, AAV2/6 или AAV9. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV содержит белок капсида, полученный из серотипа AAVrh. 10. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV содержит белок капсида, полученный из серотипа AAVrh.74.

Другие аспекты настоящего раскрытия включают композиции, содержащие частицы гAAV, описываемые в настоящем документе. Такие композиции можно вводить субъекту для генотерапии сердечного заболевания. Таким образом, некоторые аспекты раскрытия рассматривают способ лечения субъекта, страдающего от заболевания сердца, предусматривающий введение субъекту композиции, содержащей частицы гAAV, или частицу гAAV, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления заболевание сердца вызывает сердечную недостаточность у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, заболевание сердца представляет собой кардиомиопатию. В других вариантах осуществления заболевание сердца представляет собой гипертрофическую кардиомиопатию или дилатационную кардиомиопатию. В других вариантах осуществления заболевание сердца представляет собой острую ишемию. В некоторых вариантах осуществления заболевание сердца представляет собой кардиомиопатию или острую ишемию.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы, предусматривающие введение в клетку (такую как клетка субъекта ex vivo или in vivo) композиции, содержащей частицы гAAV или частицу гAAV, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы, предусматривающие введение in vitro или ex vivo композиции, содержащей частицы гAAV или частицу гAAV, как описано в настоящем документе.

Таким образом, в настоящем документе предлагаются способы лечения заболеваний, состояний или нарушений сердца, таких как кардиомиопатия. В некоторых аспектах, в настоящем документе предлагаются способы лечения субъекта, страдающего от сердечного заболевания, предусматривающие введение субъекту композиции, содержащей частицы гAAV или частицу гAAV, как описано в настоящем документе. Также рассматриваются способы введения *in vitro* и *ex vivo*. Также рассматривается применение любой композиции, содержащей частицы гAAV или частицу гAAV, как описано в настоящем документе, в качестве лекарственного средства.

Композиции по настоящему раскрытию можно вводить субъекту различными путями. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят путем инъекции в сердце субъекта или внутрисосудистой инъекции в коронарные сосуды субъекта. В некоторых вариантах осуществления введение композиции приводит к экспрессии трансгенов (например, двух или более трансгенов) в сердце субъекта. В различных вариантах осуществления стадия введения композиции приводит к улучшению сердечной функции у субъекта, например, к улучшению сердечной функции у субъекта в течение более чем 10 месяцев. В некоторых вариантах осуществления введение приводит к улучшению сердечной функции в течение более чем 12 месяцев, более чем 14 месяцев, более чем 16 месяцев, более чем 17 месяцев, более чем 20 месяцев, более чем 22 месяцев или более чем 24 месяцев. В некоторых вариантах осуществления стадия введения приводит к улучшению сердечной функции у субъекта в течение более чем 10 месяцев.

В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее является человеком. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее представляет собой домашнее животное. В некоторых вариантах осуществления домашнее животное представляет собой собаку или кошку.

#### **Краткое описание чертежей**

Следующие чертежи составляют часть настоящего описания и включены для дополнительной демонстрации некоторых аспектов настоящего раскрытия. Раскрытие можно лучше понять, обратившись к следующему описанию, взятому в совокупности с прилагаемыми чертежами, на которых одинаковые номера позиций обозначают одинаковые элементы:

На фиг. 1 представлена схема конструкции AAV согласно раскрытию. За первым инвертированным терминальным повтором (ITR) AAV следует промотор сердечного тропонина Т (сТпТ), затем последовательность, кодирующая S100 кальций-связывающий белок A1 (сS100A1), за которым следует внутренний сайт связывания рибосомы (IRES), за которым следует последовательность, кодирующая репрессор апоптоза с доменом рекрутирования каспазы (сARC) с последующей последовательностью полиаденилирования (pA) последовательности и вторым ITR AAV.

На фиг. 2 представлена диастолическая МРТ у собаки (по кличке Калвин) с леченной миодистрофией в начале исследования и через несколько недель после доставки генов. Данные подтверждают стабильное или слегка улучшенное ремоделирование сердца с умеренным уменьшением диастолического объема левого желудочка.

На фиг. 3 представлена систолическая МРТ у собаки (по кличке Калвин) с леченной миодистрофией в начале исследования и через несколько недель после доставки генов. Данные подтверждают стабильную или слегка улучшенную систолическую функцию левого желудочка после лечения, с легким снижением систолического объема, предполагающим улучшение сократительной способности и увеличение сердечного выброса левого желудочка.

На фиг. 4 представлены фракция выброса, пиковая деформация и сердечный выброс мышей D2.mdx после лечения AAVrh.10-S100A1/ARC. В течение 24-недельного периода у мышей, которым вводили терапевтический AAV, лучше сохранялись фракция выброса, развитие деформации и сердечный выброс по сравнению с мышами, которым имитировали инъекцию.

На фиг. 5 представлены уровни экспрессии S100A1 и ARC у мышей, получавших рекомбинантный вектор AAVrh.10-S100A1/ARC, и контрольных мышей. Анализ белка (Вестерн-блоттинг) подтвердил, что уровни как S100A1, так и ARC были повышены в леченых тканях по сравнению с контрольными (имитационная инъекция).

На фиг. 6 представлены гистологии кардиомиоцитов контрольных (слева) и леченых (справа, "S100A1.ARC") мышей при 10- и 20-кратном увеличении. Данные гистологии сердца показывают, что леченые мыши проявляли меньшую патологию МДД, включая меньший фиброз мышечной ткани, по сравнению с контрольными сердцами.

На фиг. 7 показано, что первая (из двух) собак с дефицитом дистрофина (собаки с GRMD) по кличке Калвин показала улучшение сердечной функции (измеряемой фракцией выброса) после лечения рекомбинантным AAVrh.10-S100A1/ARC. У обеих инъецированных собак наблюдали улучшение фракции выброса и других сердечных параметров после лечения, что было измерено с помощью МРТ сердца и подтверждено данными эхокардиографии.

На фиг. 8 представлены данные о том, что вторая собака с GRMD по кличке Себастиан показала улучшение сердечной функции после лечения AAVrh.10-S100A1/ARC.

На фиг. 9A-9C показано, что лечение AAV-S100A1/ARC снижало уровни сывороточной креатинкиназы (КК) и предотвращало мышечную атрофию у собак с GRMD. Измерения мышечной массы конеч-

ностей проводили при помощи MPT по площади обеих лап (фиг. 9А), максимальной площади поперечного сечения (CSA) (фиг. 9В) и объему обеих лап (фиг. 9С). Результаты показывают, что масса скелетных мышц либо увеличилась, либо осталась неизменной после кардиотерапии.

На фиг. 10 показано, что уровни циркулирующей креатинкиназы (КК) в скелетных мышцах субъектов с GRMD снижались после инъекции AAVrh.10-S100A1/ARC, что указывает на уменьшение продолжающегося повреждения мышц.

На фиг. 11 показано выравнивание последовательностей между кодон-оптимизированной последовательностью кДНК ARC собаки и кодон-оптимизированной последовательностью кДНК ARC человека. Последовательности соответствуют SEQ ID NO: 15, 16 и 6 сверху вниз.

На фиг. 12 показана выравнивание последовательностей между кодон-оптимизированной и нативной последовательностями кДНК ARC человека. Последовательности соответствуют SEQ ID NO: 17, 18 и 6 сверху вниз.

На фиг. 13 показано выравнивание последовательностей между кодон-оптимизированной и нативной последовательностями кДНК S100A1 человека. Последовательности соответствуют SEQ ID NO: 19, 5 и 8 сверху вниз.

На фиг. 14 показано выравнивание последовательностей между кодон-оптимизированной последовательностью кДНК S100A1 собаки и кодон-оптимизированной последовательностью кДНК S100A1 человека. Последовательности соответствуют SEQ ID NO: 20, 8 и 21 сверху вниз.

На фиг. 15 представлены фракция укорочения и фракция выброса у мышей D2.mdx (n=12) в возрасте 10 месяцев после лечения AAVrh.10-S100A1/ARC в возрасте 1 месяца. Как фракция укорочения, так и фракция выброса существенно не отличались от таковых у мышей дикого типа D2 для мышей, леченных AAVrh.10-S100A1/ARC, в то время как у нелеченых мышей D2.mdx наблюдали значительное снижение функции.

На фиг. 16 представлены объемы и диаметры левого желудочка мышей D2.mdx (n=12) в возрасте 10 месяцев после лечения AAVrh.10-S100A1/ARC в возрасте 1 месяца. Увеличение объема и диаметра, как во время диастолы, так и во время систолы является показателем дилатационной кардиомиопатии. Как объем, так и диаметр существенно не отличались от мышей дикого типа D2 для мышей, леченных AAVrh.10-S100A1/ARC, в то время как у нелеченых мышей D2.mdx наблюдали значительное увеличение обоих параметров.

На фиг. 17 представлен возраст 50% выживаемости мышей D2.mdx.sk\_ utrophin (n=12 в группе в начале исследования), которые начали тренировки в возрасте 6 недель, но не получали лечения до возраста 6 месяцев. В контрольной группе, не получавшей лечения, медиана выживаемости составила 10 месяцев. В группе, получавшей AAVrh.10-ARC, медиана выживаемости составила 14 месяцев, в группе, получавшей AAVrh.10-S100A1, медиана выживаемости составила 16 месяцев, а в группе, получавшей AAVrh.10-S100A1/ARC, медиана выживаемости составила 20 месяцев.

На фиг. 18 представлены изменения фракции выброса с возрастом у популяции нелеченых собак с GRMD (n=10) и изменения фракции выброса у отдельных собак с GRMD, получавших лечение вектором AAVrh.10-S100A1/ARC в возрасте, указанном стрелками (между 3 и 7 месяцами возраста). У всех четырех леченых собак фракция выброса улучшилась после лечения и после этого оставалась стабильной.

На фиг. 19 представлены гистологические данные левого желудочка (окраска гематоксилин-эозин) здорового 1-летнего золотистого ретривера (крайняя левая панель) и собаки с GRMD (WnM3/Калвин), получавшей лечение вектором AAVrh.10-S100A1/ARC в возрасте 7 месяцев (крайняя правая панель). Леченая собака умерла в возрасте 34 месяцев от аспирационной пневмонии, хотя ее сердечная функция была еще в пределах нормы (фиг. 18). Три средние панели показывают гистологию левого желудочка у нелеченых собак с GRMD в возрасте 8, 24 и 30 месяцев. Присутствует выраженный и прогрессирующий фиброз, замещающий мышечную ткань (более темный оттенок). Обратите внимание, что на панелях собак, получавших лечение, в крайнем правом углу гистология не отличается заметно от гистологии нормальной собаки и заметно менее фиброзна и более интактна, чем у нелеченной собаки с GRMD.

На фиг. 20 представлен окрашенный серебром гель SDS-PAGE, демонстрирующий чистоту двух векторов на основе gAAV по настоящему изобретению. SEQ ID NO: 9 показана слева, а SEQ ID NO: 22 показана справа.

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

Настоящее изобретение относится к композициям и способам генотерапии сердечных заболеваний для лечения заболеваний сердца, например, кардиомиопатии, у субъектов людей и собак. Способы настоящего раскрытия относятся к применению частиц рекомбинантного AAV (gAAV) для одновременной доставки и экспрессии двух или более трансгенов. Трансгены по настоящему раскрытию кодируют, по меньшей мере, два класса белков, каждый из которых выполняет определенную функцию для решения различных аспектов заболеваний сердца. Один класс трансгенов кодирует белки, которые регулируют передачу сигналов кальция в кардиомиоцитах, например, белки семейства S100. Другой класс трансгенов кодирует репрессоры апоптоза. В некоторых вариантах осуществления трансгены могут кодировать сердечный кальций-связывающий белок A1 S100 (cS100A1) или его вариант и/или репрессор сердечного апоптоза с доменом рекрутирования каспазы (cARC) или его вариант.

Композиции и способы по настоящему раскрытию основаны по меньшей мере частично на синергическом действии двух трансгенов, например, трансгенов, которые кодируют S100A1 и ARC, соответственно, когда их доставляют и экспрессируют одновременно в сердце субъекта. Белок S100A1 улучшает аспекты обработки кальция, включая нормализацию переходов кальция саркоплазматического ретикулума, что приводит к нормализации сократительной функции. Белок ARC блокирует апоптоз, инициированный митохондриальными и немитохондриальными механизмами (такими как апоптоз, вызванный растяжением), и улучшает функцию митохондрий. Другими словами, S100A1 и ARC воздействуют на два отдельных компонента сердечной недостаточности (дисфункция обработки кальция и апоптоз) с синергическим эффектом, что приводит к более длительному терапевтическим результатам. Дополнительно, композиции и способы по настоящему раскрытию эффективны на любой стадии сердечной недостаточности.

Дополнительно в настоящем документе предлагаются способы создания частиц гAAV, подходящих для доставки трансгенов, например, трансгенов, которые кодируют S100A1 и/или ARC, или их варианты, в сердце субъекта. Такие частицы гAAV могут содержать рекомбинантный геном AAV, содержащий молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие трансгены, где указанные молекулы нуклеиновой кислоты инкапсулированы белками капсида AAV. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат вектор на основе нуклеиновых кислот рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV). Рекомбинантный геном AAV представляет собой одноцепочечную ДНК, которая может дополнительно содержать элементы последовательности, облегчающие интеграцию генома AAV в геном хозяина и экспрессию трансгенов. Например, рекомбинантный геном AAV может содержать тканеспецифические промоторы для обеспечения экспрессии трансгенов в целевых тканях или органах. Такие частицы гAAV можно использовать в композиции для лечения заболеваний сердца.

Таким образом, в настоящем раскрытии дополнительно предлагаются векторы на основе гAAV для доставки трансгенов в сердце субъекта. В некоторых вариантах осуществления раскрытые векторы на основе гAAV содержат, по меньшей мере, два трансгена, один, кодирующий белок семейства S100, и один, кодирующий ингибитор апоптоза. Эти векторы на основе гAAV могут содержать последовательно от 5' к 3' первую последовательность инвертированного концевой повтора (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), промотор, функционально связанный с трансгенами, и вторую последовательность инвертированного концевой повтора (ITR) AAV. В некоторых вариантах осуществления два трансгена функционально связаны с одним и тем же промотором. В других вариантах осуществления каждый трансген функционально связан с отдельным промотором. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV также содержит по меньшей мере один сигнал полиаденилирования (например, в положении 3' от двух трансгенов, экспрессируемых с одного промотора, или в положении 3' от одного или обоих трансгенов, экспрессируемых с разных промоторов).

В раскрытии дополнительно предлагаются векторы на основе нуклеиновой кислоты гAAV для доставки двух или более трансгенов в сердце субъекта. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV содержит ровно два трансгена. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV содержит три трансгена. В некоторых вариантах осуществления указанный вектор содержит от 5' до 3' первую последовательность ITR AAV, два или более трансгенов и промотор, функционально связанный с двумя или более трансгенами, сигнал полиаденилирования, и вторую последовательность ITR AAV. В конкретных вариантах осуществления два или более трансгена содержат первый трансген, кодирующий белок семейства S100, и второй трансген, кодирующий ингибитор апоптоза.

В некоторых вариантах осуществления сигнал полиА содержит сигнальную последовательность бычьего гормона роста (BGH). В некоторых вариантах осуществления сигнал полиА содержит вариант сигнальной последовательности BGH. В некоторых вариантах осуществления сигнал полиА содержит нуклеотидную последовательность, которая отличается от последовательности из SEQ ID NO: 27 на 1, 2, 3, 4, 5 или более чем 5 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления сигнал полиА содержит нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 90%, 92,5%, 95%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления сигнал полиА содержит SEQ ID NO: 27, приведенную ниже. Сигнал полиА BGH:

AGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGT  
GCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTTCTAATAAAATGAGGA  
AATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCA  
GGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCGATAAGGATC (SEQ ID  
NO: 27)

В некоторых вариантах осуществления сигнал полиА содержит вариант (например, минимальный вариант и/или синтетический вариант) сигнала полиА. В некоторых вариантах осуществления вариант сигнала полиА содержит меньше нуклеотидов (например, он короче или меньше), чем сигнал полиА BGH (например, SEQ ID NO: 27). В некоторых вариантах осуществления вариант сигнала полиА содержит последовательность, содержащую последовательность AATAAA и последовательность, богатую

GT/T. В некоторых вариантах осуществления последовательность AATAAA и GT/T-богатая последовательность разделены 22 нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления последовательность AATAAA и GT/T-богатая последовательность разделены 23 нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления сигнал полиА содержит вариант сигнала полиА, как описано в Levitt, et al. (1989), Genes & Dev. 3:1019-1025. В некоторых вариантах осуществления вариант сигнала полиА содержит нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 90%, 92,5%, 95%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления сигнал полиА содержит нуклеотидную последовательность, которая отличается от последовательности SEQ ID NO: 28 на 1, 2, 3, 4, 5 или более чем 5 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления вариант сигнала полиА содержит SEQ ID NO: 28, представленную ниже. В некоторых вариантах осуществления сигнал полиА содержит последовательность, комплементарную любой из SEQ ID NO: 27 или 28.

Вариант сигнала полиА:

AATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTG (SEQ ID NO: 28)

"Трансген", как применяют в настоящем документе, относится к гену или генетическому материалу, который был перенесен из одного организма в другой естественным путем или с помощью любого из ряда способов генетической инженерии. Трансген может кодировать интересующий белок или полипептид (например, S100A1, ARC) или экспрессировать интересующую РНК (например, миРНК или микроРНК). В некоторых вариантах осуществления один вектор на основе гAAV может содержать кодирующую последовательность для одного или нескольких трансгенов. Например, один вектор на основе гAAV может содержать кодирующую последовательность для 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 трансгенов. В некоторых вариантах осуществления векторы на основе гAAV по настоящему раскрытию содержат кодирующую последовательность как S100A1, так и ARC или их варианты. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV дополнительно содержит область, кодирующую белок Rep. Трансгены по настоящему раскрытию кодируют два класса белков, каждый из которых имеет специфическую функцию для решения различных аспектов одного или нескольких сердечных заболеваний. Один класс трансгенов может кодировать белок, который регулирует передачу сигналов кальция в кардиомиоцитах, например, белок семейства S100. Другой класс трансгенов может кодировать репрессоры апоптоза.

Как применяют в настоящем документе, термин "вариант" относится к нуклеиновой кислоте, характеристики которой отличаются от референсной последовательности (например, той, которая встречается в природе). Например, "вариант" является по меньшей мере приблизительно на 70% идентичным, по меньшей мере приблизительно на 80% идентичным, по меньшей мере приблизительно на 90% идентичным, по меньшей мере приблизительно идентичный на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96% идентичным, по меньшей мере приблизительно на 96% идентичным, по меньшей мере приблизительно на 97% идентичным, по меньшей мере приблизительно на 98% идентичным, по меньшей мере приблизительно на 99% идентичным, по меньшей мере приблизительно на 99,5% идентичным или по меньшей мере приблизительно на 99,9% идентичным референсной последовательности (например, нуклеиновой кислоте дикого типа). В некоторых вариантах осуществления референсная последовательность может быть последовательностью дикого типа или природной последовательностью, соответствующей варианту. Например, вариант трансгена представляет собой нуклеиновую кислоту, содержащую одну или несколько замен в нуклеотидах трансгена по сравнению с его последовательностью дикого типа. В некоторых вариантах осуществления референсная последовательность может представлять собой последовательность, оптимизированную по кодонам относительно последовательности дикого типа или природной последовательности, для экспрессии у конкретного субъекта или в ткани, и которая в конфигурации дикого типа или в кодон-оптимизированной конфигурации соответствует варианту. Например, вариант трансгена представляет собой нуклеиновую кислоту, содержащую одну или несколько замен в нуклеотидах трансгена по сравнению с его кодон-оптимизированной оптимизированной последовательностью. Эти замены могут быть молчащими; например, они не изменяют аминокислотную последовательность любого закодированного белка (или иначе приводят к вариантной аминокислотной последовательности).

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются замены в одном или нескольких трансгенах раскрытых векторов, которые не изменяют аминокислотную последовательность кодируемого белка. В некоторых вариантах осуществления такие замены включают замену гуанина (G) или цитозина (C), присутствующих в соответствующей последовательности нуклеиновой кислоты дикого типа и/или кодон-оптимизированной последовательности нуклеиновой кислоты, на другой нуклеотид (например, аденин (A) или тирозин (T)); или, для замены G, C; или, для замены C, G). Такие замены уменьшают количество нуклеотидов G и/или C, присутствующих в вариантной последовательности нуклеиновой кислоты (например, вариантном трансгене), относительно последовательности нуклеиновой кислоты дикого типа (например, нативной, немодифицированной) и/или кодон-оптимизированной последовательности нуклеиновой кислоты. Таким образом, такие замены приводят к "снижению содержания GC" в вариантной последовательности нуклеиновой кислоты относительно соответствующей после-



некоторых вариантах осуществления содержание GC в вариантной последовательности нуклеиновой кислоты S100A1 собаки снижено на 4% относительно оптимизированной по кодонам последовательности нуклеиновой кислоты S100A1 собаки (например, SEQ ID NO: 21).

В некоторых вариантах осуществления содержание G в вариантной последовательности нуклеиновой кислоты S100A1 собаки снижено приблизительно на 4 нуклеотида G относительно числа нуклеотидов G, присутствующих в оптимизированной по кодонам последовательности нуклеиновой кислоты S100A1 собаки (например, SEQ ID NO: 21). В некоторых вариантах осуществления содержание G в вариантной последовательности нуклеиновой кислоты S100A1 собаки снижено приблизительно на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 нуклеотидов G относительно числа нуклеотидов G, присутствующих в оптимизированной по кодонам последовательности нуклеиновой кислоты S100A1 собаки (например, SEQ ID NO: 21). В некоторых вариантах осуществления содержание C в вариантной последовательности нуклеиновой кислоты S100A1 собаки снижено приблизительно на 5 нуклеотидов C относительно числа нуклеотидов C, присутствующих в оптимизированной по кодонам последовательности нуклеиновой кислоты S100A1 собаки (например, SEQ ID NO: 21). В некоторых вариантах осуществления содержание GC в вариантной последовательности нуклеиновой кислоты S100A1 собаки снижено на 4 нуклеотида G и/или 5 нуклеотидов C относительно числа нуклеотидов G и C, присутствующих в оптимизированной по кодонам последовательности нуклеиновой кислоты S100A1 собаки (например, SEQ ID NO: 21).

В некоторых вариантах осуществления вариантная последовательность нуклеиновой кислоты S100A1 собаки имеет содержание GC приблизительно 50-55% (например, 50-55% нуклеотидов в последовательности нуклеиновой кислоты составляют нуклеотиды G или C). В некоторых вариантах осуществления вариантная последовательность нуклеиновой кислоты S100A1 собаки имеет содержание GC приблизительно 30-35%, 35-40%, 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65% или 65-70%. В некоторых вариантах осуществления вариантная последовательность нуклеиновой кислоты S100A1 собаки имеет содержание GC равное 50%. В некоторых вариантах осуществления вариантная последовательность нуклеиновой кислоты S100A1 собаки имеет содержание GC равное 51%. В некоторых вариантах осуществления вариантная последовательность нуклеиновой кислоты S100A1 собаки имеет содержание GC равное 52%. В некоторых вариантах осуществления вариантная последовательность нуклеиновой кислоты S100A1 собаки имеет содержание GC равное 53%. В некоторых вариантах осуществления вариантная последовательность нуклеиновой кислоты S100A1 собаки имеет содержание GC равное 54%. В некоторых вариантах осуществления вариантная последовательность нуклеиновой кислоты S100A1 собаки имеет содержание GC равное 55%.

В некоторых вариантах осуществления, где вектор на основе gAAV содержит один или несколько вариантных трансгенов (например, первый трансген, кодирующий вариантный белок S100A1) со сниженным содержанием GC относительно соответствующей референсной последовательности нуклеиновой кислоты (например, кодон-оптимизированной или дикого типа), вектор на основе gAAV также будет иметь сниженное содержание GC относительно вектора на основе gAAV, содержащего два трансгена (например, первый трансген, кодирующий вариантный белок S100A1, и второй трансген, кодирующий вариантный белок ARC), которые не имеют сниженного содержания GC. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе gAAV со сниженным содержанием GC представляет собой одну из SEQ ID NO: 22 или 23, и соответствующий вектор на основе gAAV, который не имеет сниженного содержания GC, представляет собой любую из SEQ ID NO: 9-12. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе gAAV со сниженным содержанием GC содержит последовательность, имеющую 100% идентичность с SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 23. В других вариантах осуществления вектор на основе gAAV со сниженным содержанием GC имеет по меньшей мере приблизительно 70% идентичности, по меньшей мере приблизительно 80% идентичности, по меньшей мере приблизительно 90% идентичности, по меньшей мере приблизительно 95% идентичности, по меньшей мере приблизительно 96% идентичности, по меньшей мере приблизительно 97% идентичности, по меньшей мере приблизительно 98% идентичности, по меньшей мере приблизительно 98% идентичности, по меньшей мере приблизительно 99% идентичности, по меньшей мере приблизительно 99,5% идентичности или по меньшей мере приблизительно 99,9% идентичности с SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 23.

В некоторых вариантах осуществления вариантный трансген представляет собой нуклеиновую кислоту, содержащую одну или несколько делеций в нуклеотидах трансгена по сравнению с его последовательностью дикого типа. Эти делеции могут быть молчащими; например, они не изменяют аминокислотную последовательность любого закодированного белка (или иначе приводят к вариантной аминокислотной последовательности). В некоторых вариантах осуществления делеции, которые не изменяют аминокислотную последовательность кодируемого белка, включают делеции одного или нескольких нуклеотидов в сигнале полиаденилирования (ПА) вектора на основе gAAV по сравнению с соответствующим вектором на основе gAAV, который не содержит таких делеций. Таким образом, такие делеции

приводят к сигналу ПА, который содержит меньше нуклеотидов (например, он меньше, короче или усечен) относительно соответствующего вектора на основе гAAV, который не содержит таких делеций. Делеция нуклеотидов в сигнале ПА (например, укороченный сигнал ПА) в последовательности нуклеиновой кислоты (например, в последовательности вектора на основе гAAV) может, таким образом, быть желательной в некоторых вариантах осуществления для уменьшения размера общей самокомплементарной конструкции, чтобы он составлял меньше 5 т.п.н. (включая ITR), что повысит эффективность упаковки.

В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV по настоящему изобретению содержит укороченный сигнал ПА относительно соответствующего вектора на основе гAAV, который не содержит делеций в сигнале ПА. В некоторых вариантах осуществления укороченный сигнал ПА содержит делецию из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 или более чем 200 нуклеотидов в сигнале ПА относительно соответствующего неукороченного сигнала рА. В некоторых вариантах осуществления укороченный сигнал ПА содержит делецию из 1-10, 5-15, 10-20, 15-25, 20-30, 25-35, 30-40, 35-45, 40-50, 50-60, 55-65, 60-70, 65-75, 70-80, 75-85, 80-90, 85-95, 90-100, 95-105, 100-110, 105-115, 105-115, 110-120, 115-125, 120-130, 125-135, 130-140, 135-145, 140-150, 145-155, 150-160, 155-165, 160-170, 165-175, 170-180, 175-185, 180-190, 185-195, 190-200, 195-205 или более чем 200 нуклеотидов относительно соответствующего неукороченного сигнала ПА. В некоторых вариантах осуществления укороченный сигнал ПА содержит делецию приблизительно из 160 или приблизительно из 170 нуклеотидов относительно неукороченного сигнала ПА. В некоторых вариантах осуществления укороченный сигнал ПА содержит делецию из 166 нуклеотидов относительно неукороченного сигнала ПА. В некоторых вариантах осуществления вариантный сигнал полиА содержит нуклеотидную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90%, 92,5%, 95%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления вариантный сигнал полиА содержит SEQ ID NO: 28.

В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV, содержащий укороченный сигнал ПА, представляет собой одну из SEQ ID NO: 22 или 23, и вектор на основе гAAV, который не содержит укороченный сигнал ПА, представляет собой любую из SEQ ID NO: 9-12. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV с укороченным сигналом ПА содержит последовательность, имеющую 100% идентичность с SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 23. В других вариантах осуществления вектор на основе гAAV с укороченным сигналом ПА имеет по меньшей мере приблизительно 70% идентичности, по меньшей мере приблизительно 80% идентичности, по меньшей мере приблизительно 90% идентичности, по меньшей мере приблизительно 95% идентичности, по меньшей мере приблизительно 96% идентичности, по меньшей мере приблизительно 97% идентичности, по меньшей мере приблизительно 98% идентичности, по меньшей мере приблизительно 99% идентичности, по меньшей мере приблизительно 99,5% идентичности или по меньшей мере приблизительно 99,9% идентичности с SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV имеет последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере приблизительно 80% идентичности, 90% идентичности, 95% идентичности, 96% идентичности, 97% идентичности, 98% идентичности, 99% идентичности, 99,5% идентичности или 99,9% идентичности с SEQ ID NO: 22 или NO: 23, за исключением содержания домена, имеющего последовательность по меньшей мере с 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 25 или 26. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV имеет последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере приблизительно 80% идентичности, 90% идентичности, 95% идентичности, 96% идентичности, 97% идентичности, 98% идентичности, 99% идентичности, 99,5% идентичности или 99,9% идентичности с SEQ ID NO: 22 или 23, за исключением содержания домена, имеющего последовательность по меньшей мере на 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 28.

Альтернативно, эти замены могут привести к модификации аминокислотной последовательности кодируемого белка, в результате чего кодируемый белок будет иметь одну или несколько замен аминокислот (например, наличие 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-15 или 15-20 замен аминокислот) относительно последовательности белка дикого типа. Эти замены включают химические модификации, а также укорочения. Этот термин также охватывает функциональные фрагменты последовательности нуклеиновой кислоты дикого типа. Эти модификации референсной последовательности могут встречаться на 5'- или 3'-концах референсной последовательности или в любом месте между этими положениями, чередуясь либо индивидуально среди нуклеотидов в референсной последовательности, либо в одной или нескольких непрерывных группах внутри референсной последовательности.

С практической точки зрения, является ли какая-либо конкретная молекула нуклеиновой кислоты или полипептида, по меньшей мере, на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной, например, нуклеотидной последовательности трансгена, или закодированного белка, можно определять обычным образом с помощью известных компьютерных программ. Предпочтительный способ определения наилучшего общего соответствия между запрашиваемой последовательностью (например, последовательностью по настоящему раскрытию) и индивидуальной последовательностью, также обозначаемый как глобальное выравнивание последовательностей, можно определять с помощью FASTDB или компьютерной программы blastn, основанной на алгоритме Brutlag et al. (Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990)).

При выравнивании последовательностей запрашиваемая последовательность и индивидуальная последовательность являются либо нуклеотидными последовательностями, либо аминокислотными последовательностями. Результат указанного глобального выравнивания последовательностей выражают в виде процента идентичности. Оптимальные параметры, используемые при выравнивании аминокислот FASTDB: матрица=РАМ 0, участок максимального совпадения=2, штраф за несоответствие=1, штраф за присоединение=20, длина группы рандомизации=0, пороговый балл=1, размер окна=длина последовательности, штраф за пропуск=5, штраф за размер пропуска=0,05, размер окна=500 или длина индивидуальной аминокислотной последовательности, в зависимости от того, что короче. Совпадают/выровнены ли нуклеотиды или полипептиды, определяют по результатам выравнивания последовательностей в FASTDB. Это процентное содержание затем вычитают из идентичности, рассчитанной вышеуказанной программой FASTDB с использованием указанных параметров, чтобы получить окончательный процент идентичности. Этот окончательный процентный показатель идентичности используют для целей настоящего раскрытия. Для индивидуальных последовательностей, укороченных на 5'- и/или 3'-концах относительно запрашиваемой последовательности, процент идентичности корректируют путем подсчета количества нуклеотидов запрашиваемой последовательности, расположенных 5' или 3' относительно запрашиваемой последовательности, которые не совпадают/выравниваются с соответствующими нуклеотидами индивидуальной последовательности, в виде процента от общего числа оснований запрашиваемой последовательности. Подобные способы можно использовать для сравнения аминокислотных последовательностей.

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

В некоторых вариантах осуществления белок семейства S100 может представлять собой кальций-связывающий белок А1 S100 (S100A1). В некоторых вариантах осуществления S100A1 представляет собой сердечный S100A1 (сS100A1) или его вариант. Белок сS100A1 является регулятором сократительной способности миокарда. Уровни белка сS100A1 снижены в гипертрофированной ткани правого желудочка в модели легочной гипертензии. Кроме того, S100A1 является регулятором генетической программы, лежащей в основе гипертрофии сердца, поскольку S100A1 ингибирует альфа 1-адренергическую стимуляцию генов гипертрофии, включая MYH7, ACTA1 и S100B.

В кардиомиоцитах S100A1 регулирует кальций-контролируемую сеть СР, саркомерную и митохондриальную функции посредством модуляции активности рецептора рианодина 2 (RYR2), Ca<sup>2+</sup>-АТФазы сарко/эндоплазматического ретикулума (SERCA), титина и митохондриальной F1-АТФазы. В результате, кардиомиоциты и сердца с повышенной экспрессией S100A1 демонстрируют повышенную систолическую и диастолическую производительность в результате улучшения переходных амплитуд Ca<sup>2+</sup> за счет увеличения загрузки СР Ca<sup>2+</sup> и последующего систолического высвобождения Ca<sup>2+</sup> вместе со снижением диастолической утечки Ca<sup>2+</sup> в СР и усиленной повторной секвестрацией Ca<sup>2+</sup>. Одновременно я, S100A1 увеличивает выработку митохондриального высокоэнергетического фосфата и, таким образом, координирует поступление энергии с повышенным спросом на аденозин 5'-трифосфат (АТФ) за счет усиленного оборота Ca<sup>2+</sup> в кардиомиоцитах. Снижение экспрессии S100A1 в кардиомиоцитах связано со снижением сократительной функции, что подтверждает патофизиологическую значимость этого белка.

В некоторых вариантах осуществления последовательность полинуклеотидов кДНК S100A1 (трансгена) любого из раскрытых векторов на основе gAAV имеет 100% идентичность с природной последовательностью S100A1. В некоторых вариантах осуществления природная последовательность S100A1 получена от человека. В некоторых вариантах осуществления природная последовательность S100A1 получена от собак. В других вариантах осуществления последовательность кДНК S100A1 имеет по меньшей мере приблизительно 70% идентичности, по меньшей мере приблизительно 80% идентичности, по меньшей мере приблизительно 90% идентичности, по меньшей мере приблизительно 95% идентичности, по меньшей мере приблизительно 96% идентичности, по меньшей мере приблизительно 97% идентичности, по меньшей мере приблизительно 98% идентичности, по меньшей мере приблизительно 99% идентичности, по меньшей мере приблизительно 99,5% идентичности или по меньшей мере приблизительно 99,9% идентичности с природной последовательностью S100A1.

В некоторых вариантах осуществления последовательность кДНК S100A1 оптимизирована по кодонам для экспрессии в клетках человека. В некоторых вариантах осуществления последовательность кДНК (трансгена) S100A1 содержит последовательность, имеющую 100% идентичность с SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе gAAV содержит трансген S100A1, который содержит SEQ ID NO: 8, представляющую собой последовательность, оптимизированную по кодонам для экспрессии у людей. В некоторых вариантах осуществления последовательность кДНК S100A1 представляет собой последовательность SEQ ID NO: 25, которая представляет собой последовательность, оптимизированную по кодонам для экспрессии у людей и дополнительно имеющую пониженное содержание гуанина и цитозина (G/C). В других вариантах осуществления по-

следовательность кДНК S100A1 имеет по меньшей мере приблизительно 70% идентичности, по меньшей мере приблизительно 80% идентичности, по меньшей мере приблизительно 90% идентичности, по меньшей мере приблизительно 95% идентичности, по меньшей мере приблизительно 96% идентичности, по меньшей мере приблизительно 97% идентичности, по меньшей мере приблизительно 98% идентичности, по меньшей мере приблизительно 99% идентичности, по меньшей мере приблизительно 99,5% идентичности или по меньшей мере приблизительно 99,9% идентичности с SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 25.

В других вариантах осуществления последовательность кДНК S100A1 оптимизирована по кодомам для экспрессии в клетках собак. В некоторых вариантах осуществления последовательность кДНК (трансгена) S100A1 содержит последовательность, имеющую 100% идентичность с SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе gAAV содержит трансген S100A1, который содержит SEQ ID NO: 21, представляющую собой последовательность, оптимизированную по кодомам для экспрессии у собак. В некоторых вариантах осуществления последовательность кДНК S100A1 представляет собой последовательность SEQ ID NO: 26, которая является последовательностью, оптимизированную по кодомам для экспрессии у собак и дополнительно имеющую пониженное содержание G/C. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе gAAV содержит последовательность кДНК S100A1, которая имеет по меньшей мере приблизительно 70% идентичности, по меньшей мере приблизительно 80% идентичности, по меньшей мере приблизительно 90% идентичности, по меньшей мере приблизительно 95% идентичности, по меньшей мере приблизительно 96% идентичности, по меньшей мере приблизительно 97% идентичности, по меньшей мере приблизительно 98% идентичности, по меньшей мере приблизительно 99% идентичности, по меньшей мере приблизительно 99,5% идентичности или по меньшей мере приблизительно 99,9% идентичности с SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 26.

Неограничивающие примеры последовательностей кДНК S100A1 изложены далее.

Нативный S100A1 (homo sapiens)

```
ATGGGGCTCTGAGCTGGAGACGGCGATGGAGACCCTCATCAACGTGTTCCACG
CCCACTCGGGCAAAGAGGGGGACAAGTACAAGCTGAGCAAGAAGGAGCTGAAAGA
GCTGCTGCAGACGGAGCTCTCTGGCTTCCTGGATGCCCAGAAGGATGTGGATGCTGT
GGACAAGGTGATGAAGGAGCTAGACGAGAATGGAGACGGGGAGGTGGACTTCCAG
GAGTATGTGGTGTGTTGGCTGCTCTCACAGTGGCCTGTAACAATTTCTTCTGGGAG
AACAGTTGA (SEQ ID NO: 5)
```

Оптимизированный S100A1 (homo sapiens)

```
ATGGGGCAGCGAGCTGGAGACCGCCATGGAGACCCTGATCAACGTGTTCCACG
CCCAACAGCGGCAAGGAGGGCGACAAGTACAAGCTGAGCAAGAAGGAGCTGAAGGA
GCTGCTGCAGACCGAGCTGAGCGGCTTCCTGGACGCCCAGAAGGACGTGGACGCCG
TGGACAAGGTGATGAAGGAGCTGGACGAGAACGGCGACGGCGAGGTGGACTTCCA
GGAGTACGTGGTGTGTTGGCCGCCCTGACCGTGGCCTGCAACAATTTCTTCTGGGA
GAACAGCTGA (SEQ ID NO: 8)
```

Оптимизированный S100A1 со сниженным содержанием G/C (homo sapiens)

```
ATGGGGCTCTGAGCTGGAGACCGCCATGGAGACCCTGATCAATGTGTTCCACG
CCCACTCTGGCAAGGAGGGCGATAAGTACAAGCTGTCTAAGAAGGAGCTGAAGGAG
CTGCTGCAGACCGAGCTGTCTGGCTTCCTGGATGCCCAGAAGGATGTGGATGCCGTG
GATAAGGTGATGAAGGAGCTGGATGAGAATGGCGATGGCGAGGTGGATTCCAGGA
GTACGTGGTGTGTTGGCCGCCCTGACCGTGGCCTGCAATAATTTCTTCTGGGAGAA
TTCTTGA (SEQ ID NO: 25)
```

Выравнивание нуклеотидных последовательностей между кодон-оптимизированной последовательностью кДНК S100A1 человека и нативной последовательностью кДНК S100A1 человека (SEQ ID NO: 8 и 5, соответственно) показано на фиг. 13.

Для справки, некоторые неограничивающие примеры полученных от животных последовательностей кДНК S100A1 описаны ниже. Выравнивание нуклеотидных последовательностей между кодон-оптимизированной последовательностью кДНК S100A1 собаки и кодон-оптимизированной последовательностью кДНК S100A1 человека (SEQ ID NO: 21 и 8, соответственно) показано на фиг. 14. SEQ ID NO: 26, которая представляет собой кодон-оптимизированную последовательность S100A1 собаки со сниженным содержанием G/C, изложена ниже.

Нативный S100A1 (*canis lupus familiaris*) (референсная последовательность NCBI: XM\_005622816.2)  
ATGGGGCTCTGAGCTGGAGACAGCGATGGAGACTCTCATCAATGTGTTCCATG

CCCACACTCGGGCAAGGAGGGAAACAAGTACAAGCTGAGCAAGAAGGAGCTAAAGGA  
GCTGCTGCAGACTGAGCTCTCCGGCTTCTGGACGCCAGAAAGGATGCGGATGCTGT  
GGACAAGGTGATGAAAGAGCTAGATGAGAATGGAGATGGGGAGGTGGACTTCCAG  
GAGTATGTGGTGTGGTGGCTGCCCTCACAGTGGCCTGTAACAACCTTCTTCTGGGAA  
AACAGTTGA (SEQ ID NO: 1)

Оптимизированный S100A1 (*canis lupus familiaris*)

ATGGGCAGCGAGCTGGAGACCGCCATGGAGACCCTGATCAACGTGTTCCACG  
CCCACAGCGGCAAGGAGGGCAACAAGTACAAGCTGAGCAAGAAGGAGCTGAAGGA  
GCTGCTGCAGACCGAGCTGAGCGGCTTCTGGACGCCAGAAAGGACGCCGACGCCG  
TGGACAAGGTGATGAAGGAGCTGGACGAGAACGGCGACGGCGAGGTGGACTTCCA  
GGAGTACGTGGTGTGGTGGCCGCCCTGACCGTGGCCTGCAACAACCTTCTTCTGGGA  
GAACAGCTGA (SEQ ID NO: 21)

Оптимизированный S100A1 со сниженным содержанием G/C (*canis lupus familiaris*)

ATGGGGCTCTGAGCTGGAGACCGCCATGGAGACCCTGATCAATGTGTTCCACG  
CCCACAGCGGCAAGGAGGGCAATAAGTACAAGCTGTCTAAGAAGGAGCTGAAGGA  
GCTGCTGCAGACCGAGCTGTCTGGCTTCTGGACGCCAGAAAGGACGCCGACGCCG  
TGGACAAGGTGATGAAGGAGCTGGACGAGAATGGCGACGGCGAGGTGGACTTCCA  
GGAGTACGTGGTGTGGTGGCCGCCCTGACCGTGGCCTGCAATAATTTCTTCTGGGA  
GAATTCTTGA (SEQ ID NO: 26)

Нативный S100A1 (*felis catus*) (референсная последовательность NCBI: XM\_003999773.3)

ATGGGGCTCAGAGCTGGAGACGGCGATGGAGACTCTCATCAACGTGTTCCACG  
CCCACACTCGGGCAAGGAGGGAGACAAGTACAAGCTGAGCAAGAAGGAGCTAAAAGA  
GCTGCTGCAGACCGAGCTCTCTGGCTTCTGGACGCCAGAAAGGATGCCGACGCTGT  
GGACAAGGTGATGAAAGAGCTAGACGAGAATGGAGATGGGGAGGTGGACTTCCAA  
GAGTATGTGGTGTGGTGGCTGCCCTCACAGTGGCCTGTAACAACCTTTTTCTGGGAG  
AACAGTTGA (SEQ ID NO: 2)

В аспектах по настоящему раскрытию предлагаются композиции и способы, которые предусматривают доставку трансгена, кодирующего ингибитор апоптоза (например, противоапоптозный агент). Иллюстративные примеры ингибиторов апоптоза включают *fink*, *p35*, *crmA*, *Bcl-2*, *Bcl-XL*, *Mcl-1*, *E1B-19K* из аденовируса, а также антагонисты проапоптотических агентов (например, бессмысловые последовательности, рибозимы, антитела и т.д.). В некоторых вариантах осуществления ингибитором апоптоза является сердечный репрессор апоптоза с доменом рекрутирования каспазы (ARC) или его вариант. В других вариантах осуществления ингибитором апоптоза является сердечный ARC или его вариант. В некоторых вариантах осуществления может быть желательным доставлять белок семейства S100 и ингибитор апоптоза отдельно. В некоторых вариантах осуществления, трансген, кодирующий белок семейства S100, доставляют одновременно или последовательно с одним или несколькими низкомолекулярными ингибиторами апоптоза. Другие предполагаемые низкомолекулярные ингибиторы апоптоза включают ингибиторы *c-Myc*, ингибиторы *Wax*, ингибиторы *p53*, ингибиторы *tBid*, ингибиторы каспаз и ингибиторы проапоптотических представителей семейства BCL-2.

*cARC* представляет собой апоптотический регуляторный белок, который экспрессируется почти исключительно в миогенных клетках. Он содержит домен рекрутирования каспазы (CARD), через который он блокирует активацию некоторых инициаторных каспаз. ARC также блокирует каспаза-независимые события, связанные с апоптозом. Апоптоз, вызванный острой ишемией и последующим ремоделированием желудочков, рассматривают как медиатор сердечной недостаточности. Хотя постишемическая сердечная недостаточность может иметь несколько причин, в последнее время внимание было направлено на понимание вклада апоптоза или программируемой гибели клеток. Апоптоз характеризуется сохранением митохондриальной и сарколеммальной мембран, конденсацией ядерного хроматина и фагоцитозом макрофагами или соседними клетками без запуска воспалительного ответа. Активация апоптоза, как известно, происходит посредством механизмов, включающих каспазы, семейство цистеиновых протеаз,

которые синтезируются в виде неактивных предшественников и протеолитически расщепляются до активной формы. ARC способен блокировать активацию апоптоза путем блокирования каспаз.

Таким образом, в некоторых аспектах в настоящем документе предлагаются векторы на основе гAAV (или векторы на основе нуклеиновой кислоты гAAV), содержащие полинуклеотиды, которые содержат последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99,5% идентична любой нуклеотидной последовательности из SEQ ID NO: 6-8, 16, 21, 25 и 26. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность отличается от последовательности по любой из SEQ ID NO: 6-8, 16, 21, 25 и 26 на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более чем 12 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность содержит участки приблизительно 35, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280 или 285 последовательных нуклеотидов, общих с любой из SEQ ID NO: 6-8, 16, 21, 25 и 26. В конкретных вариантах осуществления любой из раскрытых векторов на основе гAAV содержит полинуклеотид, который содержит любую из SEQ ID NO: 6-8, 16, 21, 25 и 26.

В некоторых вариантах осуществления раскрытые последовательности транскриптов сARC и S100 содержат укорочения на 5'- или 3'-конце относительно последовательности дикого типа или кодонно-оптимизированной последовательности. В некоторых вариантах осуществления раскрытые последовательности транскриптов содержат укорочения на 5'- или 3'-конце относительно SEQ ID NO: 1,3, 5-8 и 15-21. В некоторых вариантах осуществления транскрипт содержит нуклеотидную последовательность, которая отличается от последовательности любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5-8 и 15-21 на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более чем 12 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления транскрипт содержит участки приблизительно 35, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 575 или 600 последовательных нуклеотидов, общих с любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5-8 и 15-21.

В некоторых вариантах осуществления последовательность полинуклеотидов кДНК сердечного ARC (или транскрипта) из раскрытых векторов на основе гAAV имеет 100% идентичности природной последовательности сARC. В других вариантах осуществления последовательность кДНК сARC имеет по меньшей мере приблизительно 70% идентичности, по меньшей мере приблизительно 80% идентичности, по меньшей мере приблизительно 90% идентичности, по меньшей мере приблизительно 95% идентичности, по меньшей мере приблизительно 96% идентичности, по меньшей мере приблизительно 97% идентичности, по меньшей мере приблизительно 98% идентичности, по меньшей мере приблизительно 99% идентичности, по меньшей мере приблизительно 99,5% идентичности или по меньшей мере приблизительно 99,9% идентичности с природной последовательностью сARC. В некоторых вариантах осуществления природная последовательность сARC получена от человека. В некоторых вариантах осуществления природная последовательность сARC получена от собак.

В конкретных вариантах осуществления последовательность кДНК сARC оптимизирована по кодонам для экспрессии в клетках человека. В некоторых вариантах осуществления последовательность кДНК сARC (транскрипта) содержит последовательность, имеющую 100% идентичности с SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7. В других вариантах осуществления последовательность кДНК сARC имеет по меньшей мере приблизительно 70% идентичности, по меньшей мере приблизительно 80% идентичности, по меньшей мере приблизительно 90% идентичности, по меньшей мере приблизительно 95% идентичности, по меньшей мере приблизительно 96% идентичности, по меньшей мере приблизительно 97% идентичности, по меньшей мере приблизительно 98% идентичности, по меньшей мере приблизительно 99% идентичности, по меньшей мере приблизительно 99,5% идентичности или по меньшей мере приблизительно 99,9% идентичности с SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7.

В других вариантах осуществления последовательность кДНК сARC оптимизирована по кодонам для экспрессии в клетках собак. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV содержит последовательность кДНК сARC, которая имеет по меньшей мере приблизительно 70% идентичности, по меньшей мере приблизительно 80% идентичности, по меньшей мере приблизительно 90% идентичности, по меньшей мере приблизительно 95% идентичности, по меньшей мере приблизительно 96% идентичности, по меньшей мере приблизительно 97% идентичности, по меньшей мере приблизительно 98% идентичности, по меньшей мере приблизительно 99% идентичности, по меньшей мере приблизительно 99,5% идентичности или по меньшей мере приблизительно 99,9% идентичности с SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV содержит SEQ ID NO: 16.

Неограничивающие примеры последовательностей кДНК сARC описаны ниже.

Нативная последовательность кДНК ARC (*homo sapiens*) показана в SEQ ID NO: 18.

Оптимизированный ARC (homo sapiens)

ATGGGCAACGCCAGGAGCGGCCAGCGAGACCATCGACCGGGAGCGGAAG  
 CGGCTGGTGGAGACCCTGCAGGCCGACAGCGGCCTGCTGCTGGACGCCCTGCTGGC  
 CCGGGGCGTGCTGACCGGCCCGAGTACGAGGCCCTGGACGCCCTGCCCGACGCCG  
 AGCGGCGGGTGCGGCGGCTGCTGCTGCTGGTGCAGGGCAAGGGCGAGGCCGCCTGC  
 CAGGAGCTGCTGCGGTGCGCCAGCGGACCGCCGGCGCCCCGACCCCGCCTGGGA  
 CTGGCAGCACGTGGGCCCCGGCTACCGGGACCGGAGCTACGACCCCCCTGCCCG  
 GCCACTGGACCCCCGAGGCCCGGCAGCGGCACCACCTGCCCGGCCTGCCCGG  
 GCCAGCGACCCCGACGAGGCCGGCGGCCCGAGGGCAGCGAGGCCGTGCAGAGCG  
 GCACCCCGAGGAGCCGAGCCCGAGCTGGAGGCCGAGGCCAGCAAGGAGGCCGA  
 GCCCGAGCCCGAGCCCGAGCCCGAGCTGGAGCCCGAGGCCGAGGCCGAGCCCGAG  
 CCCGAGCTGGAGCCCGAGCCCGACCCCGAGCCCGAGCCCGACTTCGAGGAGCGGGA  
 CGAGAGCGAGGACAGCTGA (SEQ ID NO: 6)

Оптимизированный ARC (homo sapiens)

ATGGGGAATGCCAAGAAAGGCCTTCTGAGACTATAGACCGCGAGCGCAAG  
 AGGCTTGTAGAAACCTTGCAGGCGGACTCTGGTCTCTTGTGGACGCTCTGCTTGGC  
 CGGGGTGTTCTGACTGGACCGGAGTACGAAGCATTGGATGCCCTTCCTGATGCAGA  
 GAGACGAGTTAGACGCCTGTTGCTTCTTGTGCAAGGCAAGGGTGAAGCCGCCTGTC  
 AAGAGCTCCTGAGGTGTGCTCAACGAACCGCCGGGGCGCCAGATCCGGCATGGGAT  
 TGGCAACATGTGGGGCCCCGGCTATCGGGACCGGAGCTACGATCCACCATGCCCGGG  
 TCATTGGACGCCGGAGGCTCCAGGATCTGGTACAACATGCCCAGGACTCCCAAGAG  
 CCAGTGACCCCGATGAAGCTGGAGGCCCGAGGGCAGTGAAGCCGTACAGAGCGGT  
 ACCCCAGAAGAACCAGAACCGGAGCTGGAGGCTGAAGCTAGTAAAGAGGCGGAAC  
 CTGAACCCGAACCGGAGCCTGAGCTCGAGCCAGAGGCTGAGGCCGAGCCAGAGCCT  
 GAACTCGAACCCGAACCTGATCCAGAACCAGAGCCCGACTTCGAGGAACGGGATGA  
 GTCAGAGGATTCTTGA (SEQ ID NO: 7).

Выравнивание нуклеотидных последовательностей между кодон-оптимизированной последовательностью кДНК ARC человека и нативной последовательностью кДНК ARC человека (SEQ ID NO: 6 и 18, соответственно) показано на фиг. 12.

Для справки, ниже приведены некоторые неограничивающие примеры последовательностей кДНК ARC, полученных от животных. Выравнивание нуклеотидных последовательностей между кодон-оптимизированной последовательностью кДНК ARC собаки и кодон-оптимизированной последовательностью кДНК ARC человека (SEQ ID NO: 16 и 6, соответственно) показано на фиг. 11.



Нативный ARC (felis catus) (референсная последовательность NCBI: XM\_006941587.2)  
 ATGGGCAATGCGCAGGAGCGGCCCTCAGAGACGATCGATCGCGAGCGGAAA  
 CGCCTAGTGGAGACGCTGCAGGACGACTCCGGGCTGCTGCTGGATGCACTGCTGGC  
 GCGCGGCGTGCTCACCGGGCCTGAGTATGAGGGCGTTGGACGCGCTGCCTGATGCCG  
 AGCGCAGGGTGCCTGCTGCTGCTGGTACAAAGCAAGGGCGAGGCCGCCTGC  
 CAGGAGCTGCTGCACTGCGCCCAGCGTACTACGCGCGCGCCAGACCCGGCCTGGGA  
 CTGGCAGCACGTGGGCACTGGCTACCGGGAACGCAGCTACGACTCTCCATGCCCTG  
 GCCACTGGACGCCTGAGGCACCTGACTTGAGGACCGCTTGCCCCGAAACGCCCAGA  
 GCTTCAGACTGCGACGAGGCTGGGGTTTCAGGGGGCTCGGAGGCAGTATCCGGAAC  
 CCTCGAGGAACCTCGATCCGGAAGTGGAAGCTGAAGTCTCTGAAGGGGCTGAGCCAG  
 AGCCAGAGCCAGAGCCCGACTTTGAGGGCGGGTGATGAGTCTGAAGATTCC (SEQ ID  
 NO: 4).

В других аспектах, два или более трансгенов из любого из раскрытых векторов на основе гAAV содержат трансген, кодирующий доминантно-негативную форму фосфоламбана (или dn-PLN). Фосфоламбан (PLN) является эндогенным ингибитором насоса Ca<sup>2+</sup>+АТФазы 2а сарко/эндоплазматического ретикулума (SERCA2а), который опосредует ионный обратный захват в саркоплазматический ретикулум (СР) кардиомиоцитов. Доминантно-негативной формой является псевдофосфорилированная форма, которая конкурирует за связывание SERCA2а с нативным фосфоламбаном и тем самым снижает его ингибирующее действие на SERCA2а (см. Bish, et al. Hum Gen Ther. 2011; 22(8): 969-977, включена в настоящий документ посредством ссылки). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, второй трансген раскрытых векторов на основе гAAV кодирует dn-PLN. В некоторых вариантах осуществления раскрытые векторы на основе гAAV могут содержать любой из раскрытых трансгенов S100A1 (например, кодон-оптимизированную последовательность S100A1 человека или собаки) и трансген dn-PLN. В некоторых вариантах осуществления раскрытые векторы на основе гAAV могут кодировать и, таким образом, доставлять в клетку белок S100A1 и белок dn-PLN.

В дополнительных аспектах любой из раскрытых векторов на основе гAAV может содержать три или более трансгенов. В некоторых вариантах осуществления векторы на основе гAAV содержат три трансгена. В некоторых вариантах осуществления третий трансген кодирует последовательность dn-PLN. Указанные три трансгена могут включать первый трансген, кодирующий S100A1 собаки (например, кодон-оптимизированную последовательность S100A1 человека или собаки), второй трансген, кодирующий сARC (например, кодон-оптимизированную последовательность сARC человека или собаки), и третий трансген, кодирующий dn-PLN.

В некоторых вариантах осуществления раскрытые векторы на основе гAAV не кодируют белок, полученный от собак или кошек. В некоторых вариантах осуществления ни один из раскрытых векторов не содержит нативной нуклеотидной последовательности, кодирующей S100A1 или ARC кошки или собаки. В некоторых вариантах осуществления раскрытые векторы на основе гAAV не содержат SEQ ID NO: 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления раскрытые векторы на основе гAAV не содержат SEQ ID NO: 3 или 4 или любую из SEQ ID NO: 1-4.

Векторы на основе рекомбинантного AAV (гAAV).

Аспекты настоящего раскрытия относятся к векторам на основе рекомбинантного AAV, которые могут быть использованы для генотерапии заболеваний сердца. Как применяют в настоящем документе, термин "вектор" может относиться к вектору на основе нуклеиновой кислоты (например, плазмиды или рекомбинантного вирусного генома), генома AAV дикого типа или вирусу, который содержит вирусный геном. В некоторых вариантах осуществления термин "вектор" может относиться к частицам вируса, таким как частицы вируса AAV.

Геном дикого типа AAV представляет собой смысловую или антисмысловую последовательность одноцепочечной дезоксирибонуклеиновой кислоты (оцДНК). Геном содержит два инвертированных концевых повтора (ITR), один на каждом конце цепи ДНК, и две открытые рамки считывания (ORF): *rep* и *cap* между ITR. *Rep* ORF содержит четыре перекрывающихся гена, кодирующих белок *Rep*, необходимый для жизненного цикла AAV. *Cap* ORF содержит перекрывающиеся гены, кодирующие капсидные белки: VP1, VP2 и VP3, которые взаимодействуют вместе, образуя вирусный капсид. VP1, VP2 и VP3 транслируются с транскрипта одной мРНК, который может быть сплайсирован двумя различными способами. Может быть вырезан как более длинный, так и более короткий интрон, что приводит к образованию двух изоформ мРНК: ~2,3 т.п.н. и ~2,6 т.п.н. Капсид образуется из надмолекулярной агрегата приблизительно из 60 отдельных капсидных белковых субъединиц безоболочечную икосаэдрическую решетку T-1, способную защищать геном AAV. Зрелый капсид AAV состоит из VP1, VP2 и VP3 (молекулярная масса приблизительно 87, 73 и 62 кДа соответственно) в соотношении приблизительно 1:1:10.

Частицы рекомбинантного AAV (гAAV) могут содержать вектор на основе рекомбинантной нуклеиновой кислоты (далее именуемый как "вектор на основе гAAV"), который может содержать, как минимум: (a) одну или несколько областей гетерологичной нуклеиновой кислоты, содержащих трансген; и (b) одну или несколько областей, содержащих последовательности, которые облегчают интеграцию областей гетерологичной нуклеиновой кислоты (не обязательно с одним или несколькими областями нуклеиновой кислоты, содержащими последовательность, которая облегчает экспрессию) в геном субъекта. В некоторых вариантах осуществления, последовательности, облегчающие интеграцию областей гетерологичной нуклеиновой кислоты (не обязательно с одним или несколькими областями нуклеиновой кислоты, содержащими последовательность, которая облегчает экспрессию) в геном субъекта, представляют собой последовательности инвертированных концевых повторов (ITR) (например, последовательности ITR дикого типа или сконструированные последовательности ITR), фланкирующие один или несколько областей нуклеиновой кислоты (например, областей гетерологичной нуклеиновой кислоты).

В определенных вариантах осуществления, последовательности ITR фланкируют область нуклеиновой кислоты, содержащую два или более трансгенов и промотор, функционально связанный с двумя или более трансгенами и сигнал полиаденилирования (полиА). В некоторых вариантах осуществления последовательности ITR фланкируют область нуклеиновой кислоты, состоящую из двух или более трансгенов и промотора, функционально связанного с двумя или более трансгенами и сигнала полиА.

В некоторых вариантах осуществления вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV содержит один или несколько трансгенов, содержащих последовательность, кодирующую белок или представляющий интерес полипептид, функционально связанную с промотором, где один или несколько трансгенов фланкированы с каждой стороны последовательностью ITR. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе нуклеиновой кислоты дополнительно содержит область, кодирующую белок Rep, как описано в настоящем документе, либо находящуюся в области, фланкированной ITR, либо вне области, или нуклеиновую кислоту, функционально связанную с промотором. Последовательности ITR могут быть получены из любого серотипа AAV (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) или могут быть получены более чем из одного серотипа. В некоторых вариантах осуществления последовательности ITR получены из серотипов AAV2 или AAV6. В некоторых вариантах осуществления первый серотип, предлагаемый в настоящем документе, не является серотипом AAV2 или AAV8. В некоторых вариантах осуществления ITR первого серотипа получены из AAV3, AAV5 или AAV6. В некоторых вариантах осуществления последовательности ITR получены из AAV2, AAV3, AAV5 или AAV6. В некоторых вариантах осуществления последовательности ITR имеют тот же серотип, что и капсид (например, последовательности ITR AAV6 и капсид AAV6 и т.д.). В некоторых вариантах осуществления последовательности ITR получены из серотипа AAVrh.10.

Последовательности ITR и плазмиды, содержащие последовательности ITR, известны в данной области и коммерчески доступны (см., например, продукты и услуги, доступные у Vector Biolabs, Philadelphia, PA; Cellbiolabs, San Diego, CA; Agilent Technologies, Santa Clara, Ca; и Addgene, Cambridge, MA; и Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein. Kessler PD, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 1996 Nov 26;93(24): 14082-7; и Curtis A. Machida. Methods in Molecular Medicine™. Viral Vectors for Gene Therapy Methods and Protocols. 10.1385/1-59259-304-6: 201 © Humana Press Inc. 2003. Chapter 10. Targeted Integration by Adeno-Associated Virus. Matthew D. Weitzman, Samuel M. Young, Jr., Toni Cathomen and Richard Jude Samulski, патенты США № 5139941 и 5962313, все они включены в настоящий документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления гAAV содержит остов плазмиды pTR-UF-11, которая представляет собой плазмиду, содержащую ITR AAV2. Эта плазида является коммерчески доступной из Американской коллекции типовых культур (ATCC MBA-331).

В некоторых вариантах осуществления векторы на основе гAAV по настоящему раскрытию содержат как трансген cS100A1, так и трансген cARC, для одновременной доставки и экспрессии как белка cS100A1, так и cARC у субъекта. Трансген, кодирующий белок семейства S100 (например, cS100A1), может быть расположен 5' по отношению к трансгену, кодирующему ингибитор апоптоза (например, cARC) в составе описанных в настоящем документе векторов на основе нуклеиновой кислоты гAAV. Альтернативно, трансген, кодирующий ингибитор апоптоза может быть расположен 5' по отношению к трансгену, кодирующему белок семейства S100 в составе описанных векторов на основе нуклеиновой кислоты гAAV.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV содержит одну или несколько областей, содержащих последовательность, которая облегчает экспрессию трансгена (например, гетерологичной нуклеиновой кислоты), например, последовательности для контроля экспрессии, функционально связанные с нуклеиновой кислотой. Множество таких последовательностей известно в данной области. Неограничивающие примеры последовательностей для контроля экспрессии включают промоторы, инсуляторы, сайленсеры, элементы ответа, интроны, энхансеры, сайты инициации, сигналы терминирования участков внутренней посадки рибосом (IRES) и сигналы поли(А). Любая комбинация таких контрольных последовательностей рассматривается в настоящем документе (например, промотор и сигнал поли(А)). В некоторых вариантах осуществления векторы на основе гAAV содержат промотор, кото-

рый функционально связан с кодирующей последовательностью трансгенов и способствует экспрессии трансгенов.

"Промотор", как применяют в настоящем документе, относится к контрольной области нуклеиновой кислоты, в которой контролируются инициация и скорость транскрипции остатка последовательности нуклеиновой кислоты. Промотор управляет транскрипцией последовательности нуклеиновой кислоты, которую он регулирует, таким образом, он, как правило, расположен внутри или рядом с сайтом начала транскрипции гена. Промотор может иметь длину, например, от 100 до 1000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления промотор функционально связан с нуклеиновой кислотой или последовательностью нуклеиновой кислоты (нуклеотидной последовательностью). Промотор считают "функционально связанным" с последовательностью нуклеиновой кислоты, которую он регулирует, когда промотор находится в правильном функциональном положении и ориентации относительно последовательности, таким образом, что промотор регулирует (например, для контроля ("управления") инициацией транскрипции и/или экспрессии) эту последовательность.

Промоторы, которые можно использовать в соответствии с настоящим раскрытием, могут включать любой промотор, который может управлять экспрессией трансгенов в сердце субъекта. В некоторых вариантах осуществления промотор может представлять собой тканеспецифический промотор. "Тканеспецифический промотор", как применяют в настоящем документе, относится к промоторам, которые могут функционировать только в определенном типе ткани, например, в сердце. Таким образом, "тканеспецифический промотор" не способен управлять экспрессией трансгенов в других типах тканей. В некоторых вариантах осуществления промотор, который можно использовать в соответствии с настоящим раскрытием, представляет собой промотор, ограниченный сердечной тканью. Например, промотор представляет собой промотор, ограниченный сердечной тканью, выбранный из сердечного тропонина С, сердечного тропонина I и сердечного тропонина Т (сТnТ).

Альтернативно, промотор может быть, без ограничений, промотором из одного из следующих генов: гена тяжелой цепи  $\alpha$ -миозина, гена тяжелой цепи  $\beta$ -миозина, гена легкой цепи 2v миозина (MLC-2v), гена легкой цепи 2a миозина, гена CARP, гена сердечного  $\alpha$ -актина, гена сердечного m2-мускаринового рецептора ацетилхолина, ANF, сердечного тропонина С, сердечного тропонина I, сердечного тропонина Т (сТnТ), гена сердечной Са-АТФазы саркоплазматического ретикулума и гена скелетного  $\alpha$ -актина; или является искусственным сердечным промотором, полученным из гена MLC-2v.

В некоторых вариантах осуществления раскрытых векторов на основе гAAV два или более трансгенов функционально контролируются одним промотором. В других вариантах осуществления каждый из двух или более трансгенов функционально контролируется отдельным промотором.

В некоторых вариантах осуществления векторы на основе гAAV по настоящему раскрытию дополнительно содержат участок внутренней посадки рибосомы (IRES). IRES представляет собой нуклеотидную последовательность, которая позволяет иницировать трансляцию в середине последовательности матричной РНК (мРНК) как часть более крупного процесса синтеза белка. Как правило, у эукариот трансляция может иницироваться только на 5'-конце молекулы мРНК, поскольку для сборки иницирующего комплекса требуется распознавание 5'-кэпа. В некоторых вариантах осуществления IRES расположен между трансгенами. В таких вариантах осуществления белки, кодируемые разными трансгенами, транслируются индивидуально (т.е., не транслируются в виде слитого белка).

В некоторых вариантах осуществления векторы на основе гAAV по настоящему раскрытию дополнительно содержат сигнал полиаденилирования (ПА). Эукариотическая мРНК, как правило, транскрибируется в виде предшественника мРНК. Предшественник мРНК процессируется с образованием зрелой мРНК, включая процесс полиаденилирования. Процесс полиаденилирования начинается, когда заканчивается транскрипция гена. Наиболее крайний 3'-сегмент новообразованного предшественника мРНК сначала отщепляется набором белков. Затем эти белки синтезируют хвост из поли(А)- на 3'-конце РНК. Участок расщепления, как правило, содержит сигнал полиаденилирования, например, AAUAAA. Хвост из поли(А) важен для ядерного экспорта, трансляции и стабильности мРНК.

В некоторых вариантах осуществления векторы на основе гAAV по настоящему раскрытию содержат, по меньшей мере, последовательно от 5' к 3', первую последовательность инвертированного концевой повтора (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), промотор, функционально связанный с первым трансгеном, IRES, функционально связанный со вторым трансгеном, сигнал полиаденилирования и вторую последовательность инвертированного концевой повтора (ITR) AAV.

В некоторых вариантах осуществления гAAV имеет кольцевую форму. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV является линейным. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV является одноцепочечным. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV является двухцепочечным. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV является самокомплементарным вектором на основе гAAV. Любой вектор на основе гAAV, предлагаемый в настоящем документе, может быть инкапсулирован капсидом вируса, таким как капсид AAV6, или любым другим серотипом (например, серотипом того же серотипа, что и последовательности ITR). В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV содержит последовательность, комплементарную любой из последовательностей раскрытых векторов гAAV. В некоторых вариантах осуществления

вектор на основе гAAV содержит последовательность, комплементарную любой из SEQ ID NO: 9-12 и 22-23.

Ниже описаны некоторые векторы на основе гAAV по настоящему раскрытию. Векторы, проиллюстрированные ниже, содержат линейаризованные последовательности плазмиды, представленные как SEQ ID NO: 9-12 и 22-23. Векторы по раскрытию могут содержать нуклеотидные последовательности, которые имеют по меньшей мере 70% идентичности, по меньшей мере приблизительно 80% идентичности, по меньшей мере приблизительно 90% идентичности, по меньшей мере приблизительно 95% идентичности, по меньшей мере приблизительно 96% идентичности, по меньшей мере приблизительно 97% идентичности, по меньшей мере приблизительно 98% идентичности, по меньшей мере приблизительно 99% идентичности, по меньшей мере приблизительно 99,5% идентичности или по меньшей мере приблизительно 99,9% идентичности с последовательностями из SEQ ID NO: 9-12 и 22-23. Эти последовательности аннотированы в следующих описаниях.

В некоторых вариантах осуществления любая из раскрытых последовательностей векторов на основе нуклеиновой кислоты гAAV содержит укорочения на 5'- или 3'-конце относительно последовательности любой из SEQ ID NO: 9-12, 22 и 23. В некоторых вариантах осуществления любой из векторов на основе гAAV содержит нуклеотидную последовательность, которая отличается от последовательности одной из SEQ ID NO: 9-12, 22 и 23 на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или более или чем 18 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления любой из раскрытых векторов на основе нуклеиновой кислоты гAAV имеет последовательность, содержащую участки приблизительно 200, 300, 400, 500, 600, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, 2250, 2300, 2350, 2400, 2450, 2500, 2550 или 2600 последовательных нуклеотидов, общих с любой из SEQ ID NO: 9-12, 22 и 23.

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

ctggcgcctcgcctcactgaggccgcccgggcaadgcccgggcgctcgggcgaccttggcgcgccggcctcagtgagcgagcg  
agcgcgcagagagggagtgttagccatgctctaggaagatcaattcaattcacgcgtggaattcccttaacggccccccctcagaggtc  
gggataaaaagcagctctggcctttcacatgacagcatctgggctcgcgcaagggctcgggtccgaagcctccttatcaagcctcccaag  
ccctggaggtgacagctggctgtgtcagccccctgggcactcacgtatctccctccgacgggttfaaaatagcaaaacttgagg  
ccacacaatagcttggccttatatggcctcctctggggaagggggagcacggagggggccgggcccctcctcctccaaaatagcagct  
cacaagtgttcattcctctctggcggccggcaccattcctcctgctctgcccggccccgggtggcgccgggggacctfaaacctct  
gcccccaaggagccctccagacagcggccggcaccaccgctccgtgggacgatccccgaagcctctagaggatccagccttaagg  
 cttagtagtacttaatacgaactactataggttagcgccacc**ATGGGGAATGCCAAGAAAGGCCTTCTGAGACT**  
**ATAGACCGCAGCGCAAGAGGCTTGTAGAAACCTTGCAGGCGGACTCTGGTCTCTTG**  
**CTGGACGCTCTGCTTGC CGGGGTGTTCTGACTGGACCGGAGTACGAAGCATTGGAT**  
**GCCCTTCTGATGCAGAGAGACGAGTTAGACGCCTGTTGCTTCTTGTGCAAGGCAAGG**  
**GTGAAGCCGCTGTCAAGAGCTCCTGAGGTGTGCTAACGAACCGCCGGGGCGCCAG**  
**ATCCGGCATGGGATTGGCAACATGTGGGGCCCGGCTATCGGGACCGGAGCTACGATC**  
**CACCATGCCCGGGTCATTGGACGCCGAGGCTCCAGGATCTGGTACAACATGCCAG**  
**GACTCCCAAGAGCCAGTGACCCGATGAAGCTGGAGGCCCGAGGGCAGTGAAGCCG**  
**TACAGAGCGGTACCCAGAAGAACCAGAACCAGGAGCTGGAGGCTGAAGCTAGTAAAG**  
**AGGCGGAACCTGAACCCGAACCGGAGCCTGAGCTCGAGCCAGAGGCTGAGGCCGAGC**  
**CAGAGCCTGAACTCGAACCCGAACCTGATCCAGAACCAGAGCCGACTTCGAGGAAAC**  
**GGGATGAGTCAGAGGATTCTTGA**actagtgctgaccaggtccctctccctccccccccctaacgtfactggccgaa  
gccgcttggataagccgggtgtcgtttgtctatatgttatttccacatattccgctcttggcaatgtgagggcccggaaacctggccct  
gtctcttgcagcagcattcctagggctcttccccctcgcctcaaaaggaatcaaggtctgttgaatgctgtaaggaagcagttcctctgaaag  
cttcttgaagacaacaacgtctctagcgacccttgcaggcagcggaaacccccacctggcgacaggtcctctcggccaaaagccac  
gtgtataagatacacctgcaaaaggcggcacaaccccagtgccacggttctgagttggatagttgtgaaagagtcaaatgctcctcaagc  
gtattcaacaaggggctgaaaggatcccagaaggatcccattgtatgggatctgatctggggcctcgggtgcacatcctttacatgtgtttagt  
cgaggttfaaaaacgtctagggccccgaaccacggggacgtggttttcccttgaaaaacacgatgataagcttcccacaaccttggcca  
 cc**ATGGGCAGCGAGCTGGAGACCGCCATGGAGACCCTGATCAACGTNTTCCACG**  
**CCCACAGCGGCAAGGAGGGCGACAAGTACAAGCTGAGCAAGAAGGAGCTGAA**  
**GGAGCTGCTGCAGACCGAGCTGAGCGGCTTCCTGGACGCCAGAAGGACGTN**  
**GACGCCGTNGACAAGGTNATGAAGGAGCTGGACGAGAACGGCGACGGCGAGG**  
**TNGACTTCCAGGAGTACGTNGTNTGGTNGCCGCCCTGACCGTNGCCTGCAAC**  
**AACTTCTTCTGGGAGAACAGCTGA**gcggccgcatcgataccgtcgactagagctcgtgatcagcctcactgt  
gcccttagtgccagccatctgttgttggccctccccgctccctcctgaccctggaaggtgcccactcccactgtccttcttaataaatga  
ggaaattgcatcgattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaa  
tagcaggcgataaggatcttctagagcatggctacgtagataagtagcatggcgggttaatcattaactacaaggaacccctagtgatgga  
gttggccactccctctcgcgcctcgtcgtcactgaggccggggcaccaaaaggtcggccgacggccgggcttggccggggcgccct  
cagtgagcgagcgagcgcgag

Описание:

ITR.

Промотор cTnT.

hARC\_Opt.

IRES.

hS100A1\_Opt.

Сигнал полиА BGH.

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

ctggcgcctcgcctcactgaggccgccgggcaadgcccggcgctcggggacctttggcgcggcctcagtgagcgcgcg  
agcgcgcagagagggagtgtagccatgctctaggaagatcaattcaattcacgcgtggaattgcccttaacgggccccccctcagagtc  
gggataaaaagcagctctgggctttcacatgacagcatctggggctgcggcagagggctcgggtccgaagcgcctgcttatcagcgtccccag  
ccctgggaggtgacagctggctgtgtcagccccctgggcactcacgtatctccctccgacgggtttaaaatagcaaaactctgagg  
ccacacaatagcttggcttatatggctcctgtgggaaaggggagcacggagggggccggccctgctgccaataatagcagct  
cacaagtgttcattcctctctggcggggcaccattcctgctgctgctgcccgggggggtggcggggggggaccttaaaacctct  
gcccccaaggagcccttcccagacagccggccaccaccgctccgtgggacgatccccgaagctctagaggatccagccttaagg  
 ctagagtacttaatacgactcactataggttagcgccacc**ATGGGCAGCGAGCTGGAGACCGCCATGGAG**  
**ACCCTGATCAACGTNTTCCACGCCACAGCGGCAAGGAGGGCGACAAGTACAA**  
**GCTGAGCAAGAAGGAGCTGAAGGAGCTGCTGCAGACCGAGCTGAGCGGCTTC**  
**CTGGACGCCCAGAAGGACGTNGACGCCGTNGACAAGGTNATGAAGGAGCTGG**  
**ACGAGAACGGCGACGGCGAGGTNGACTTCCAGGAGTACGTNGTNTCTGGTNGCC**  
**GCCCTGACCGTNGCCTGCAACAATTCTTCTGGGAGAACAGCTGA**actagtgcgtacca  
 ggtcccctctcccctccccccccctaacgttactggccgaagccgcttgaataaggccggtgtcgtttgtctatagtattttccacatatt  
 gccgctctttggcaatgtgagggcccggaaacctggccctgtctctttgacgagcattcctaggggtctttcccctctcgcctaaaggaatgca  
 aggtctcttgaatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaagcttcttgaagacaaacaacgtctgtagcgaccctttgaggcagcgggaacc  
 ccccaactggcgacaggtcctctcggccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaggcgggcacaaccccagtgccacgttgtg  
 agttggatagttgtgaaagagtcfaatggctctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgccagaaggtaccccattgatggg  
 atctgatctggggcctcgggtcacatgctttacatgtgttagtcgaggttaaaaaacgtctaggcccccgaaaccacggggacgtgttttc  
 ctttgaaaaacacgatgataagcttgccacaaccttgggcccacc**ATGGGGAATGCCAAGAAAGGCCCTTCTGAG**  
**ACTATAGACCGCGAGCGCAAGAGGCTTGTAGAAACCTTGCAGGCGGACTCTGGTCTCT**  
**TGCTGGACGCTCTGCTTGC CGGGGTGTTCTGACTGGACCGGAGTACGAAGCATTGG**  
**ATGCCCTTCTGATGCAGAGAGACGAGTTAGACGCCTGTTGCTTCTTGTGCAAGGCAA**  
**GGGTGAAGCCGCTGTCAAGAGCTCCTGAGGTGTGCTCAACGAACCGCCGGGGCGCC**  
**AGATCCGGCATGGGATTGGCAACATGTGGGGCCCGGCTATCGGGACCGGAGCTACGA**  
**TCCACCATGCCCGGGTCATTGGACGCCGGAGGCTCCAGGATCTGGTACAACATGCCC**  
**AGGACTCCCAAGAGCCAGTGACCCCGATGAAGCTGGAGGCCCGAGGGCAGTGAAGC**  
**CGTACAGAGCGGTACCCAGAAAGAACAGAACCGGAGCTGGAGGCTGAAGCTAGTAA**  
**AGAGGCGGAACCTGAACCCGAACCGGAGCCTGAGCTCGAGCCAGAGGCTGAGGCCGA**  
**GCCAGAGCCTGAACTCGAACCCGAACCTGATCCAGAACCAGAGCCCGACTTCGAGGA**  
**ACGGGATGAGTCAGAGGATTCTTGA**gcggccgcatcgataaccgtcactagagctcgtgatcagcctcagctgtg  
 ccttctagtgtccagccatctgtgtttgccctccccctgcttctgacctggaaggtgccactcccactgtctttcctaataaaatgag  
 gaaattgcatcgactgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtggggggggcaggacagcaagggggaggattgggagacaat  
 agcagggcagataaggatctctagagcatggtactagtagataagtagcatggcgggtaacttaactacaaggaacccctagtgatggag  
 ttggccactcccctctctcgcgctcgtcgtcactgagggccggcgaccaaaaggtcggccgacgcccgggctttgccggggcgccctc  
agtgagcgcgcgagcgcgcgag

Описание:

ITR.

Промотор cTnT.

hS100A1\_Opt.

IRES.

hARC\_Opt.

Сигнал полиА ВGH.

pAAVsc.cTnT.hS100A1.hARC\_opt (homo sapiens) (SEQ ID NO: 11)

ctgcgcctcgcctcactgaggccgcccgggcaaaagcccggcgtcgggcgacctttggtcgcggcctcagtgagcgcgcg  
agcgcgcagagagggaggtgtagccatgctctaggaagatcaattcaattcacgcgtggaattcggccttaacgggccccctcgaggtc  
gggataaaagcagctcggccttcacatgacagcctcgggctcggcagagggtcgggtccgaagcgccttatacagctccccag  
ccctgggagtgacagctgctgcttctcagccccctgggcactcacgtatctccctccgacgggttfaaaatagcaaaactctgagg  
ccacacaatagcttggccttatatggcctcctctggggaaagggggagcacggagggggccgggcccgtcctcgcacaaatagcagct  
cacaagtcttcattcctctctggcggccggcacattcctcctcctcctcggcggccggggggaccttaaacgctct  
gcccccaaggagcccttccagacagccgcccaccaccgctcgtgggacgatccccgaagctctagaggatccagccttaagg  
ctagagtacttaatacgcactactataggctagcggccaccatgggctctgagctggagacggcgatggagacctcatcaacgtgttcc  
**acgcccactcgggcaagagggggacaagtacaagctgagcaagaaggagctgaaagagctgctgcagacggagctctctggc**  
**ttcttgatgccagaaggatgtggatgctgtggacaaggatgaaggagctagacgagaatggagacggggaggtggacttc**  
**caggagtatgtgtgcttggctctcacagtggcctgtaacaatttctctgggagaacagttgaactagtgcgtaccaggtccc**  
ctctccctccccccccctaacgtfactggccgaagccgcttggataagggcgggtgtcgtttgtctatattttaccatattgccgtc  
tttgcaatgtgagggcccggaaacctggccctgtcttctgacgagcattcttagggctttccccctctcgcacaaaggaatgcaaggtct  
gttgatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaagcttctgaagacaacaacgtctgtagcgacctttgcaggcagcggaaacccccca  
cctggcgacaggtgcctctcggccaaaagccacgtgtataagatacacctgcacaaagcggcacaacccccagtccacgttgtgagttgg  
atagttgtgaaaagatcaaatggctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgccagaaggtacccccattgatggatctga  
tctgggctcgtgcacatgctttacatgtttatgtagggttaaaaaacgtctaggccccccgaaccacggggacgtggtttctttgaa  
aaacacgatgataagcttccacaacctgggcccacc**ATGGGGAATGCCAAGAAAGGCCTTCTGAGACTA**  
**TAGACCGCGAGCGCAAGAGGCTTGTAGAAACCTTGCAGGCGGACTCTGGTCTCTTGCT**  
**GGACGCTCTGCTTGC GCGGGGTGTTCTGACTGGACCGGAGTACGAAGCATTGGATGC**  
**CCTTCTGATGCAGAGAGACGAGTTAGACGCCTGTTGCTTCTTGTGCAAGGCAAGGGT**  
**GAAGCCGCTGTCAAGAGCTCCTGAGGTGTGCTCAACGAACCGCCGGGGCGCCAGAT**  
**CCGGCATGGGATTGGCAACATGTGGGGCCCGGCTATCGGGACCGGAGCTACGATCCA**  
**CCATGCCCGGGTCATTGGACGCCGGAGGCTCCAGGATCTGGTACAACATGCCAGGA**  
**CTCCAAGAGCCAGTGACCCGATGAAGCTGGAGGCCCGAGGGCAGTGAAGCCGTA**  
**CAGAGCGGTACCCAGAAGAACCAGAACCAGGAGCTGGAGGCTGAAGCTAGTAAAGAG**  
**GCGGAACCTGAACCCGAACCGGAGCCTGAGCTCGAGCCAGAGGCTGAGGCCGAGCCA**  
**GAGCCTGAACTCGAACCCGAACCTGATCCAGAACCAGAGCCCGACTTCGAGGAAACGG**  
**GATGAGTCAGAGGATTCTTGA**gcggccgcatcgataccgtcgactagactcgtgatcagcctcactgtgccttcta  
gttgccagccatctgttggccctccccctgaccttctgacctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaatt  
gcatcgattgtctgagtaggtctcattctattctgggggtggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcag  
gcgataaggatctcctagacatggctacgtagataagtagcatggcgggttaactaactcaaggaaccctagtgatggagttggc  
cactccctctctcgcgctcgtcgtcactgagccggcgaccacaaagctgccccagccccggccttgcggggcgccctcagtea  
gcgagcgcgagcgcgag

Описание:  
ITR.  
Промотор cTnT.  
hS100A1.  
IRES.  
hARC\_Opt  
Сигнал полиА BGH.

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

ctgcgcgctcgcctcactgagccgcccgggcaagcccggcgctcggcgacctttggcgcggcctcagtgagcgcgcg  
agcgcgcagagagggagtgtagccatgctctaggaagatcaattcaattcacgcgtggaattcccccftaacggccccccctcagagtc  
gggataaaagcagctcggccttcacatgacagcactcgggctcggcgagaggctgggctccgaagcctccttatcagcctccccag  
ccctgggaggtgacagctggcctgcttctcagccccctgggcactacgctatcctcctcggacgggttfaaaatagcaaaactcaggg  
ccacacaatagcttggccttatatggctcctctggggaaaggggagcacggagggggccggccctgctgccaataatagcagct  
cacaagtcttcattcctctctggcgccggcacattcctcctgctgctcctcctcggccccgggctggcgccgggggaccttaagcctct  
gcccccaagagcccttcaccagacagccggcgacccaccctcctcctgggacgatccccgaaactctagaggatccagccttaagg  
ctagagtacttaatacactactataggttagcgccacc**ATGGGGAATGCCAAGAAAGGCCTTCTGAGACT**  
**ATAGACCGCGAGCGCAAGAGGCTTGTAGAAACCTTGCAGGCGGACTCTGGTCTCTTG**  
**CTGGACGCTCTGCTTGC GCGGGGTGTTCTGACTGGACCGGAGTACGAAGCATTGGAT**  
**GCCCTTCCTGATGCAGAGAGACGAGTTAGACGCCTGTTGCTTCTTGTGCAAGGCAAGG**  
**GTGAAGCCGCTGTCAAGAGCTCCTGAGGTGTGCTCAACGAACCGCCGGGGCGCCAG**  
**ATCCGGCATGGGATTGGCAACATGTGGGGCCCGGCTATCGGGACCGGAGCTACGATC**  
**CACCATGCCCGGGTCATTGGACGCCGAGGCTCCAGGATCTGGTACAACATGCCAG**  
**GACTCCAAGAGCCAGTGACCCCGATGAAGCTGGAGCCCCGAGGGCAGTGAAGCCG**  
**TACAGAGCGGTACCCAGAAGAACCAGAACCAGGAGCTGGAGGCTGAAGCTAGTAAAG**  
**AGGCGGAACCTGAACCCGAACCGGAGCCTGAGCTCGAGCCAGAGGCTGAGGCCGAGC**  
**CAGAGCCTGAACTCGAACCCGAACCTGATCCAGAACCAGAGCCCCGACTTCGAGGAAC**  
**GGGATGAGTCAGAGGATTCTTGA**actagtgcgtaccaggtccctctcctccccccccctaacgcttactggccgaa  
gccccttggataagggcggctgtgcttctctatatgtatttccaccatattccctctttggcaatgtgagggcccggaaacctggccct  
gtctcttgacgagcattcctaggggctcttccccctcgcctcaaaaggaatgcaaggtctgtgaatgctgaggaagcagttcctctggaag  
cttctgaaagacaacaacgtctgtagcgaccttggcagggcagcggaaccacccacctggcgacaggtccctctcggcgaagccac  
gtgtataagatacacctgcaaaagcgcgcaaccagtgccacgtgtgagttggatagttgtggaagagtcfaatggctcctcaagc  
gtattcaacaagggctgaaaggatcccagaaggtaacccttctgtaggatctgatctgggcccctcggtcacatgctttacatgttttagt  
cgaggttaaaaacgtctagggccccgaaccacggggagctgttttctttgaaaaacagatgataagcttgcacaaccttggcca  
ccatgggctctgagctggagacggcgatggagacctcatcaactgttccacgcccactgggcaagagggggacaagta  
agctgagcaagaaggagctgaaagagctgctgcagacggagctctctggcttctggatgccagaaggatgtggatgctgtgga  
caaggtgatgaaggagctagacgagaatggagacggggaggtggactccaggagtatgtggtgcttggctctcacagt  
gctgtacaatttcttctgggagaacagttgagcgccgcatcgataaccgtgactagagctgctgatcagcctcagctgtgcttcta  
gttccagccatctgttggccccccccctgcttctgacctggaaggtgccactcccactgtccttctctaataaaatgaggaaatt  
gcatcgattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcag  
gcgataaggatctcctagacatggctacgtagataagtagcatggcggttaactattaactacaaggaaccctagtgtgaggtggc  
cactccccctctcgcgctcgtcgtcactgagggccggcgaccaaggtcggccagccccgggcttggccccggcgccctcagtg  
gagagcgagcgcgag

Описание:

ITR.

Промотор cTnT.

hARC\_Opt.

IRES.

hS100A1.

Сигнал полиА ВGH.



pAAVsc.cTnT.cARC-Opt\_IRES\_cS100A1-Opt\_v2 (amis lupus familiaris) (SEQ ID NO: 23)

ctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgcccgggcaaagcccggcgctcggcgaccttggctcggccgctcagtgagcgagcgag  
cgcgagagagggaggtgtagccatgctctaggaagatcaattcaattcacgcgtggaattcgccttaacggccccctcgaggtcgg  
gataaaagcagctctggctttcacatgacagcatctgggctcggcgagagggtcgggtccgaagcgtgccttatcagctccccagcc  
ctggaggtgacagctggctggctgtctagcccctgggcactcacgtatctcctccgacgggttaaaatagcaaaacttgaggcc  
acacaatagcttggcttatatggctcctctgggggaaggggagcacggaggggccggggccctcctcctccaaaatagcagctca  
caagtgttcattcctctctggcgccggcacattcctgctgctctgcccggccgggtggcgccgggggaccttaagcctctgc  
ccccaaaggagccctccagacagccggcgaccaccgctcctgggacgatccccgaagctctagaggatccagccttaaggcta  
 gagtacttaatacgcactactataggCTAGCGccaccATGGGCAACAGCCAGGAGCGGCCAGCGAGAC  
 CATCGACCGGGAGCGGAAGCGGCTGGTGGAGACCCTGCAGGCCGACAGCGGCCTGCT  
 GCTGGACGCCCTGCTGGCCGGGGCGTGCTGGCCGGCCCCGAGTACGAGGCCCTGGA  
 CGCCCTGCCCGACGCCGAGCGGCGGGTGCGGCGGCTGCTGCTGCTGGTGCAGAGCAA  
 GGGCGAGGCCGCCTGCCAGGAGCTGCTGCTGTGCGCCAGCGGACCGCCCGGGCCC  
 CCGACCCCGCCTGGGACTGGCAGCACGTGGGCACCGCTACCGGGAGCGGAGCTGG  
 GACGCCGCCTGCGCCGGCCACTGGACCCCCGAGGCCCCCGGCAGCAGCACCACTGC  
 CCCGAGCTGCCCCGGGCCGCCGACTGCGGCGAGCCCGGCGCCCCCGGCGGCAGCGA  
 GGCCGCCAGAGCGGCAGCCTGGAGGAGCCCGACCCCGAGCTGGAGGCCGGCGCCG  
 AGCTGGAGAGCGAGCCCCAGATGGACCTGGAGCCCGAGCCCGAGGCCGAGCCCCGAG  
 CCCGAGCTGGAGCGGGAGCCCGAGCCCGAGCCCGAGCCCGACCTGGAGGCCGGCGA  
 CGAGAGCGAGGACAGCTGATGAACTagtGCGTAccaggtCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCT  
 AACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTA  
 TTTTCCACCATATTGCCGCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCT  
 TCTTGACGAGCATTCCCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGT  
 TGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCT  
 GTAGCGACCCCTTTCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGG  
 CCAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACG  
 TTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACA  
 AGGGGCTGAAGGATGCCAGAAGGTACCCCATTTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCT  
 CGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAACGTCTAGGCCCCCCGA  
 ACCACGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAAGCTTGCCACAACctggg  
 ccaccATGGGctctGAGCTGGAGACCGCCATGGAGACCCTGATCAAtGTGTTCCACG  
 CCCACAGCGGCAAGGAGGGCAAAtAAGTACAAGCTGtctAAGAAGGAGCTGAAGG  
 AGCTGCTGCAGACCGAGCTGtctGGCTTCTTGACGCCCAGAAGGACGCCGACG  
 CCGTGGACAAGGTGATGAAGGAGCTGGACGAGAAAtGGCGACGGCGAGGTGGAC  
 TTCCAGGAGTACGTGGTGTGCTGGTGGCCGCCCTGACCGTGGCCTGCAAAtAAtTC  
 TTCTGGGAGAAAttcttgatgagcggccgcAATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTG  
 TTGGTTTTTTGTGTGatcgataccgtcgactacgtagataagtagcatggcgggtaatacattaactacaaggaacccttagtg  
atggaggtggccactccctctctcgcgctcgtcgtcactgaggccggcgaccaaaggtcggccgacgcccggcttggccggcg  
ggcctcagtgagcgagcgagcgcgcag

Описание: ITR.  
 Промотор cARC-Opt.  
 IRES cS100A1-Opt\_v2.  
 Синтетический полиА.  
 Частицы рекомбинантного АА V (rAA V).

Далее в настоящем документе предлагаются частицы вируса гAAV или препараты гAAV, содержащие такие частицы. Частицы гAAV содержат капсид вируса и вектор на основе гAAV, как описано в настоящем документе, который инкапсулирован капсидом вируса. Способы получения частиц гAAV известны в данной области и являются коммерчески доступными (см., например, Zolotukhin et al. *Production and purification of serotype 1, 2, and 5 recombinant adeno-associated viral vectors*. *Methods* 28 (2002) 158-167; и публикации патентов США US 2007/0015238 и US 2012/0322861, которые включены в настоящий документ посредством ссылки; и плазмиды и наборы, доступные от ATCC и Cell Biolabs, Inc.). Например, плазмиду, содержащую вектор на основе гAAV, можно комбинировать с одной или несколькими вспомогательными плазмидами, например, содержащими ген гер (например, кодирующими Rep78, Rep68, Rep52 и Rep40) и ген сар (кодирующими VP1, VP2 и VP3, включая модифицированную область VP3, как описано в настоящем документе), и трансфицировать в продуцентную линию клеток, таким образом, что частицу гAAV можно упаковывать и затем очищать.

Частицы гAAV или частицы в составе препарата гAAV, предлагаемые в настоящем документе, могут относиться к любому серотипу AAV, включая любое производное или псевдотип (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 2/1, 2/5, 2/8, 2/9, 3/1, 3/5, 3/8 или 3/9). Как применяются в настоящем документе, серотип гAAV частицы гAAV соответствует серотипу капсидного белка рекомбинантного вируса. В некоторых вариантах осуществления частица гAAV представляет собой гAAV6 или гAAV9. Неограничивающие примеры производных и псевдотипов включают AAVrh.10, AAVrh.74, AAV2/1, AAV2/5, AAV2/6, AAV2/8, AAV2/9, гибрид AAV2-AAV3, AAVhu.14, AAV3a/3b, AAVrh32.33, AAV-HSC15, AAV-HSC17, AAVhu.37, AAVrh.8, CHt-P6, AAV2.5, AAV6.2, AAV2i8, AAV-HSC15/17, AAVM41, AAV9.45, AAV6(Y445F/Y731F), AAV2.5T, AAV-NAE1/2, клон 32/83 AAV, AAVShHIO, AAV2(Y->F), AAV8(Y733F), AAV2.15, AAV2.4, AAVM41, AAV6(TM6) и AAVr3.45. Такие серотипы и производные/псевдотипы AAV, а также способы получения таких производных/псевдотипов известны в данной области (см., например, *Mol Ther.* 2012 Apr;20(4):699-708. doi: 10.1038/mt.2011.287. Epub 2012 Jan 24. The AAV вектор toolkit: poised at the clinical crossroads. Asokan A1, Schaffer DV, Samulski RJ). В конкретных вариантах осуществления капсид любой из раскрытых в настоящем документе частиц гAAV относится к серотипу AAVrh.10. В некоторых вариантах осуществления капсид относится к серотипу AAV2/6. В некоторых вариантах осуществления частица гAAV представляет собой псевдотипированную частицу гAAV, которая содержит (а) вектор на основе гAAV, содержащий ITR одного серотипа (например, AAV2, AAV3) и (б) капсид, содержащий капсидные белки, полученные из другого серотипа (например, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 или AAV10). Способы получения и применения псевдотипированных векторов на основе гAAV известны в данной области (см., например, Duan et al., *J. Virol.*, 75: 7662-7671, 2001; Halbert et al., *J. Virol.*, 74: 1524-1532, 2000; Zolotukhin et al., *Methods*, 28: 158-167, 2002; и Auricchio et al., *Hum. Molec. Genet.*, 10: 3075-3081, 2001).

Гемотерапия на основе гAAV для заболеваний сердца.

Настоящее раскрытие также относится к композициям, содержащим одну или несколько раскрытых частиц или препаратов гAAV. В некоторых вариантах осуществления препарат гAAV содержит частицу гAAV, содержащую вектор на основе гAAV, содержащий ITR первого серотипа (например, AAV3, AAV5, AAV6 или AAV9) и капсид белка, инкапсулирующий вектор на основе гAAV. В некоторых вариантах осуществления капсид белка относится к первому серотипу (например, AAV3, AAV5, AAV6 или AAV9). В некоторых вариантах осуществления препарат имеет по меньшей мере в четыре раза более высокую эффективность трансдукции (например, у клеток печеночноклеточной карциномы человека, таких как Huh7) по сравнению с препаратом, приготовленным с использованием вектора гAAV, содержащего ITR AAV2.

Как описано в настоящем документе, такие композиции могут дополнительно содержать фармацевтический эксципиент, буфер или разбавитель, и ее можно формулировать для введения в клетки-хозяева *ex vivo* или *in situ* животного, в частности, человека или собаки. Такие композиции могут дополнительно необязательно содержать липосому, липид, липидный комплекс, микросферу, микрочастицу, наносферу или наночастицу, или могут быть приготовлены иным образом для введения в клетки, ткани, органы, организм человека или собак, нуждающихся в этом. Такие композиции можно формулировать для применения в различных терапевтических целях, таких как, например, улучшение состояния, профилактика и/или лечение состояний, таких как дефицит пептидов, дефицит полипептидов, сверхэкспрессия пептидов, сверхэкспрессия полипептидов, включая, например, состояния, которые приводят к заболеваниям, или нарушениям, описанным в настоящем документе.

Векторы на основе гAAV, частицы гAAV или композиции, содержащие частицы гAAV по настоящему раскрытию, можно использовать для генотерапии заболеваний сердца у нуждающегося в этом субъекта (например, человека или собаки). Примеры заболеваний сердца, которые можно лечить с помощью способов и композиций по настоящему раскрытию, в качестве неограничивающих примеров включают кардиомиопатию и острую ишемию. В некоторых вариантах осуществления кардиомиопатия представляет собой гипертрофическую кардиомиопатию или дилатационную кардиомиопатию. Сердечная недостаточность, вызванная кардиомиопатией или другими заболеваниями сердца, содержит два компонента, нарушение обмена кальция и апоптоз. Векторы на основе гAAV, частицы и композиции,

содержащие частицы гAAV, можно использовать для лечения таких сердечных недостаточностей при введении нуждающемуся в этом субъекту, например, путем внутрисосудистого введения в коронарные артерии и/или прямой инъекции в сердце. Векторы на основе гAAV, частицы и композиции, содержащие частицы гAAV, управляют одновременной экспрессией белка sS100A1 и белка ARC в кардиомиоцитах субъекта. S100A1 улучшает аспекты обмена кальция, включая нормализацию переходных процессов кальция саркоплазматического ретикулума, что приводит к нормализации сократительной функции. ARC будет блокировать апоптоз, инициированный митохондриальными и немитохондриальными механизмами (например, апоптоз, вызванный растяжением), а также улучшать функцию митохондрий. Таким образом, синергические преимущества двух белков, экспрессируемых трансгенами по настоящему раскрытию, могут привести к более длительным терапевтическим результатам у путем воздействия на оба аспекта кардиомиопатии.

Аминокислотные последовательности белков S100A1 и ARC, полученных у человека, описаны ниже.

Белок ARC человека:

MGNAQERPSETIDRERKRLVETLQADSGLLLDALLARGVLTGPEYEALDALPDA  
ERRVRRLLLLVQKGGEAACQELLRCAQRTAGAPDPAWDWQHVGPGYRDRSYDPPCPG  
HWTPEAPGSGTTCPGLPRASDPDEAGGPEGSEAVQSGTPEEPEPELEAEASKEAPEPEPE  
EPELEPEAEAEPEPELEPEPDPEPEPDFEERDESEDS (SEQ ID NO: 13)

Белок S100A1 человека:

MGSELETAMETLINVFHAHSGKEGDKYKLSKKELKELLQTELSGFLDAQKDVA  
VDKVMKELDENGDFQYVVLVAALTVACNFFWENS (SEQ ID NO: 14)

В некоторых аспектах раскрытые векторы на основе гAAV кодируют белок, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99,5% идентичную SEQ ID NO: 13 или 14. В некоторых аспектах раскрытые векторы на основе гAAV кодируют первый белок, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99,5% идентичную SEQ ID NO: 13, и второй белок, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99,5% идентичную SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV кодирует белок, который содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV кодирует белок, который содержит SEQ ID NO: NO: 14. В конкретных вариантах осуществления вектор на основе гAAV кодирует первый белок, который содержит SEQ ID NO: 13, и второй белок, который содержит SEQ ID NO: 14.

В некоторых вариантах осуществления любой из раскрытых векторов на основе гAAV кодирует последовательность первого белка, которая отличается от последовательности любой из SEQ ID NO: 13 или 14 на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более 12 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления любой из раскрытых векторов на основе гAAV кодирует белки, укороченные на 1, 2, 3 или более 3 аминокислот на N- или C-конце относительно любой из SEQ ID NO: 13 или 14. В некоторых вариантах осуществления любой из раскрытых векторов на основе гAAV кодирует одну или несколько последовательностей белка, которые имеют участки из 50, 75, 90, 93, 100, 125, 175, 200 или 205 аминокислот, общих с SEQ ID NO: 13 или 14.

Аминокислотные последовательности белков S100A1 и ARC, полученные у собак, описаны ниже.

Белок ARC собаки:

MGNSQERPSETIDRERKRLVETLQADSGLLLDALLARGVLAGPEYEALDALPDA  
ERRVRRLLLLVQSKGEAACQELLLCAQRTARAPDPAWDWQHVGTYRERSWDAACA  
GHWTPEAPGSSTTCPPELPRAADCGEPGAPGGSEAAQSGSLEEPDPELEAGAELESEPM  
DLEPEPEAEPEPELEREPEPEPEPDLEAGDESEDS (SEQ ID NO: 24)

Белок S100A1 собаки:

MGSELETAMETLINVFHAHSGKEGNKYKLSKKELKELLQTELSGFLDAQKDADA  
VDKVMKELDENGDFQYVVLVAALTVACNFFWENS (SEQ ID NO: 29)

В некоторых аспектах раскрытые векторы на основе гAAV кодируют белок, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99,5% идентичную SEQ ID NO: 24 или 29. В некоторых аспектах раскрытые векторы на основе гAAV кодируют первый белок, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99,5% идентичную SEQ ID NO: 24, и второй белок, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99,5% идентичную SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV кодирует белок, который содержит SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV кодирует белок, который содержит SEQ ID NO: NO: 29. В конкретных вариантах

осуществления вектор на основе гAAV кодирует первый белок, который содержит SEQ ID NO: 24, и второй белок, который содержит SEQ ID NO: 29.

В некоторых вариантах осуществления любой из раскрытых векторов на основе гAAV кодирует одну или несколько последовательностей белка, которые отличаются от последовательности любой из SEQ ID NO: 24 или 29 на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более 12 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления любой из раскрытых векторов на основе гAAV кодирует одну или несколько последовательностей белка, которые укорочены на 1, 2, 3 или более чем 3 аминокислоты на N- или C-конце относительно любой из SEQ ID NO: 24 или 29. В некоторых вариантах осуществления любой из раскрытых векторов на основе гAAV кодирует одну или несколько последовательностей белка, которые имеют участки приблизительно из 50, 75, 90, 93, 100, 125, 150, 175 или 200 последовательных аминокислот, общих с SEQ ID NO: 24 или 29.

Таким образом, другие аспекты настоящего раскрытия относятся к введению частиц гAAV по настоящему раскрытию нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления количество частиц гAAV, вводимых субъекту, может находиться в диапазоне от приблизительно  $10^6$  до приблизительно  $10^{14}$  частиц/мл или от приблизительно  $10^3$  до приблизительно  $10^{13}$  частиц/мл, или составлять любое промежуточное значение для любого диапазона, например, приблизительно  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $10^{13}$  или  $10^{14}$  частиц/мл. В некоторых вариантах осуществления количество частиц гAAV, вводимых субъекту, может находиться в диапазоне от приблизительно  $10^6$  до приблизительно  $10^{14}$  векторных геномов (вг)/мл или от  $10^3$  до  $10^{15}$  вг/мл, или составлять любое промежуточное значение для любого диапазона, например, приблизительно  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $10^{13}$  или  $10^{14}$  вг/мл. Частицы гAAV можно вводить в виде однократной дозы или разделить на два или более введений, которые могут потребоваться для достижения терапии конкретного заболевания или нарушения, которое лечат. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят дозы в пределах от приблизительно 0,0001 мл до приблизительно 10 мл.

При желании, частицы гAAV и векторы на основе гAAV можно вводить в комбинации с другими средствами, такими как, например, белки или полипептиды или различные фармацевтически-активные средства, включая одно или несколько введений терапевтических полипептидов, биологически активных фрагментов или их вариантов. На самом деле практически нет ограничений на другие компоненты, которые также могут быть включены, при условии, что дополнительные средства не вызывают значительного неблагоприятного воздействия при контакте с клетками-мишенями или тканями хозяина. Частицы или препараты гAAV, таким образом, можно доставлять вместе с различными другими фармацевтически приемлемыми средствами, как это требуется в конкретном случае. Такие композиции состав можно очищать из клеток-хозяев или других биологических источников, или альтернативно можно синтезировать химически, как описано в настоящем документе.

Составы, содержащие фармацевтические препараты, эксципиенты и/или растворы-носители, хорошо известны специалистам в данной области, как и разработка подходов к дозированию и схемам лечения для использования конкретных композиций, предлагаемых в настоящем документе, в различных схемах лечения, включая, например, пероральное, парентеральное, внутривенное, интраназальное, внутрисуставное, внутримышечное введение и состав.

Как правило, эти составы могут содержать по меньшей мере приблизительно 0,1% терапевтического средства (например, частицу или препарат гAAV и/или вектор на основе гAAV) или более, хотя процентное содержание активного ингредиента/ингредиентов может, конечно, варьировать и может в целях удобства составлять приблизительно от 1 или 2% и приблизительно до 70% или 80% или более от массы или объема всего состава. Естественно, количество терапевтического средства/средств в каждой терапевтически полезной композиции можно получать таким образом, чтобы подходящая дозировка была получена в любой заданной стандартной дозе соединения. Специалисты в данной области должны учитывать такие факторы, как растворимость, биодоступность, биологический период полужизни, способ введения, срок годности продукта, а также другие фармакологические факторы при приготовлении таких фармацевтических составов. Дополнительно могут быть желательны различные дозировки и схемы лечения.

В определенных обстоятельствах желательно доставлять частицы или препараты гAAV и/или векторы на основе гAAV в виде надлежащим образом составленных фармацевтических композиций, предлагаемых в настоящем документе, или подкожно, интраваскулярно, интракардиально, интраокулярно, интравитреально, парентерально, подкожно, внутривенно, интрацеребро-вентрикулярно, внутримышечно, подоболочечно, перорально, интраперитонеально, путем пероральной или назальной ингаляции, или путем прямой инъекции в одну или несколько клеток (например, кардиомиоцитов и/или других клеток сердца), тканей или органов. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV или композиции, содержащие частицы гAAV по настоящему раскрытию, вводят интраваскулярно в коронарные артерии. В других вариантах осуществления раскрытые частицы гAAV или композиции вводят путем прямой инъекции в сердце субъекта. Прямая инъекция в сердце может включать инъекцию в одну или несколько тканей миокарда, оболочку сердца или скелетную мышцу, окружающую сердце, например, с помощью иглычатого катетера.

Фармацевтические составы композиций, подходящие для инъекций, включают в себя водные рас-

творы или дисперсии. В некоторых вариантах осуществления состав является стерильным и жидким в тех случаях, когда есть возможность легкого введения шприцем. В некоторых вариантах осуществления форма стабильна в условиях производства и хранения и защищена от контаминирующего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носителем может быть растворитель или диспергирующая среда, содержащая, например, воду, физиологический раствор, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль, и т.п.), их подходящие смеси, растительные масла или другие фармацевтические приемлемые носители, такие как те, которые являются общепризнанными как безопасные (GRAS) Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств. Надлежащая текучесть может поддерживаться, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и за счет использования поверхностно-активных веществ.

Термин "носитель" относится к разбавителю, адьюванту, эксципиенту или носителю, с которым вводят частицу или препарат гAAV и/или вектор на основе гAAV. Такими фармацевтическими носителями могут быть смеси жидкостей, таких как вода и масла, в том числе нефтяные масла, такие как минеральное масло, растительные масла, такие как арахисовое масло, соевое масло и кунжутное масло, масло животного или синтетического происхождения. Физиологические растворы, водные растворы декстрозы и глицериновые растворы также могут быть использованы в качестве жидких носителей.

Для введения инъекционного водного раствора, например, раствор может быть соответствующим образом забуферен, если это необходимо, и жидкий разбавитель сначала доводят до изотонического с физиологическим раствором или глюкозой. Эти конкретные водные растворы особенно подходят для внутривенного, внутримышечного, интравитреального, подкожного и интраперитонеального введения. В связи с этим, стерильная водная среда, которую можно использовать, будет известна специалистам в данной области в свете настоящего раскрытия. Например, одну дозу можно растворить в 1 мл изотонического раствора NaCl и либо добавить к 1000 мл жидкости для подкожного введения, либо ввести в предполагаемое место инфузии (см., например, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 15-е издание, стр. 1035-1038 и 1570-1580). Некоторое изменение дозировки обязательно будет иметь место в зависимости от состояния человека, проходящего лечение. Лицо, ответственное за введение, в любом случае определяет подходящую дозу для конкретного человека. Кроме того, для введения человеку препараты должны соответствовать стандартам стерильности, пирогенности и общим стандартам безопасности и чистоты, как того требует, например, отдел по биологическим стандартам FDA.

Стерильные инъекционные растворы получают путем включения частиц или препаратов гAAV, белков Rep и/или векторов на основе гAAV в необходимое количество соответствующего растворителя с несколькими другими ингредиентами, перечисленными выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии получают путем включения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильный носитель, содержащий основную диспергирующую среду и другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных растворов для инъекций, предпочтительные способы получения представляют собой способы вакуумной сушки и лиофилизационной сушки, которые позволяют получить порошок активного ингредиента плюс любой желаемый дополнительный компонент из их предварительно стерильно профильтрованного раствора.

Количество композиций с частицами или препаратами гAAV и/или векторами на основе гAAV и время введения таких композиций будет находиться в пределах компетенции специалиста в данной области, пользующегося преимуществами настоящего изобретения. Однако вполне вероятно, что введение терапевтически эффективного количества композиций по настоящему изобретению может быть достигнуто путем однократного введения, такого как, например, однократная инъекция достаточного количества инфекционных частиц, чтобы обеспечить терапевтический эффект пациенту, проходящему такое лечение. Альтернативно, при некоторых обстоятельствах может быть желательным обеспечить многократное или последовательное введение композиций с частицами или препаратами гAAV и/или векторами на основе гAAV либо в течение относительно короткого, либо относительно длительного периода времени, как сможет определить врач-терапевт, наблюдающий за введением таких композиций.

Композиции по настоящему изобретению могут содержать частицы или препараты гAAV и/или векторы на основе гAAV либо отдельно, либо в составе с одним или несколькими дополнительными активными ингредиентами, которые можно получать из природных или рекомбинантных источников или синтезировать химическим путем. В некоторых вариантах осуществления частицы или препараты гAAV вводят в комбинации либо в той же композиции, либо вводят как часть той же схемы лечения, с ингибитором протеосомы, таким как бортезомиб или гидроксимочевина.

"Лечить" заболевание, как применяют в качестве термина в настоящем документе, означает уменьшить частоту или тяжесть по меньшей мере одного признака или симптома заболевания или нарушения, испытываемого субъектом. Композиции, описанные выше, как правило, назначают субъекту в эффективном количестве, то есть в количестве, способном обеспечить желаемый результат. Желаемый результат будет зависеть от вводимого активного средства. Например, эффективное количество частиц гAAV может быть количеством частиц, которые способны переносить гетерологичную нуклеиновую кислоту в

орган, ткань или клетку хозяина.

Токсичность и эффективность композиции, используемой в настоящем изобретении, можно определить с помощью стандартных фармацевтических способов, используя либо клетки в культуре, либо экспериментальных животных для определения LD<sub>50</sub> (дозы, летальной для 50% популяции). Соотношение доз между токсичностью и эффективностью представляет собой терапевтический показатель и его можно выражать в виде отношения LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>. Предпочтительными являются те композиции, которые обладают большими терапевтическими показателями. Хотя можно использовать композиции, демонстрирующие токсичные побочные эффекты, следует позаботиться о разработке системы доставки, которая сводит к минимуму потенциальный ущерб от таких побочных эффектов. Дозировка композиций, как описано в настоящем документе, обычно находится в диапазоне, включающем ED<sub>50</sub> с незначительной токсичностью или без нее. Дозировка может варьироваться в пределах этого диапазона в зависимости от используемой лекарственной формы и используемого пути введения.

Другие аспекты настоящего раскрытия относятся к способам и препаратам для применения у субъекта, такого как человек или не относящийся к человеку (например, собака) субъект, клетки-хозяина *in situ* у субъекта, или клетки-хозяина, полученной от субъекта. В некоторых вариантах осуществления, субъект представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления субъекта представляет собой домашнее животное. "Домашнее животное", как применяют в настоящем документе, относится к домашним питомцам и другим домашним животным. Неограничивающие примеры домашних животных включают собак и кошек; домашний скот, такой как лошади, крупный рогатый скот, свиньи, овцы, козы и курицы; и других животных, таких как мыши, крысы, морские свинки и хомяки. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой миниатюрную свинью, или мини-свинью. В некоторых вариантах осуществления субъект является человеком. В некоторых вариантах осуществления субъект является собакой. В некоторых вариантах осуществления, собака представляет собой собак крупных пород. Как применяют в настоящем документе, к собакам крупных пород относятся псовые (например, собаки) весом более 55 фунтов в любом возрасте. Таким образом, как применяют в настоящем документе, крупная порода собак может относиться к определенной породе собак, которая по своей природе будет иметь массу более 55 фунтов (например, доберман-пинчеры, немецкие доги, ирландские волкодавы и т.д.), а также к собакам любой породы (конкретной или неизвестной), вес которых может превышать 55 фунтов по другим причинам (например, из-за ожирения).

В некоторых вариантах осуществления у субъекта есть заболевание сердца или есть подозрение на заболевание сердца, которое можно лечить при помощи генотерапии. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет любую стадию сердечной недостаточности. В некоторых вариантах осуществления, сердечная недостаточность вызвана кардиомиопатией. В некоторых вариантах осуществления, сердечная недостаточность вызвана гипертрофической кардиомиопатией или дилатационной кардиомиопатией (ДКМП).

Следующие примеры предназначены для иллюстрации определенных вариантов осуществления настоящего раскрытия и являются неограничивающими. Полное содержание всех ссылок (включая ссылки на литературу, выданные патенты, опубликованные патентные заявки и совместно рассматриваемые патентные заявки), цитируемых на всем протяжении этого раскрытия, настоящим прямо включено посредством ссылки. В случае конфликта настоящее изобретение, включая любые определения в настоящем документе, будет иметь преимущественную силу.

### Примеры

Пример 1. Терапевтическое нацеливание на несколько аспектов сердечной недостаточности.

В некоторых аспектах в настоящем раскрытии предлагаются композиции и способы, которые подходят для лечения одного или нескольких состояний сердца (например, кардиомиопатии, гипертрофической кардиомиопатии, дилатационной кардиомиопатии, сердечной недостаточности, заболевания сердца и т.д.). В некоторых вариантах осуществления композиции, предлагаемые в раскрытии, вводят интраваскулярно в коронарные артерии. В некоторых вариантах осуществления композиции можно вводить субъекту путем множественных прямых инъекций в сердце. Конструкция AAV, которая может быть предоставлена субъекту, изображена на фиг. 1. В определенных вариантах осуществления такая конструкция AAV инкапсулируется рекомбинантным AAV (например, AAVrh. 10 или AAV6) и содержит кодирующие последовательности кальций-связывающего белка A1 S100 (S100A1) и репрессора апоптоза с доменом рекрутирования каспазы (ARC) для нацеливания на два отдельных аспекта одного или нескольких состояний сердца (например, кардиомиопатии). Оба трансгена из конструкции AAV на фиг. 1 управляют сердечным промотором TnT и таким образом будут экспрессироваться только в кардиомиоцитах.

S100A1 улучшает аспекты обмена кальция, включая нормализацию переходных процессов кальция саркоплазматического ретикулума, что приводит к нормализации сократительной функции. ARC блокирует апоптоз, инициированный митохондриальными и немитохондриальными механизмами (например, апоптоз, вызванный растяжением), а также улучшает функцию митохондрий. Эти два отдельных компонента сердечной недостаточности (нарушение обмена кальция и апоптоз) рассматривают раздельно, но никогда вместе. Таким образом, синергические преимущества такого подхода обеспечивают терапевтические возможности, которые могут привести к улучшению длительных результатов. Путем нацеливания

на оба аспекта кардиомиопатии, композиции и способы, предлагаемые в настоящем изобретении, можно использовать для лечения нескольких состояний сердца (например, гипертрофической или дилатационной кардиомиопатии), и они будут полезны на любой стадии сердечной недостаточности.

Пример 2. Гемотерапия дилатационной кардиомиопатии у собак.

Дилатационная кардиомиопатия (ДКМП) является второй наиболее распространенной причиной приобретенного заболевания сердца у собак, чаще всего поражающей собак крупных пород, таких как доберман-пинчеры, немецкие доги и ирландские волкодавы. У людей, страдающих этим заболеванием, есть хирургические варианты, такие как трансплантация сердца и вспомогательные устройства для левого желудочка. Однако в ветеринарии единственным терапевтическим вариантом является медикаментозное лечение признаков, связанных с сердечной недостаточностью. Прогноз для пораженной собаки зависит от стадии заболевания и породы. Например, большинство доберман-пинчеров живут менее 6 месяцев после развития застойной сердечной недостаточности (ЗСН). Напротив, другие породы, такие как коккер-спаниели, как правило, выживают дольше. По мере прогрессирования заболевания сердца нарушение работы каналов, регулирующих движение кальция в клетках сердца, способствует нарушению циклического обмена кальция, дальнейшему нарушению регуляции сокращения и расслабления сердца. Примечательно, что аномалии транспорта кальция были обнаружены у собак с ДКМП, а также при сердечной недостаточности, которая развивалась вторично при многих различных этиологиях.

Стратегии переноса генов разработаны для нормализации аномалий циклического обмена кальция, улучшения состояния больного сердца у малых и больших моделей животных с различными формами пораженного сердца. На самом деле уже проводятся клинические испытания этого терапевтического подхода к кардиомиопатии на людях, и предварительные результаты обнадеживают. Пилотное исследование оценивает эффективность доставки гена, предназначенного для нормализации обмена кальция у доберман-пинчеров, страдающих ДКМП и проявляющих ХСН. Используют доберман-пинчеров, потому что у этой породы широко распространена ДКМП, и заболевание имеет тенденцию быстро и равномерно прогрессировать у этой породы, как только разовьется ХСН. Новые методы борьбы с ДКМП окажут значительное влияние на все породы собак, предрасположенные к этому идиопатическому заболеванию, включая доберманов, боксеров, немецких догов, немецких овчарок, золотистых ретриверов и т.д. Примечательно, что предыдущие исследования уровней белка в миокарде при поражении у собак с наиболее распространенными формами природного заболевания сердца (собаки с дегенеративным клапаном и ДКМП) показали, что несколько уровней белка (включая S100A1) были аномальными (S100A1 был снижен).

Эти данные позволяют предположить, что доставка гена, нацеленного на S100A1, может эффективно лечить ДКМП, а также недостаточность миокарда, развивающуюся вторично по отношению к дегенеративному заболеванию клапанов. Кроме того, апоптоз (программируемая гибель клеток) чаще встречается в пораженном миокарде и АРК является мощным и многофункциональным ингибитором апоптоза. В настоящее время стандартом ветеринарной помощи при сердечной недостаточности является медикаментозное лечение перегрузки жидкостью и гиперемии. Способы доставки генов, направленные на аномальные миокардиальные регуляторные молекулы, предлагают механистическую мишень, что может позволить ветеринарному врачу специфически лечить патологический процесс миокарда с самого начала. Кроме того, стоимость, связанная с текущими технологиями производства векторов и интрамиокардиальной доставкой вектора, делает стоимость этой терапии доступной для многих владельцев, при этом ожидают, что затраты со временем уменьшатся.

Минимально инвазивный способ переноса гена с использованием AAV 2/6 привел к трансдукции >75% клеток миокарда у здоровых собак (см. Bish LT, Sleeper MM, Brainard B, et al. Percutaneous transendocardial delivery of self-complementary adeno-associated virus 6 achieves global cardiac gene transfer in canines. *Mol. Ther.* 16, 1953-9 (2008)). Шесть здоровых беспородных собак лечили вектором на основе AAV2 или AAV6, кодирующим доминантно-негативную форму фосфоламбана (dn-PLN) (псевдофосфорилированная форма, которая конкурирует с нативным фосфоламаном, таким образом снижая его ингибирующее действие на SERCA2a) (n=4) или AAV2/6 dn-PLN и S100A1 (n=2). Все собаки оставались здоровыми с нормальной сердечно-сосудистой функцией в течение 2 лет после лечения, что указывает на то, что терапия не вызывала миокардит или значительно не изменяла сердечную функцию, таким образом, поддерживая безопасность этого терапевтического подхода. Сердечную функцию можно измерять по фракции выброса или любым другим известным в данной области способом.

Фактически, делали инъекции более чем 40 нормальным и больным собакам (см. ниже), и результаты на сегодняшний день показывают, что инъекционный способ хорошо переносится. Кроме того, у 20 случайных собак в ветеринарной больнице Мэтью Дж. Райана Пенсильванского университета отбирали образцы на антитела к гAAV2/6 и обнаружили, что титры находились в пределах допустимого диапазона для лечения у 19 из 20 собак, что указывает на то, предшествующие иммунные ответы являются поводом для исключения значительной части кандидатов на терапию. Чтобы определить, был ли этот терапевтический подход эффективен для лечения ДКМП, затем лечили португальских водных собак с тяжелой формой быстро прогрессирующей ювенильной ДКМП. Примечательно, что у собак, которым вводили AAV2/6dn-PLN, наблюдали заметное снижение фосфорилированного PLN, что подтверждает потенци-

альную способность этого подхода нормализовать кальциевый цикл у этой модели заболевания. Кроме того, доставка гена с вектором, содержащим как dn-PLN, так и S100A1, замедляла развитие ХСН, вторичной по отношению к ДКМП, в большей степени, чем доставка вектора, содержащего только dn-PLN. Комбинированный вектор отсрочивал начало ХСН в среднем на 4 недели по сравнению с терапией только dn-PLN. По этой причине комбинированный векторный подход используют в пилотном исследовании, чтобы определить, эффективна ли генотерапия для продления жизни доберманов, страдающих ДКМП и хронической сердечной недостаточностью во взрослом возрасте.

Исследование имеет слепой плацебо-контролируемый дизайн. Основываясь на последних 12 леченых доберман-пинчерах с ДКМП и ХСН, средняя выживаемость составила 148 суток (стандартное отклонение 160 суток). При использовании мощности 0,8, альфа (двухсторонней) 0,05 и соотношении случаев к контролю 1, необходим размер выборки в 13 собак в каждой группе для выявления разницы в шестимесячной выживаемости. Этот расчет определяли с помощью параметрического теста на размер выборки. В исследование были включены 26 доберман-пинчеров с ДКМП и контролируемой ХСН. Для того чтобы быть включенной в исследование, собака должна иметь титр циркулирующих нейтрализующих антител к AAV2/6 менее 1:20 и не иметь внесердечного заболевания. Дополнительно исключали собак с сопутствующим врожденным пороком сердца или признаками первичного митрального порока сердца. На исходном уровне (время включения) для целей скрининга использовали титр антител, общий анализ крови и биохимический анализ. Собаки проходили трехминутную электрокардиограмму (ЭКГ) и полную эхокардиограмму (ЭХО), а владельцы заполняли предварительно утвержденный опросник качества жизни. ЭКГ оценивали на продолжительность интервалов и наличие аритмий. ЭХО включала в себя 2D, М-режим и доплерографию (в т.ч. тканевую доплерографию). Рентгенограммы грудной клетки использовали до стадии выздоровления (собаки клинически компенсированы с наличием в анамнезе хронической сердечной недостаточности).

Собак, отвечающим требованиям для зачисления, случайным образом распределяли в группу плацебо (сердечная инъекция с физиологическим раствором) или группу генотерапии (сердечная инъекция с AAV2/6-ARC-s100a1). Стандартное медикаментозное лечение ДКМП и застойной сердечной недостаточности продолжали на протяжении всего исследования у всех собак (терапия пимобенданом, ингибитором ангиотензина и диуретиком). Физиологический раствор вместо пустого капсула используют в качестве фиктивной терапии, так что контрольным собакам может быть проведена доставка гена, если группа лечения продемонстрирует значительное улучшение по сравнению с группой плацебо. Через 2, 4, 6, 9 и 12 месяцев после терапии повторяют ЭКГ, ЭХО, опросник качества жизни и лабораторные анализы. Статистический анализ проводят с интервалом в два месяца.

На фиг. 2 и 3 изображены данные диастолы (расслабления) и систолы (сокращения), соответственно, у леченой собаки с мио дистрофией. Контур эндокарда и эпикарда видны на каждой из фигур. Данные указывают на стабильную или слегка улучшенную функцию после лечения в течение нескольких недель, как видно из табл. 1. В табл. 1 ниже показаны результаты массы левого желудочка (МЛЖ [г]), конечного диастолического объема (КДО [мл]), конечного систолического объема (КСО [мл]), ударного объема (УО [мл]), фракции выброса (ФВ [%]) и минутного объема (МО [л/мин]) из данных, полученных в моменты времени 1 (до лечения) и времени 2 (после лечения).

Таблица 1

Получение данных	МЛЖ [г]	КДО [мл]	КСО [мл]	УО [мл]	ФВ [%]	МО [л/мин]
Время 2	91,395035	54,22289	24,595001	29,627889	54,640926	3,940509
Время 1	87,251524	57,471229	25,660014	31,811215	55,351548	3,117499

Пример 3. Оценка фенотипов дистрофии после введения вектора мышам и собакам.

Доставку генов AAV в сердце из самокомплементарного вектора S100A1/ARC оценивали на моделях мио дистрофии Дюшенна (недостаточность дистрофина) у мышей и собак. Ранее серотипы AAV8 (включая несколько его вариантов), AAV9 и AAVrh.10 сравнивали по своей способности инфицировать сердца собак, и AAVrh.10 оказался наиболее эффективным. По этой причине AAVrh.10 использовали для всех экспериментов, описанных в этом примере.

Mdx (дистрофин-дефицитные) мышам на основе DBA/2J ("D2.mdx") инъецировали в возрасте 4 недель вектором на основе рекомбинантного AAVrh.10-S100A1/ARC (далее именуемого "терапевтический AAV") и умерщвляли через 24 недели. D2.mdx мыши повторяют несколько человеческих характеристик миопатии мио дистрофии Дюшенна, такие как снижение мышечной массы нижних конечностей, атрофия миофибрилл, усиление фиброза и воспаления и мышечная слабость. В течение этого 24-недельного периода у мышам, которым вводили терапевтический AAV, лучше сохранялись фракция выброса, развитие напряжения и минутный объем по сравнению с мышам, которым делали имитацию инъекции (см. фиг. 4), по данным МРТ сердца. Анализ белков (вестерн-блоттинг) подтвердил, что уровни как S100A1, так и

ARC были повышены в леченых тканях по сравнению с контрольными (имитация инъекции) (см. фиг. 5). Кроме того, гистология сердца показала, что леченые сердца демонстрировали гораздо меньше патологии по сравнению с контрольными сердцами (см. фиг. 6).

Две собаки с GRMD (с недостаточностью дистрофина), модель собаки с миодистрофией Дюшенна человека, получали инъекции терапевтическим вектором во время первого снижения их сердечной фракции выброса путем доставки через катетер в коронарные артерии. Фракции сердечного выброса представляют собой симптом, указывающий на начало кардиомиопатии. Более ранние результаты исследования анамнеза собак указывали на то, что как только фракция выброса начинает падать, она продолжает прогрессивно падать в течение следующего года (фиг. 18). Собаки, как правило, не выживают дольше 8-12 месяцев, после того как фракция выброса начинает неуклонно снижаться.

Как показано на фиг. 7 и 8, оба субъекта показали улучшение фракции выброса и других сердечных параметров через несколько месяцев после лечения AAVrh.10-S100A1/ARC, что было измерено с помощью МРТ сердца и подтверждено эхо-измерениями. Почти через 12 месяцев после лечения у первого субъекта выявляли устойчивую фракцию выброса в пределах нормы. Аналогичным образом, почти через 7 месяцев после лечения у второго субъекта наблюдали устойчивую нормальную фракцию выброса.

Улучшилась не только сердечная функция, но также присутствовало и постоянное улучшение переносимости физических нагрузок у собак, что качественно оценивали путем съемки субъектов во время физических нагрузок. В соответствии с этой улучшенной переносимостью физических нагрузок измерения МРТ отдельных конечностей показали, что скелетно-мышечная масса была либо увеличена, либо не изменилась после лечения AAV (фиг. 9A-9C). Кроме того, уровни циркулирующей креатинкиназы (КК) в скелетных мышцах снижались после лечения (фиг. 10), что указывает на снижение продолжающегося повреждения мышц.

Пример 4. Лечение собак с ДКМП.

У доберман-пинчеров самая высокая заболеваемость ДКМП среди всех пород собак. Генетические основы этого известны только для субпопуляции собак. Это обеспечивает большую модель животных с ДКМП и сердечной недостаточностью без каких-либо других генетических осложнений. Только собак с поздней стадией сердечной недостаточности лечили тем же вектором AAV.S100A1.ARC, который использовали для собак с GRMD. Целью лечения являлось как улучшение сердечной функции, так и продление жизни.

К настоящему моменту двух доберман-пинчеров лечили AAVrh.10-S100A1/ARC посредством введения катетера в коронарные артерии, при этом обе собаки испытывали сердечную недостаточность во время лечения. Обе собаки показали быстрое улучшение после лечения. Каждую собаку оценивали двумя сериями эхокардиографии после лечения для оценки структурных и функциональных параметров сердца, включая (но без ограничений указанными) объемы желудочков, толщину стенок и диаметры камер в диастолу и систолу, а также фракцию укорочения и фракцию выброса.

Первую собаку лечили с фракцией выброса всего 10%, и таким образом она была близка к смерти на момент лечения. В течение 24 часов после обработки фракция выброса улучшилась до 25%. При первом контрольном посещении собаки через 4 месяца после лечения фракция выброса оставалась стабильной на уровне 26%. При втором наблюдении через 6 месяцев ее фракция выброса составила 32%. Собака умерла от хронической сердечной недостаточности в возрасте 8 месяцев. Таким образом, лечение, по-видимому, продлевало жизнь, но сердечная функция уже была слишком нарушена к моменту лечения для длительного выживания.

У второго доберман-пинчера, получавшего лечение, фракция выброса составляла 32% до лечения, фракция низкая, но не угрожающая непосредственной смертельной опасностью. У собаки фракция выброса улучшилась до 49% в течение 24 часов после лечения, что находится в пределах нормы. При обследовании через 4 месяца после лечения у собаки фракция выброса составила 52%, а через 8 месяцев фракция выброса составляла 50%. Перед возвращением на годовое обследование у собаки был диагностирован рак легких, и она умерла спустя два месяца. Ее причина смерти не была связана с сердечной недостаточностью.

На основании полученных результатов, лечение AAVrh.10-S100A1/ARC способно восстановить нормальную сердечную функцию у собак.

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

Конструировали плазмиды, содержащие полученные от человека последовательности кДНК ARC ("hARC") и S100A1 ("hS100A1"), для оценки у мышей. Нативные гены человека cARC и S100A1 были оптимизированы по кодонам для экспрессии в клетках человека.

Эти плазмиды содержат нуклеотидные последовательности из SEQ ID NO: 9-12. Каждая из этих плазмид содержит последовательности кДНК cARC и S100A1, функционально контролируемые промотором cTnT, а также IRES между этими двумя последовательностями. Все четыре плазмиды содержат кодон-оптимизированную последовательность cARC человека (hARC). Плазмиды, представленные в SEQ ID NO: 9 и 10, содержат кодон-оптимизированную последовательность hS100A1; и плазмиды, представленные в SEQ ID NO: 11 и 12, дополнительно содержат последовательность hS100A1 дикого типа.

Каждую из этих четырех плазмид клонировали в самокомплементарный вектор AAVrh.10, а затем

инкапсидировали в частицу gAAV. Частицы gAAVrh.10, содержащие эти векторы, вводили мышам.

Оценивали уровень экспрессии ARC и S100A1 у мышей. Отслеживали и оценивали фенотипы дистрофии и сердечную функцию, включая сердечную фракцию выброса.

Пример 6. Длительные исследования мышей и собак.

Исследования мышей с дистрофией.

Доставка генов S100A1 и ARC на основе AAV в сердце приводит к сохранению сердечной функции. В дополнение к ранее представленным исследованиям на мышах (фиг. 4-6) были проведены два типа долгосрочных исследований, результаты которых обобщены на фиг. 15-17. На фиг. 15 и 16 показаны данные от мышей с дефицитом дистрофина на фоне сильного фиброза, мышь DBA/2J (также обозначаемая как "D2"), таким образом, создавая то, что называется мышь D2.mdx. Этим мышам лечили в возрасте 1 месяца AAV, содержащим кассету с двойным трансгеном (S100A1 и ARC), функционально контролируруемую промотором сердечного тропонина T (сTnT). Мышей содержали в малоподвижной среде до десятимесячного возраста, в котором оценивали их сердечное состояние.

Превосходство доставки генов S100A1 и ARC на основе AAV в сердце по сравнению с каждым трансгеном в отдельности.

Параллельно с этими исследованиями было также проведено исследование выживаемости у мышей D2.mdx, у которых наблюдали трансгенное спасение только скелетных мышц за счет экспрессии утrophина под контролем альфа-актинового промотора скелетных мышц (см. Rafael JA, et al. Skeletal muscle-specific expression of a utrophin transgene rescues utrophin-dystrophin deficient mice. Nat Genet. 19: 79-82, 1998), которых обозначали как мыши D2.mdx.sk\_utrophin. Задача состояла в том, чтобы создать мышь, у которой была бы чистая дилатационную кардиомиопатию, приводящую к сердечной недостаточности и смерти в основном без какой-либо нагрузки легочной мускулатуры или скелетной мускулатуры. Это позволило тренировать мышь, размещая их по отдельности с беговыми колесами. Упражнение создает дополнительную нагрузку и напряжение для сердца, что приводит к ускорению развития кардиомиопатии и сердечной недостаточности. Чтобы лучше смоделировать клиническую ситуацию, в которой индивидуумы не получали бы лечения до начала измеримых сердечных заболеваний, мышам лечили в возрасте 6 месяцев, когда присутствует фиброз и начинают проявляться аномалии сердечной функции.

Чтобы оценить потенциальное превосходство доставки S100A1+ARC вместе в одной и той же конструкции относительно доставки ARC или S100A1 отдельно, либо не доставляли трансген (контроль), либо доставляли вектор gAAV, содержащий тот же сердечный промотор, что и в двойной трансгенной конструкции, управляющий или той же кДНК S100A1 или ARC, используемой в двойной кассете, но по отдельности, а не в комбинации. Таким образом, способность либо одного ARC, либо одного S100A1, либо комбинации S100A1 и ARC сравнивали с продлением жизни у этой модели сердечной недостаточности.

Как показано на фиг. 17, любой трансген сам по себе был способен значительно увеличить продолжительность жизни, ARC на 4 месяца и S100A1 на 5 месяцев. Однако сочетание трансгенов, S100A1 и ARC, увеличивает продолжительность жизни на 10 месяцев, до возраста 20 месяцев. Мыши дикого типа D2 имеют продолжительность жизни всего около 23 месяцев, так что это представляет собой чрезвычайно сильное спасение сердца. Комбинация трансгенов в двойной конструкции gAAV обеспечивает синергическую эффективность. Поскольку введение вектора увеличило продолжительность жизни мышам D2 приблизительно до продолжительности жизни дикого типа и продлило продолжительность жизни относительно векторов с одним трансгеном на 4-5 месяцев, эти результаты свидетельствуют о статистически значимом улучшении относительно терапии одним вектором.

Исследования собак с дистрофией.

Затем было проведено исследование по распространению результатов лечения мышам на собак с GRMD. Исследование, проводимое на собаках с GRMD (четыре собаки на сегодняшний день), подразумевает лечение AAVrh.10-S100A1/ARC (последовательности трансгена собаки), когда сердечная функция, оцениваемая по фракции выброса, падает ниже уровней, характерных для естественного анамнеза нелеченой собаки. Использовали частые эхокардиографии и/или МРТ для оценки структурных и функциональных параметров сердца для отслеживания сердечного статуса собак. Первую собаку, получавшую лечение (WnM3/Калвин), наблюдали более 2 лет, в течение которых ее сердечная функция улучшалась и оставалась стабильной. Эта собака умерла из-за осложнений, связанных с аспирационной пневмонией, в возрасте 34 месяцев, но ее сердечная функция оставалась стабильной и в пределах нормы на протяжении всего этого возраста. У всех остальных трех собак были улучшения после первоначального лечения, и они демонстрировали стабильную сердечную функцию в течение более чем года. Эти данные показаны на фиг. 18. Смерть Калвина от пневмонии позволила оценить гистологию его сердца, показанную на фиг. 19. Примечательно, что гистология левого желудочка (фиг. 19, крайняя правая колонка гистологических срезов) практически неотличима от гистологии нормальной собаки (фиг. 19, крайняя левая колонка панелей). Напротив, без лечения гистология левого желудочка сильно фиброзирована в возрасте 8 месяцев (один месяц после лечения WnM3) (фиг. 19, вторая слева колонка панелей) и еще более фиброзна в возрасте двух лет (средние панели). Это свидетельствует о почти полном спасении сердца у крупной модели животных с ДКМП, которая прогрессирует до сердечной недостаточности и смерти в

возрасте от одного до двух лет. В этой популяции никогда не было нелеченой собаки, которая прожила бы дольше возраста 30 месяцев (фиг. 18), и типичной причиной смерти является сердечная недостаточность.

Пример 7. Исследования иммунного ответа.

Четырех миниатюрных свиней массой 45-70 кг лечили векторами на основе gAAV по настоящему раскрытию. Две свиньи получали высокую дозу  $2 \times 10^{14}$  копий генома, а две других получали более низкую дозу  $2 \times 10^{13}$  копий генома. В каждом случае две трети вируса доставляли в левую часть сердца, а одну треть дозы - в правую. Свиньи проходили скрининг на антитела против AAVrh10 до включения в исследование. Кровь для этой цели предоставила Synchro.

Кровь собирали в пробирку с красной крышкой, позволяющую свертываться в течение приблизительно 30 минут, и центрифугировали при  $1000 \times G$  в течение 15 минут, а сыворотку делили на аликвоты по 200 мкл и замораживали перед скринингом. Сыворотку использовали для анализа ранее существовавших антител.

Схема иммуносупрессии.

Начиная с суток 1 до введения гена, субъекты получают 1 мг/кг глюкокортикоида (или эквивалента преднизона) ежедневно в течение 60 суток после инфузии. Через 60 дней после переноса генов вводят постепенно снижающуюся дозу глюкокортикоидов и проводят мониторинг печеночных ферментов на предмет иммунного ответа. В случае иммунного ответа дозу глюкокортикоидов и схему вводят повторно по усмотрению врача.

На всем протяжении введения глюкокортикоидов вводят профилактические антибиотики в качестве меры предосторожности.

Доставка частиц gAAV к сердцу свиньи.

Интродьюсер помещают в сонную или бедренную артерию.

Ангиокатетер типа "косичка" продвигают в левый желудочек для проведения коронарной ангиографии с целью определения коронарных сосудов при цифровой флюороскопии.

Коронарные катетеры (каждый) промывают гепаринизированным физиологическим раствором с  $1 \text{ см}^3$  крови субъекта и вводят в корень аорты и левое и правое коронарные отверстия (размер Джудкинса R или L зависит от размера животного).

Аденозин с постоянной скоростью инфузии (1 мг/кг/мин) вводят внутривенно. Вектор доставляют в коронарное русло через 15 секунд постоянной скорости инфузии аденозина. Вектор вводят в течение 5-10 секунд, а инфузию с постоянной скоростью продолжают 30 секунд после завершения доставки вектора.

2/3 вектора вводят в левую коронарную артерию и 1/3 вектора вводят в правую коронарную артерию.

Субъектов свиней контролировали еженедельными заборами крови (химический анализ сыворотки, общий анализ крови, антитела к AAVrh10 (выполняется спонсором), ответ ELISPOT) в течение 2 месяцев после доставки AAV. Через два месяца после доставки свиней умерщвляли и получали сердца и другие ткани (см. список ниже) (образцы взяты для фиксации формалином и свежемороженые), и ткани были доступны.

Необходимые заборы крови:

сывороточная химия - 1 пробирка с красной крышкой.

Панель общего анализа крови - 1 пробирка с ЭДТА с фиолетовой крышкой.

Анализ ИФА против AAVrh10 - 1 пробирка с красной крышкой.

ELISPOT не менее 1 пробирки в 10 мл с ЭДТА с фиолетовой крышкой.

Посмертные процедуры.

Специальные процедуры.

Коллекция свежемороженых тканей и фиксированных формалином, погруженных в парафин тканей.

Мышца/ Орган	Сокращение	Левый/Правый
Передняя большеберцовая мышца	R/L TA	Обе
Длинный разгибатель пальцев	R/L EDL	Оба
Камбаловидная мышца	R/LSOL	Обе
Бицепс	R/L BIC	Оба
Трицепс	R/ L TRI	Оба
Сердце	HRT	-
Легкое	LUNG	-
Почка	KIDNEY	-
Печень	LIV	-
Селезенка	SPLN	-
Половая железа	GND	-
Поджелудочная железа	PANC	-
Подколенный лимфоузел	POPLN	-
Паховый лимфоузел	ING LN	-
Брюшинный лимфоузел	MES LN	-
Бедренная артерия	R/L FEM ART	Обе
Икроножная артерия	R/LSUR ART	Обе
Мочевой пузырь	BLADDER	-
Диафрагма	DIA	-
Желудок	STMCH	-
Головной мозг	BRAIN	-
Спинальный мозг	SPN CORD	-
Нерв	NERVE	-
Икроножный нерв	SUR	L/R
Воротная вена	Portal Vein	-
Аорта	Aorta	-
Нижняя полая вена	IVC	-
Воротная вена печени	HPV	-

Пример 8. Векторы на основе рекомбинантного AAV с повышенной эффективностью упаковки и высокими титрами.

Были разработаны векторы на основе рекомбинантного AAV (rAAV), которые (1) уменьшали содержание гуанозина (G) и цитозина (C) в трансгене S100A1 и (2) содержали другой, меньший сигнал полиА, чем ранее разработанные векторы (включая те, что указаны в SEQ ID NO: 9-12). Трансгены S100A1 с пониженным содержанием G/C, которые ранее были оптимизированы по кодонам для экспрессии у людей или собак, показаны в SEQ ID NO: 25 (человек) и 26 (собаки). Трансгены сARC, в которые не было внесено никаких изменений относительно предыдущих итераций и которые ранее были оптимизированы по кодонам для экспрессии у людей или собак, показаны в SEQ ID NO: 6 (человек), 7 (человек) и 16 (собаки). Другой, меньший сигнал полиА, используемый в новоразработанных векторах, показан в SEQ ID NO: 28. Новоразработанные полные векторы на основе rAAV показаны в SEQ ID NO: 22 (человек) и 23 (собаки).

Новоразработанные векторы на основе гAAV были оптимизированы для повышения эффективности упаковки, что привело к более высоким титрам вектора и, таким образом, к снижению производственных затрат. Чтобы оценить, проявляли ли новоразработанные векторы на основе гAAV эти свойства относительно аналогичных векторов на основе гAAV, ранее разработанными авторами изобретения, было проведено слепое исследование, в ходе которого в стороннюю производственную лабораторию была предоставлена ДНК для недавно разработанного вектора на основе гAAV для человека с уменьшенным содержанием G/C в трансгене S100A1 и меньшим сигналом полиА (SEQ ID NO: 22) и ранее разработанного вектора на основе гAAV для человека (SEQ ID NO: 9). Сторонняя производственная лаборатория не знала о различиях, существовавших между конструкциями ДНК, предоставленными авторами изобретения. Объем производства по каждому вектору можно увидеть в табл. 2.

Таблица 2

Название вектора	SEQ ID NO	Титр (содержание генома/мл)	Объем аликвота (мл)	и	Общее содержание генома
AAVrh.10.cTnT.cARC-Opt_IRES_cS100A1-Opt_#1	9	$1,00 \times 10^{13}$	6,8 мл,	34	$6,80 \times 10^{13}$
AAVrh.10.cTnT.cARC-Opt_IRES_cS100A1-Opt_#2	22	$2,7 \times 10^{13}$	18 мл,	6	$4,86 \times 10^{14}$
			пробирки, 34×200 мкл		
			пробирок, 6×3 мл		

Ранее сконструированная конструкция (SEQ ID NO: 9) демонстрировала титр  $1,00 \times 10^{13}$  копий генома на мл, как и в предыдущих исследованиях. Примечательно, однако, что недавно разработанный вектор (SEQ ID NO: 22) показал 2,7-кратное улучшение титра и показал титр  $2,7 \times 10^{13}$  копий генома на мл. Кроме того, чистота векторов на основе гAAV не изменилась (фиг. 20). Таким образом, недавно разработанный вектор на основе гAAV для человека с уменьшенным содержанием G/C в трансгене S100A1 и меньшим сигналом полиА (SEQ ID NO: 22) показывает улучшение эффективности упаковки и титра в 2-3 раза по сравнению с ранее разработанным вектором на основе гAAV для человека (SEQ ID NO: 9). Повышение эффективности упаковки и титра при производстве гAAV является важным, поскольку такие улучшения значительно снижают общую стоимость производства гAAV.

В некоторых вариантах осуществления недавно разработанный вектор на основе гAAV для человека со сниженным содержанием G/C в трансгене S100A1 и меньшим сигналом полиА (SEQ ID NO: 22) демонстрирует улучшение эффективности упаковки и титра от 2 до 3 раз по сравнению с ранее разработанным вектором на основе гAAV для человека (SEQ ID NO: 9), и никаких изменений в функциональности вектора гAAV не наблюдается.

#### Эквиваленты.

Несмотря на то, что в настоящем документе было описано и проиллюстрировано несколько вариантов осуществления согласно изобретению, специалисты в данной области легко представят множество других средств и/или структур для выполнения функции и/или получения результатов и/или одного или нескольких преимуществ, предлагаемых в настоящем документе, и каждый из таких вариантов и/или модификаций считается входящим в объем вариантов осуществления изобретения, предлагаемых в настоящем документе. В более общем смысле, специалисты в данной области с легкостью поймут, что все параметры, размеры, материалы и конфигурации в настоящем документе предназначены для описательных целей, и что фактические параметры, размеры, материалы и/или конфигурации будут зависеть от конкретного применения или применений, для которых используют идею изобретения. Специалисты в данной области распознают или смогут установить с помощью не более, чем общепринятого экспериментирования, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, предлагаемых в настоящем документе. Таким образом, следует понимать, что указанные варианты осуществления представлены только в качестве примера и что в объеме прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов, варианты осуществления изобретения могут быть реализованы иначе, чем конкретно описано и заявлено. Множество вариантов осуществления настоящего раскрытия относятся к каждому отдельному признаку, системе, изделию, материалу, набору и/или способу, предлагаемым в настоящем документе. Кроме того, любое сочетание двух или более таких признаков, систем, изделий, материалов, наборов и/или способов, если такие признаки, системы, изделия, материалы, наборы и/или способы не противоречат друг другу, включено в объем изобретения по настоящему раскрытию.

Все определения, как они определены и используются в настоящем документе, следует понимать как имеющие преимущество над определениями словаря, определениями в документах, включенных посредством ссылки, и/или обычными значениями определенных терминов.

Все ссылки, патенты и патентные заявки, предлагаемые в настоящем документе, включены посредством ссылки в отношении объекта изобретения, для которого каждая из них цитируется, что в некоторых случаях может охватывать весь документ.

Неопределенные артикли "a" и "an", используемые в настоящем документе в описании и в формуле изобретения, если явно не указано иное, следует понимать как означающие "по меньшей мере один".

Фразу "и/или", как применяют в настоящем документе в описании и в формуле изобретения, следует понимать как означающую "любой или оба" из элементов, соединенных таким образом, т.е. элементов, которые в некоторых случаях совместно присутствуют и в других случаях раздельно присутствуют. Множественные элементы, перечисленные с "и/или", должны толковаться одинаково, т.е., "один или несколько" элементов, соединенных таким образом. Не обязательно могут присутствовать другие элементы, отличные от элементов, конкретно идентифицированных пунктом "и/или", независимо от того, связаны они или не связаны с этими конкретно идентифицированными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера ссылка на "А и/или В", когда ее используют в выражениях с неограничивающей формулировкой, такой как "содержащий", может относиться, в одном из вариантов осуществления, только к А (необязательно включая элементы, отличные от В), в другом варианте осуществления, только к В (не обязательно включая элементы, отличные от А), еще в одном варианте осуществления, и к А, и к В (не обязательно включая другие элементы), и т.д.

Как применяют в настоящем документе в описании и формуле изобретения, "или" следует понимать как имеющее то же значение, что и "и/или", как определено выше. Например, при разделении элементов в списке "или" или "и/или" следует интерпретировать как включающее, т.е. включение по меньшей мере одного, но также включение более чем одного элемента из ряда или списка, и, необязательно, дополнительных неуказанных элементов. Только термины, явно указывающие на обратное, такие как "только один из" или "точно один из", или при использовании в формуле изобретения "состоящий из" будут относиться к включению ровно одного элемента из ряда или списка элементов. Как правило, термин "или", как применяют в настоящем документе, должен толковаться как обозначающий исключительные альтернативы (т.е., "один или другой, но не оба") только тогда, когда ему предшествуют термины исключительности, такие как "любой", "один из", "только один из" или "ровно один из". "Состоящий по существу из" при использовании в формуле изобретения имеет свое обычное значение, используемое в области патентного права.

Как применяют в настоящем документе в описании и формуле изобретения, фразу "по меньшей мере один", относящуюся к списку из одного или нескольких элементов, следует понимать как означающую по меньшей мере один элемент из любого одного или нескольких выбранных элементов в списке элементов, но не обязательно включая по меньшей мере один из любых элементов, конкретно перечисленных в списке элементов, и не исключая любые комбинации элементов в списке элементов. Это определение также допускает, что могут необязательно присутствовать элементы, отличные от элементов, конкретно идентифицированных в списке элементов, к которым относится фраза "по меньшей мере один", независимо от того, связаны они или не связаны с этими конкретно идентифицированными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера "по меньшей мере один из А и В" (или, что то же самое "по меньшей мере один из А или В", или, что то же самое "по меньшей мере один из А и/или В") может ссылаться, в одном из вариантов осуществления, на по меньшей мере один, необязательно включая более одного, А, без присутствия В (и необязательно включая элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления по меньшей мере один, необязательно включающий более одного, В, без присутствия А (и необязательно включающий элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления по меньшей мере один, необязательно включая более одного, А, и по меньшей мере один, необязательно включающий более одного, В (необязательно включающий другие элементы); и т.д.

Также следует понимать, что, если прямо не указано иное, в любых способах, заявленных в настоящем документе, которые предусматривают более одной стадии или действия, порядок стадий или действий способа не обязательно ограничивается порядком, в котором перечисляются стадии или действия.

В формуле изобретения, а также в приведенном выше описании все переходные фразы, такие как "содержащий", "включающий", "несущий", "имеющий", "состоящий", "содержащий в себе", "включающий в себя", "состоящий из" и т.п. следует понимать как неограниченные, т.е., включающие в качестве неограничивающих примеров. Только переходные фразы "состоящий из" и "состоящий по существу из" должны быть закрытыми или полузакрытыми переходными фразами, соответственно, как указано в Руководстве Патентного ведомства Соединенных Штатов Америки по процедурам патентной экспертизы, Раздел 2111.03. Следует учитывать, что варианты осуществления, описанные в этом документе с использованием открытой переходной фразы (например, "содержащий"), в альтернативных вариантах осуществления также рассматриваются как "состоящие из" и "по существу состоящие из" признака, описанного в открытой переходной фразе. Например, если в раскрытии описывается "композиция, содержащая А и В", в раскрытии также рассматриваются альтернативные варианты осуществления "композиция, состоящая из А и В" и "композиция, состоящая по существу из А и В".

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вектор на основе нуклеиновой кислоты рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV) для доставки двух или более трансгенов в сердце субъекта, причем указанный вектор содержит последовательно от 5' к 3' первую последовательность инвертированного концевго повтора (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), два или более трансгенов и промотор, функционально связанный с двумя или более трансгенами, сигнал полиаденилирования (полиА) и вторую последовательность ITR AAV, в котором два или более трансгенов кодируют белок семейства S100 и ингибитор апоптоза, соответственно, и в котором трансген, кодирующий белок семейства S100, содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична любой из нуклеотидных последовательностей из SEQ ID NO: 25 и 26, и в котором ингибитор апоптоза представляет собой сердечный репрессор апоптоза с доменом рекрутирования каспазы (ARC) или его вариант.
2. Вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV по п.1, в котором трансген, кодирующий белок семейства S100, содержит любую из нуклеотидных последовательностей из SEQ ID NO: 25 и 26.
3. Вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV по п.1 или 2, в котором сигнал полиА содержит нуклеотидную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90%, 92,5%, 95%, 98% или 99% идентичности с нуклеотидной последовательностью из SEQ ID NO: 28.
4. Вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV по любому из пп.1-3, в котором сигнал полиА содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 28.
5. Вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV по любому из пп.1-4, в котором трансген, кодирующий белок семейства S100, содержит последовательность, имеющую сниженное содержание гуанозина (G) и цитозина (C) (G/C) относительно любой нуклеотидной последовательности из SEQ ID NO: 5, 8, 19 и 20.
6. Вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV по п.5, в котором содержание G/C снижено на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% или 15% относительно любой из нуклеотидных последовательностей из SEQ ID NO: 5, 8, 19 и 20.
7. Вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV по любому из пп.1-6, в котором трансген, кодирующий ингибитор апоптоза, содержит последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99,5% идентична любой из нуклеотидных последовательностей из SEQ ID NO: 3, 6, 7 и 15-18.
8. Вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV по любому из пп.1-7, в котором трансген, кодирующий ингибитор апоптоза, содержит любую из нуклеотидных последовательностей из SEQ ID NO: 3, 6, 7 и 15-18.
9. Вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV по любому из пп.1-8, в котором участок внутренней посадки рибосомы (IRES) присутствует между трансгеном, кодирующим белок семейства S100, и трансгеном, кодирующим ингибитор апоптоза.
10. Вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV по любому из пп.1-9, в котором трансгены являются специфичными для *homo sapiens* или *canis lupus familiaris*.
11. Вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV по любому из пп.1-10, в котором промотор представляет собой промотор, ограниченный сердечной тканью.
12. Вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV по п.11, в котором промотор представляет собой промотор, ограниченный сердечной тканью, выбранный из группы, состоящей из сердечного тропонина С, сердечного тропонина I и сердечного тропонина Т (сTnT).
13. Вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV по п.11 или 12, в котором промотор представляет собой сTnT.
14. Вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV по п.11, в котором промотор представляет собой промотор, ограниченный сердечной тканью и полученный из гена, выбранного из группы, состоящей из гена тяжелой цепи  $\alpha$ -миозина, гена тяжелой цепи  $\beta$ -миозина, гена легкой цепи 2v миозина, гена легкой цепи 2a миозина, гена CARP, гена сердечного  $\alpha$ -актина, гена сердечного m2-мускаринового рецептора ацетилхолина, ANF, гена сердечной Са-АТФазы саркоплазматического ретикулума и гена скелетного  $\alpha$ -актина или представляет собой искусственный промотор сердечной ткани, полученный из гена MLC-2v.
15. Вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV по любому из пп.1-14, причем вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV является одноцепочечным.
16. Вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV по любому из пп.1-15, причем вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV является самокомплементарным.
17. Вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV по любому из пп.1-16, причем вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99,5% идентична любой из нуклеотидных последовательностей из SEQ ID NO: 22 и 23.
18. Вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV по п.17, причем вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 22.

19. Вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV по п.17, причем вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 23.
20. Частица гAAV, содержащая вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV по любому из пп.1-19, заключенный в капсид AAV.
21. Частица гAAV по п.20, в которой капсид AAV содержит белок капсида, полученный из серотипа AAV1, AAV2, AAV3, AAV6, AAV8, AAVrh.74, AAVrh.10, AAV2/6 или AAV9.
22. Частица гAAV по п.20 или 21, в которой капсид AAV содержит белок капсида, полученный из серотипа AAVrh.10.
23. Композиция для лечения заболевания сердца, содержащая частицу гAAV по любому из пп.20-22.
24. Применение композиции по п.23 или частицы гAAV по любому из пп.20-22 для лечения субъекта, страдающего от заболевания сердца.
25. Применение по п.24, в котором заболевание сердца вызывает у субъекта сердечную недостаточность.
26. Применение по п.24 или 25, в котором заболевание сердца представляет собой кардиомиопатию.
27. Применение по любому из пп.24-26, в котором заболевание сердца представляет собой гипертрофическую кардиомиопатию или дилатационную кардиомиопатию.
28. Применение по п.24 или 25, в котором заболевание сердца представляет собой острую ишемию.
29. Применение по любому из пп.24-28, в котором композицию вводят путем инъекции в сердце субъекта или путем внутрисосудистой инъекции в коронарные артерии субъекта.
30. Применение по любому из пп.24-29, в котором указанное применение приводит к экспрессии двух или более трансгенов в сердце субъекта.
31. Применение по любому из пп.24-30, в котором субъект представляет собой млекопитающее.
32. Применение по п.31, в котором млекопитающее является человеком.
33. Применение по п.31, в котором млекопитающее является домашним животным.
34. Применение по п.33, в котором домашнее животное является собакой или кошкой.
35. Применение по любому из пп.24-34, в котором указанное применение приводит к улучшению сердечной функции у субъекта.
36. Применение по п.35, в котором указанное применение приводит к улучшению сердечной функции у субъекта в течение более чем 10 месяцев.
37. Вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV по любому из пп.1-19, в котором трансген, кодирующий белок семейства S100, расположен 5' по отношению к трансгену, кодирующему ингибитор апоптоза.
38. Вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV по любому из пп.1-19, в котором трансген, кодирующий ингибитор апоптоза, расположен 5' по отношению к трансгену, кодирующему белок семейства S100.
39. Вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV по любому из пп.1-19, 37 и 38, причем вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99,5% идентичную аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 13 или 14.
40. Вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV по любому из пп.1-19 и 37-39, причем вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 13 или 14.
41. Вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV по любому из пп.1-19 и 37-40, причем вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99,5% идентичную аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 24 или 29.
42. Вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV по любому из пп.1-19 и 37-41, причем вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 24 или 29.
43. Вектор на основе нуклеиновой кислоты рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV) для доставки двух или более трансгенов в сердце субъекта, причем указанный вектор содержит последовательно от 5' к 3' первую последовательность инвертированного концевой повтора (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), два или более трансгенов и промотор, функционально связанный с двумя или более трансгенами, сигнал полиаденилирования (полиА) и вторую последовательность ITR AAV, в котором два или более трансгенов кодируют белок семейства S100 и ингибитор апоптоза, соответственно, и в котором трансген, кодирующий белок семейства S100, содержит последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична любой из нуклеотидных последовательностей из SEQ ID NO: 25 и 26, и в котором ингибитор апоптоза представляет собой сердечный репрессор апоптоза с доменом рекрутирования каспазы (ARC) или его вариант.
44. Вектор на основе нуклеиновой кислоты рекомбинантного аденоассоциированного вируса

(гAAV) для доставки двух или более трансгенов в сердце субъекта, причем указанный вектор содержит последовательно от 5' к 3' первую последовательность инвертированного концевой повтора (ITR) адено-ассоциированного вируса (AAV), два или более трансгенов и промотор, функционально связанный с двумя или более трансгенами, сигнал полиаденилирования (полиА) и вторую последовательность ITR AAV,

в котором два или более трансгенов кодируют белок семейства S100 и ингибитор апоптоза, соответственно, и

в котором трансген, кодирующий белок семейства S100, содержит последовательность, которая по меньшей мере на 99,5% идентична любой из нуклеотидных последовательностей из SEQ ID NO: 25 и 26,

и в котором ингибитор апоптоза представляет собой сердечный репрессор апоптоза с доменом рекрутирования каспазы (ARC) или его вариант.

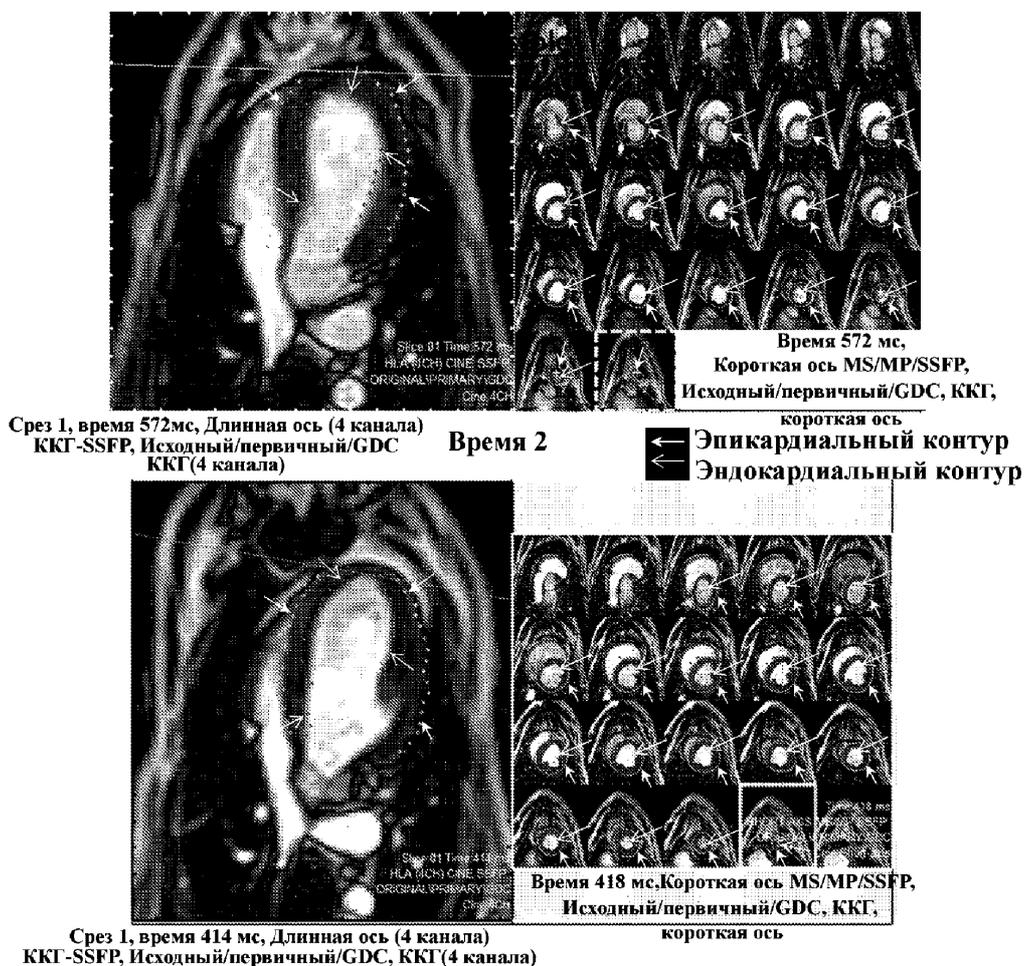


Фиг. 1

### Калвин WnM3

#### Диастола

#### Время 1

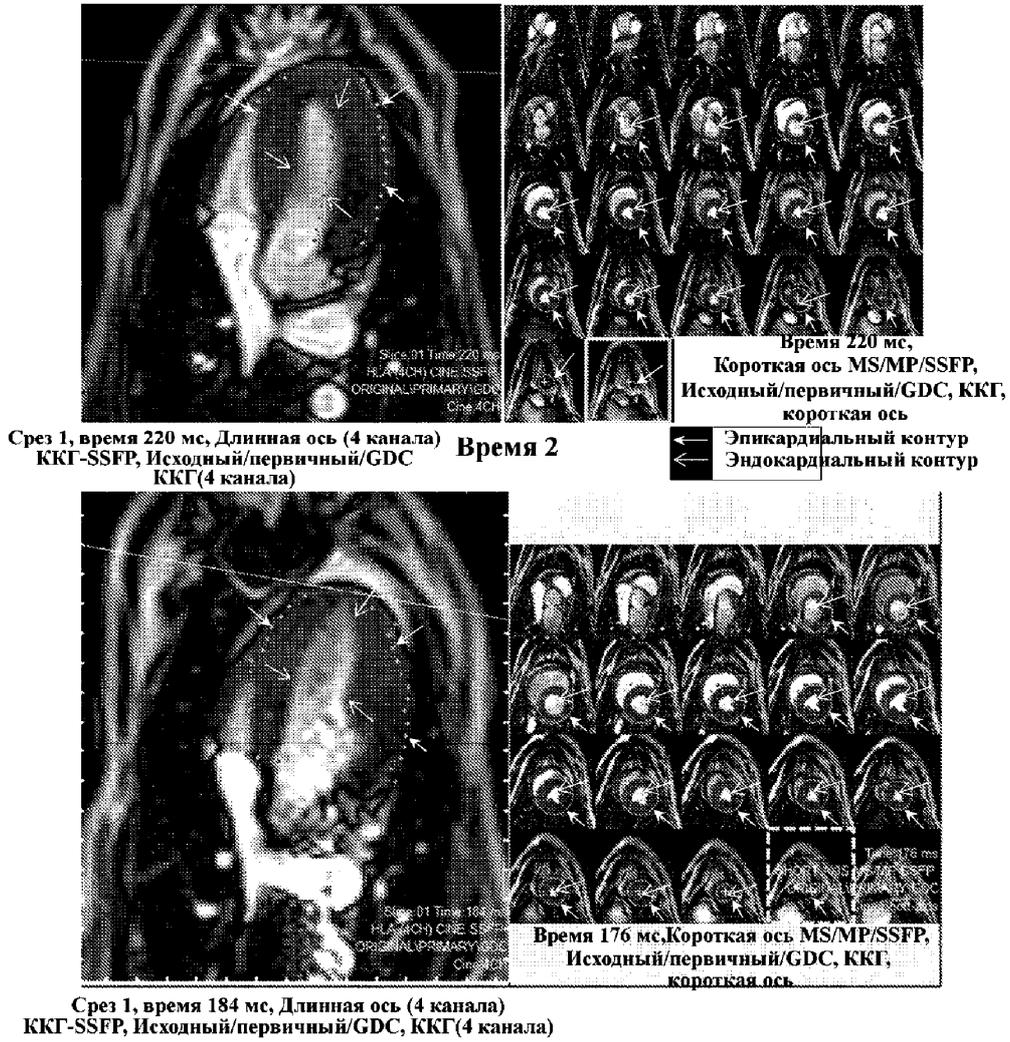


Фиг. 2

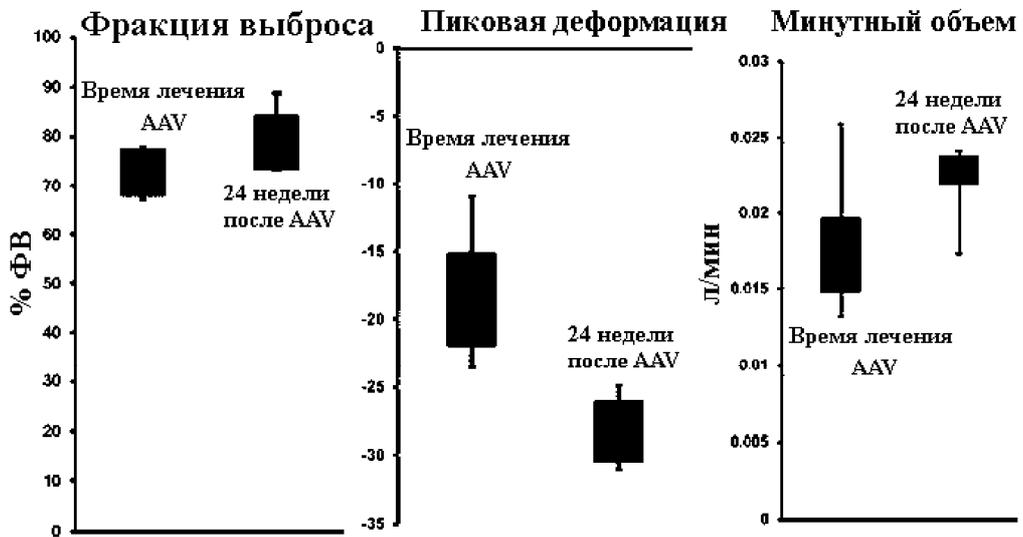
Калвин WnM3

Систола

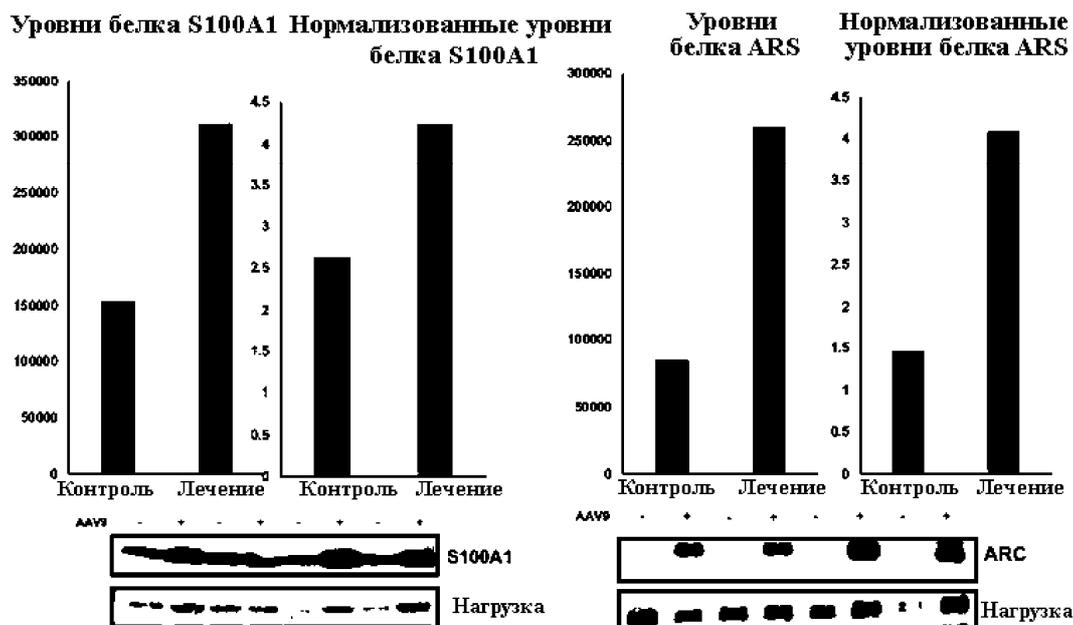
Время 1



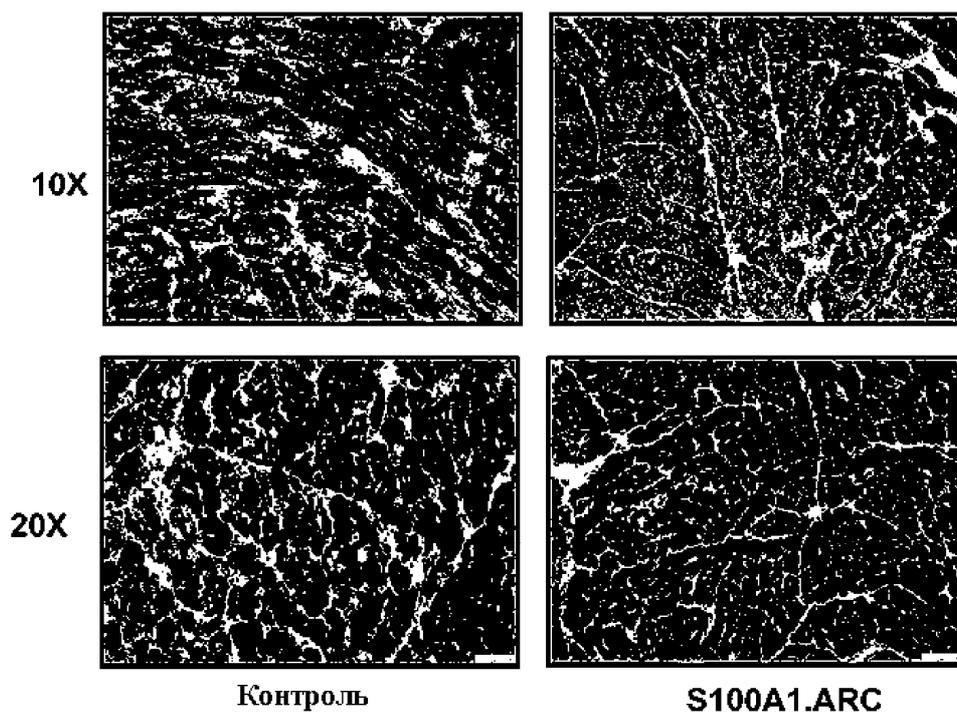
Фиг. 3



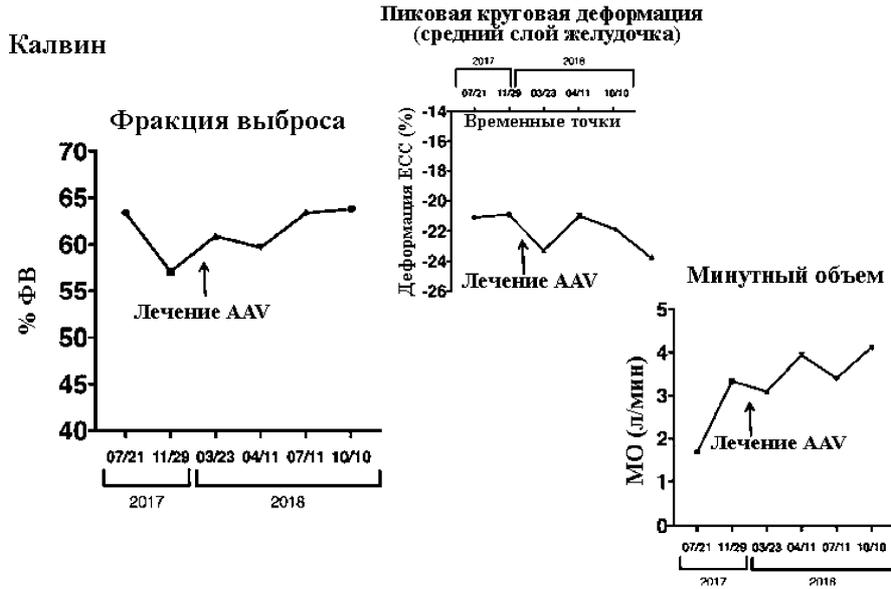
Фиг. 4



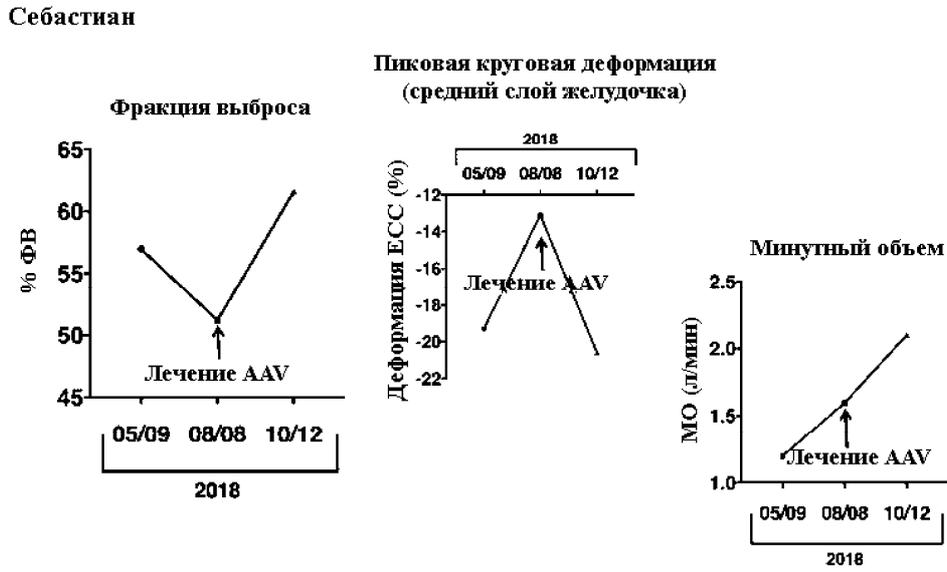
Фиг. 5



Фиг. 6

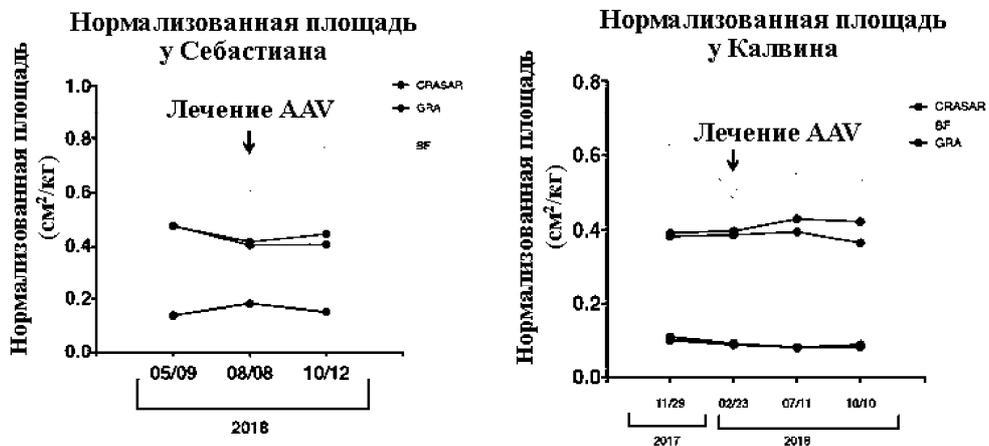


Фиг. 7



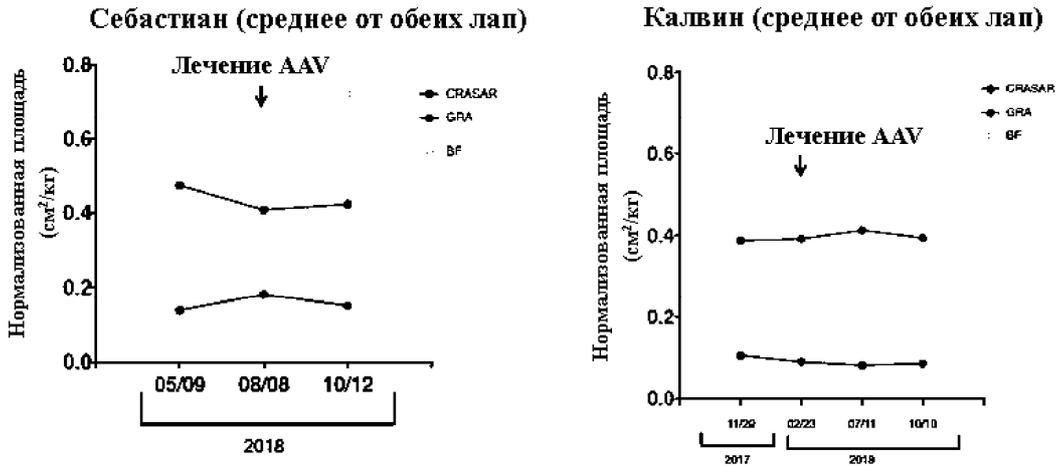
Фиг. 8

**Площадь обеих лап**



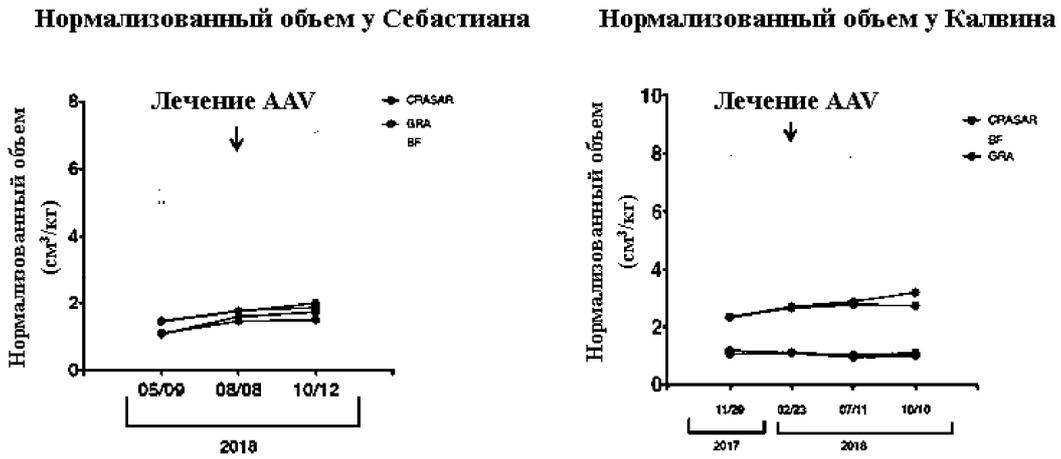
Фиг. 9А

Площадь (макс. поперечное сечение)



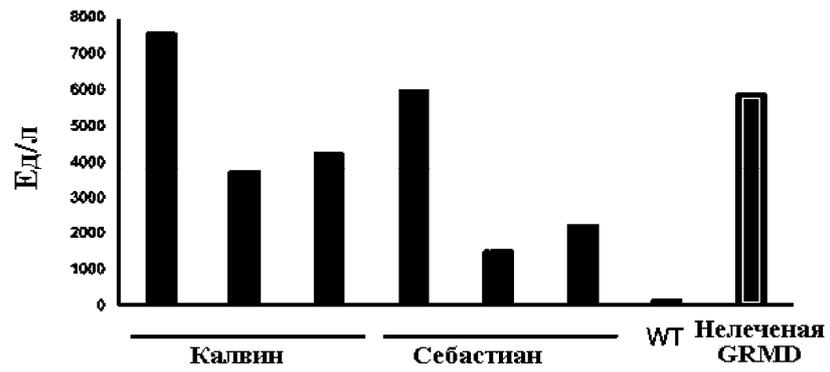
Фиг. 9В

Объем обеих лап

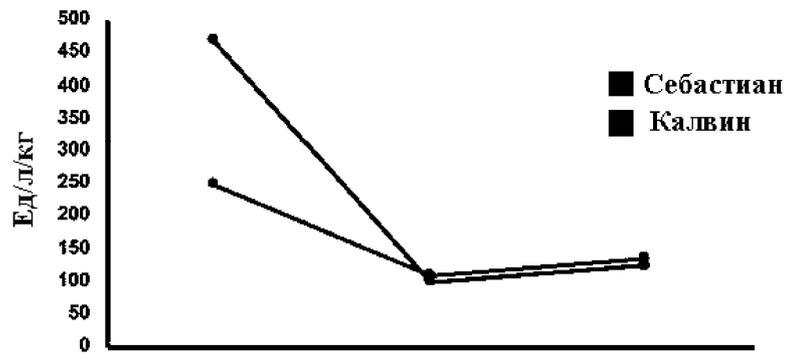


Фиг. 9С

## Активность креатинкиназы

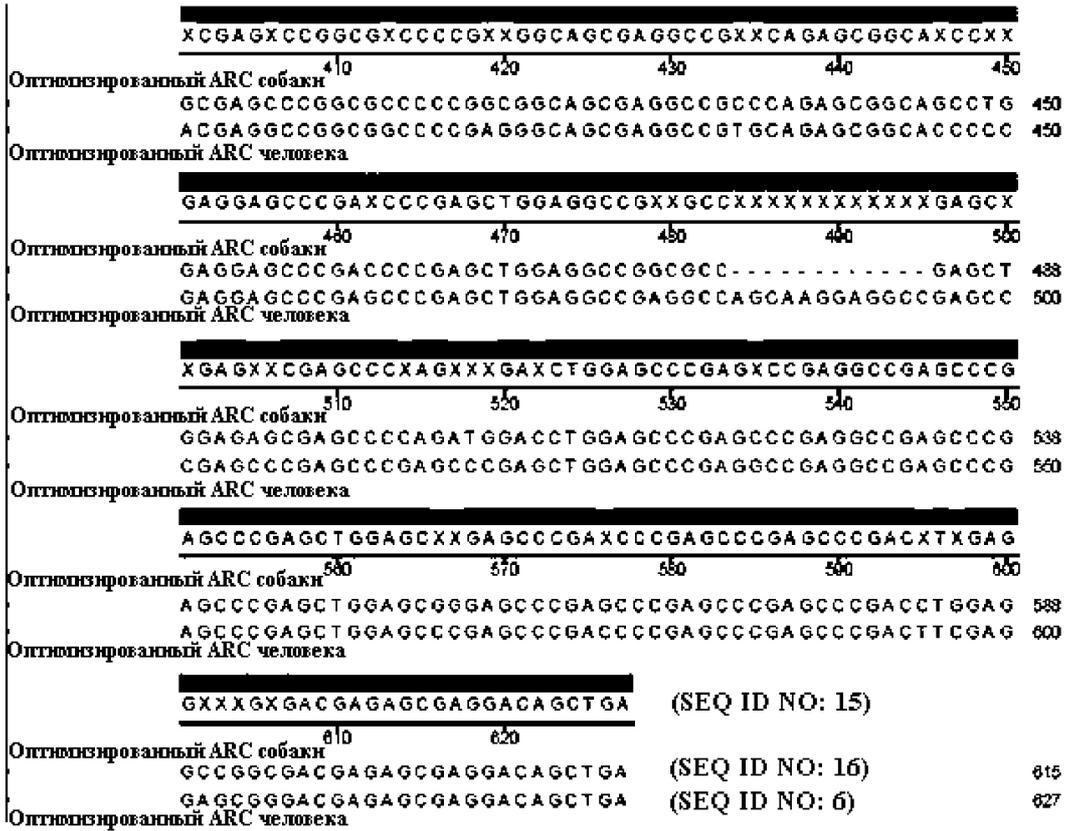


## Активность креатинкиназы, нормализованная по массе тела



Фиг. 10

	ATGGGCAACXCCAGGAGCGGCCAGCGAGACCATCGACCGGGAGCGGAA	
Оптимизированный ARC собаки	10 20 30 40 50	
	ATGGGCAACAGCCAGGAGCGGCCAGCGAGACCATCGACCGGGAGCGGAA	50
Оптимизированный ARC человека	ATGGGCAACGCCAGGAGCGGCCAGCGAGACCATCGACCGGGAGCGGAA	50
	CGGGCTGGTGGAGACCCCTGCAGGCCGACAGCGGCCCTGCTGCTGGACGCC	
Оптимизированный ARC собаки	60 70 80 90 100	
	CGGGCTGGTGGAGACCCCTGCAGGCCGACAGCGGCCCTGCTGCTGGACGCC	100
Оптимизированный ARC человека	CGGGCTGGTGGAGACCCCTGCAGGCCGACAGCGGCCCTGCTGCTGGACGCC	100
	TGCTGGCCCGGGGCGTGTGTXCCGGCCCCGAGTACGAGGCCCTGGACGCC	
Оптимизированный ARC собаки	110 120 130 140 150	
	TGCTGGCCCGGGGCGTGTGTXCCGGCCCCGAGTACGAGGCCCTGGACGCC	150
Оптимизированный ARC человека	TGCTGGCCCGGGGCGTGTGTXCCGGCCCCGAGTACGAGGCCCTGGACGCC	150
	CTGCCCGACGCCGAGCGCGCGGTGCGGCGGCTGCTGCTGCTGGTGCAGXG	
Оптимизированный ARC собаки	160 170 180 190 200	
	CTGCCCGACGCCGAGCGCGCGGTGCGGCGGCTGCTGCTGCTGGTGCAGAG	200
Оптимизированный ARC человека	CTGCCCGACGCCGAGCGCGCGGTGCGGCGGCTGCTGCTGCTGGTGCAGGG	200
	CAAGGGCGAGGCCCGCTGCCAGGAGCTGCTGTXGTGCGCCCAGCGGACCG	
Оптимизированный ARC собаки	210 220 230 240 250	
	CAAGGGCGAGGCCCGCTGCCAGGAGCTGCTGTXGTGCGCCCAGCGGACCG	250
Оптимизированный ARC человека	CAAGGGCGAGGCCCGCTGCCAGGAGCTGCTGTXGTGCGCCCAGCGGACCG	250
	CCXGXGCCCCGACCCCGCTGGGACTGGCAGCACGTTGGGXCCGGCTAC	
Оптимизированный ARC собаки	260 270 280 290 300	
	CCCGGGCCCCGACCCCGCTGGGACTGGCAGCACGTTGGGCACCGGCTAC	300
Оптимизированный ARC человека	CCCGGGCCCCGACCCCGCTGGGACTGGCAGCACGTTGGGCCCGGCTAC	300
	CGGGA XCGGAGCTXXGACXCCXCTGCXCCGGCCACTGGACCCCGAGGC	
Оптимизированный ARC собаки	310 320 330 340 350	
	CGGGA XCGGAGCTGGGACCCCGCTGCXCCGGCCACTGGACCCCGAGGC	350
Оптимизированный ARC человека	CGGGA XCGGAGCTACGACCCCGCTGCXCCGGCCACTGGACCCCGAGGC	350
	CCCCGGCAGCAGCACCACTGCCCGGAGCTGCCCGGGGCCCGCCACTGGC	
Оптимизированный ARC собаки	360 370 380 390 400	
	CCCCGGCAGCAGCACCACTGCCCGGAGCTGCCCGGGGCCCGCCACTGGC	400
Оптимизированный ARC человека	CCCCGGCAGCAGCACCACTGCCCGGAGCTGCCCGGGGCCCGCCACTGGC	400



Фиг. 11

	ATGGGCAACGCXCAGGAGCGGCCXXXGAGACXATCGACCCGCGAGCGGAA	
Нативная ДНК hARC	10 20 30 40 50	
	ATGGGCAACGCXGAGGAGCGGCCGTGAGAGACTATCGACCCGCGAGCGGAA	50
Оптимизированный ARC человека	ATGGGCAACGCCCAGGAGCGGCCCAAGCGAGACCATCGACCCGGGAGCGGAA	50
	XCGXCTGGTXGAGACXCTGCAGGCXGACXXXGGXCTGCTGXTGGACGCXC	
Нативная ДНК hARC	60 70 80 90 100	
	ACGCCTGGTGAAGACGCTGCAGGCAGACTCGGGACTGCTGTGGACGCGC	100
Оптимизированный ARC человека	GCGCCTGGTGAAGACCTGCAGGCAGACAGCGGCCTGCTGCTGGACGCC	100
	TGCTGGCXCGGGCGTGTCTXACCGGXCCXGAGTACGAGGCXXTGGAXGCX	
Нативная ДНК hARC	110 120 130 140 150	
	TGCTGGCGCGGGCGTGTCTCACCGGCCAGAGTACGAGGCATTGGATGCA	150
Оптимизированный ARC человека	TGCTGGCCCGGGCGTGTCTGACCGGCCCGAGTACGAGGCCTGGACGCC	150
	CTGCCXGAXGCCGAGCGXGGGTGCGXCGXCTXCTGCTGCTGGTGCAGGG	
Нативная ДНК hARC	160 170 180 190 200	
	CTGCCTGATGCCGAGCGCAGGGTGCGCCGCTACTGCTGCTGGTGCAGGG	200
Оптимизированный ARC человека	CTGCCCGACGCCGAGCGCGGGTGCGGCGGCTGCTGCTGCTGGTGCAGGG	200
	CAAAGGGCGAGGCCGCGCTGCCAGGAGCTGCTXCGXTGXGCCCAAGCGXACCG	
Нативная ДНК hARC	210 220 230 240 250	
	CAAAGGGCGAGGCCGCGCTGCCAGGAGCTGCTACGCTGTGCCCAGCGTACCG	250
Оптимизированный ARC человека	CAAAGGGCGAGGCCGCGCTGCCAGGAGCTGCTGCGGTGCGCCCAGCGGACCG	250
	CXGGCGXCXCGACCCCGCXTGGGACTGGCAGCACGTGGGXCCXGGCTAC	
Нативная ДНК hARC	260 270 280 290 300	
	CGGGCGCGCCGGACCCCGCTTGGGACTGGCAGCACGTGGGTCCGGGCTAC	300
Оптимизированный ARC человека	CGGGCGCCCCGACCCCGCCTGGGACTGGCAGCACGTGGGCCCGGGCTAC	300
	CGGGACCGXAGCTAXGACCCXCCXTGCCCXGGCCACTGGACXCCXGAGGC	
Нативная ДНК hARC	310 320 330 340 350	
	CGGGACCGCAGCTATGACCCCTCCATGCCCAGGCCACTGGACGCCGGAGGC	350
Оптимизированный ARC человека	CGGGACCGGAGCTACGACCCCCCTGCCCCGGCCACTGGACCCCGGAGGC	350
	XCCCGGCXXXGGXACCCACXTGCCCCGGXGTGCCCXGXGCXXXGACCCXG	
Нативная ДНК hARC	360 370 380 390 400	
	ACCCGGCTCGGGGACCCACATGCCCCGGGTGCCCAGAGCTTCAGACCCCTG	400
Оптимизированный ARC человека	CCCCGGCAGCGCCACCCACCTGCCCCGGCCTGCCCGGGGCCAGCGACCCCG	400

	<b>ACGAGGCCGGXGGCCSXGAGGGCCXXCGAGGCCXGTGCAXXXCGGXACCCSX</b>	
	410 420 430 440 450	
Нативная ДНК hARC	ACGAGGCCGGGGCCCTGAGGGCTCCGAGGCCGTTGCAATCCGGGACCCCG	450
Оптимизированный ARC человека	ACGAGGCCGGCGCCCCGAGGGCAGCGAGGCCGTGCAAGAGCGGCACCCCG	450
	<b>GAGGAGCCXGAGCCXGAGCTGGAXGCXGAGGCCXXAAXGAGGCCXGAXCC</b>	
	460 470 480 490 500	
Нативная ДНК hARC	GAGGAGCCAGAGCCAGAGCTGGAAAGCTGAGGCCCTCTAAAGAGGCTGAACC	500
Оптимизированный ARC человека	GAGGAGCCGAGCCGAGCTGGAGGCCGAGGCCAGCAAGGAGGCCGAGCC	500
	<b>XGAGCCXGAGCCXGAGCCXGAGCTGGAXCCCGAGGCCXGAXGCXGAXCCXG</b>	
	510 520 530 540 550	
Нативная ДНК hARC	GGAGCCGGAGCCAGAGCCAGAGCTGGAACCCGAGGCTGAAGCAGAACCCAG	550
Оптимизированный ARC человека	CGAGCCGAGCCGAGCCGAGCTGGAACCCGAGGCCGAGGCCGAGCCCG	550
	<b>AGCCXGAXCTGGAGCCXGAXCCXGAGCCXGAGCCCGAGCCCGACTTCGAG</b>	
	560 570 580 590 600	
Нативная ДНК hARC	AGCCGGAACCTGGAGCCAGAACCCGAGCCAGAGCCCGAGCCCGACTTCGAG	600
Оптимизированный ARC человека	AGCCGAGCTGGAGCCGAGCCCGAGCCCGAGCCCGAGCCCGACTTCGAG	600
	<b>GAXXGGACGAGXCGAXGAXXXCTGA</b> (SEQ ID NO: 17)	
	610 620	
Нативная ДНК hARC	GAAAGGGACGAGTCCGAAGATTCTGA (SEQ ID NO: 18)	627
Оптимизированный ARC человека	GAGCGGACGAGAGCGAGGACAGCTGA (SEQ ID NO: 6)	627

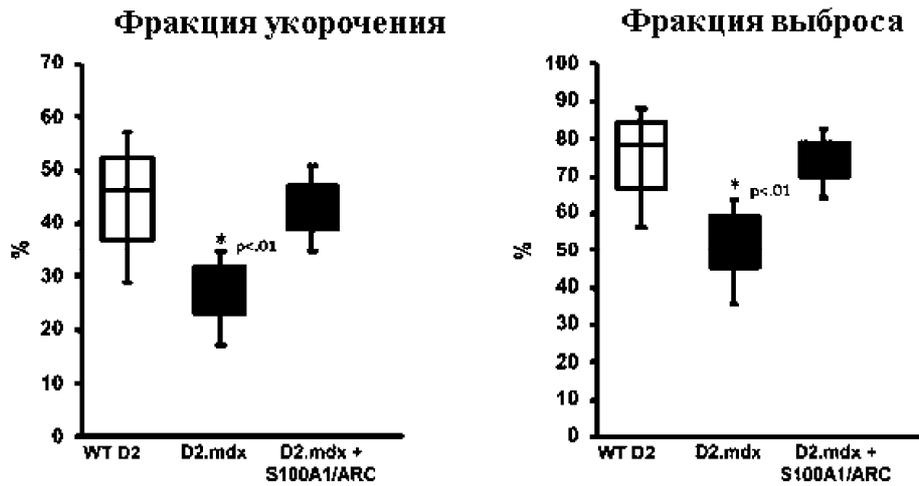
Фиг. 12

	ATGGGCXXXGAGCTGGAGACXGCXATGGAGACCCTXATCA	
Нативная ДНК hS100A1	10 20 30 40	
	ATGGGCTCTGAGCTGGAGACGGCGATGGAGACCCTCATCA	40
Оптимизированный hS100A1	ATGGGCAGCGAGCTGGAGACCGCCATGGAGACCCTGATCA	40
	ACGTGTTCCACGCCACXXXGGCAAXGAGGGXGACAAGTA	
Нативная ДНК hS100A1	50 60 70 80	
	ACGTGTTCCACGCCCACTCGGGCAAAGAGGGGGACAAGTA	80
Оптимизированный hS100A1	ACGTGTTCCACGCCACAGCGGCAAGGAGGGCGACAAGTA	80
	CAAGCTGAGCAAGAAGGAGCTGAAXGAGCTGCTGCAGACX	
Нативная ДНК hS100A1	90 100 110 120	
	CAAGCTGAGCAAGAAGGAGCTGAAAGAGCTGCTGCAGACG	120
Оптимизированный hS100A1	CAAGCTGAGCAAGAAGGAGCTGAAGGAGCTGCTGCAGACC	120
	GAGCTXXXXGGCTTCTGGAXGCCCAAGAAGGAXGTGGAXG	
Нативная ДНК hS100A1	130 140 150 160	
	GAGCTCTCTGGCTTCTGGATGCCCAAGAAGGATGTGGATG	160
Оптимизированный hS100A1	GAGCTGAGCGGCTTCTGGACGCCCAAGAAGGACGTGGACG	160
	CXGTGGACAAGGTGATGAAGGAGCTXGACGAGAAXGGXGA	
Нативная ДНК hS100A1	170 180 190 200	
	CTGTGGACAAGGTGATGAAGGAGCTAGACGAGAATGGAGA	200
Оптимизированный hS100A1	CCGTGGACAAGGTGATGAAGGAGCTGGACGAGAACGGCGA	200
	CGGXGAGGTGGACTTCCAGGAGTAXGTGGTGGCTXGTGGCX	
Нативная ДНК hS100A1	210 220 230 240	
	CGGGGAGGTGGACTTCCAGGAGTATGTGGTGGCTTGTGGCT	240
Оптимизированный hS100A1	CGGCGAGGTGGACTTCCAGGAGTACGTGGTGGCTGGTGGCC	240
	GCXCTXACXGTGGCCTGXAACAAXTTCTTCTGGGAGAACA	
Нативная ДНК hS100A1	250 260 270 280	
	GCTCTCAGAGTGGCCTGTAACAATTTCTTCTGGGAGAACA	280
Оптимизированный hS100A1	GCCCTGAGCCTGGCCTGGAACAACCTTCTTCTGGGAGAACA	280
	GXTGA	(SEQ ID NO: 19)
Нативная ДНК hS100A1	GTTGA	(SEQ ID NO: 5) 285
Оптимизированный hS100A1	GCTGA	(SEQ ID NO: 8) 285

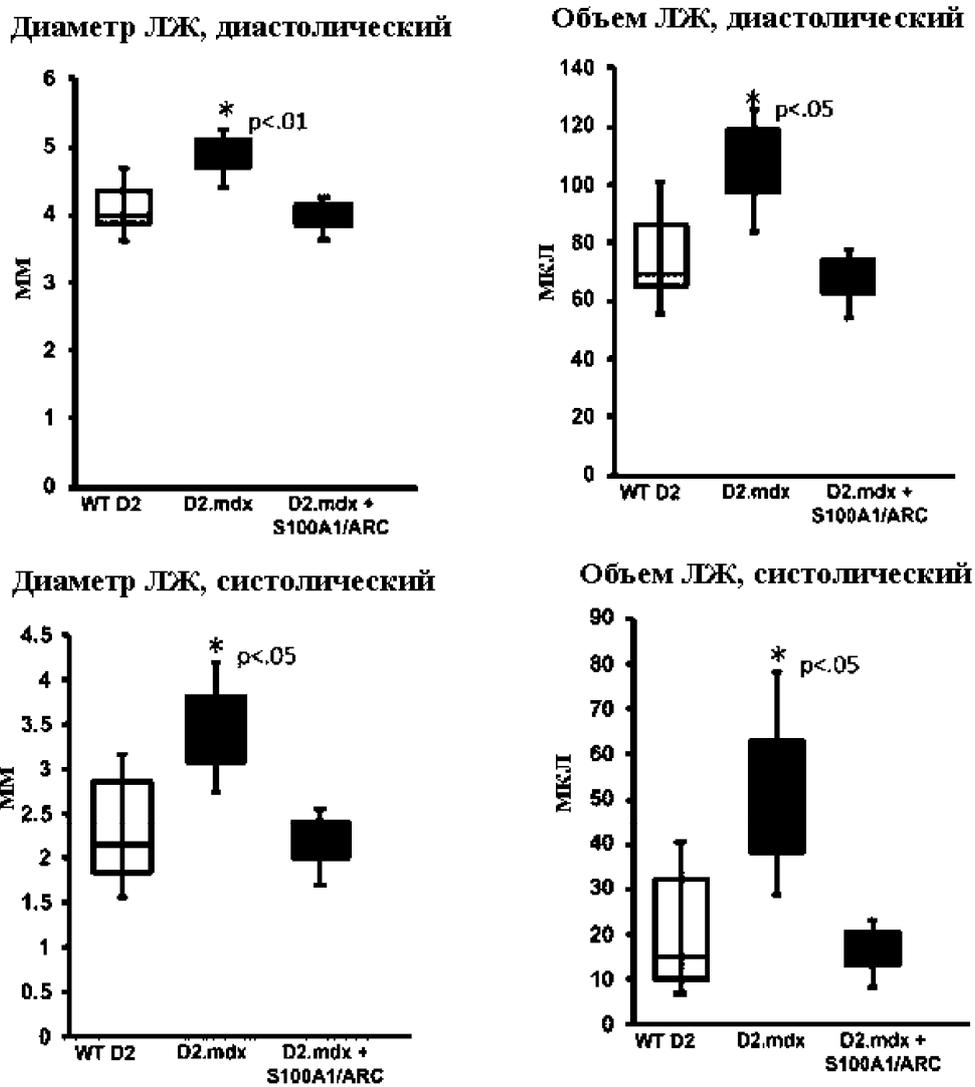
Фиг. 13

	ATGGGCAGCGAGCTGGAGACCGCCATGGAGACCCCTGATCA	
	10 20 30 40	
Оптимизированный hS100A1	ATGGGCAGCGAGCTGGAGACCGCCATGGAGACCCCTGATCA	40
Оптимизированный cS100A1	ATGGGCAGCGAGCTGGAGACCGCCATGGAGACCCCTGATCA	40
	ACGTGTTCCACGCCACAGCGGCCAAGGAGGGCGACAAGTA	
	50 60 70 80	
Оптимизированный hS100A1	ACGTGTTCCACGCCACAGCGGCCAAGGAGGGCGACAAGTA	80
Оптимизированный cS100A1	ACGTGTTCCACGCCACAGCGGCCAAGGAGGGCGACAAGTA	80
	CAAGCTGAGCAAGAAGGAGCTGAAGGAGCTGCTGCAGACC	
	90 100 110 120	
Оптимизированный hS100A1	CAAGCTGAGCAAGAAGGAGCTGAAGGAGCTGCTGCAGACC	120
Оптимизированный cS100A1	CAAGCTGAGCAAGAAGGAGCTGAAGGAGCTGCTGCAGACC	120
	GAGCTGAGCGGCTTCTGGACGCCCAGAAAGGACGXXGACG	
	130 140 150 160	
Оптимизированный hS100A1	GAGCTGAGCGGCTTCTGGACGCCCAGAAAGGACGTTGGACG	160
Оптимизированный cS100A1	GAGCTGAGCGGCTTCTGGACGCCCAGAAAGGACGCGCAGC	160
	CCGTGGACAAGGTGATGAAGGAGCTGGACGAGAACGGCGA	
	170 180 190 200	
Оптимизированный hS100A1	CCGTGGACAAGGTGATGAAGGAGCTGGACGAGAACGGCGA	200
Оптимизированный cS100A1	CCGTGGACAAGGTGATGAAGGAGCTGGACGAGAACGGCGA	200
	CGGCGAGGTGGACTTCCAGGAGTACGTGGTGGTGGCC	
	210 220 230 240	
Оптимизированный hS100A1	CGGCGAGGTGGACTTCCAGGAGTACGTGGTGGTGGCC	240
Оптимизированный cS100A1	CGGCGAGGTGGACTTCCAGGAGTACGTGGTGGTGGCC	240
	GCCCTGACCGTGGCCTGCAACAACCTTCTTCTGGGAGAACA	
	250 260 270 280	
Оптимизированный hS100A1	GCCCTGACCGTGGCCTGCAACAACCTTCTTCTGGGAGAACA	280
Оптимизированный cS100A1	GCCCTGACCGTGGCCTGCAACAACCTTCTTCTGGGAGAACA	280
	GCTGA	(SEQ ID NO: 20)
Оптимизированный hS100A1	GCTGA	(SEQ ID NO: 8) 285
Оптимизированный cS100A1	GCTGA	(SEQ ID NO: 21) 285

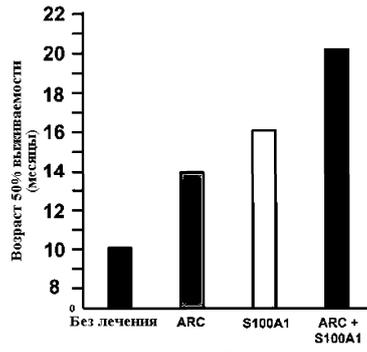
Фиг. 14



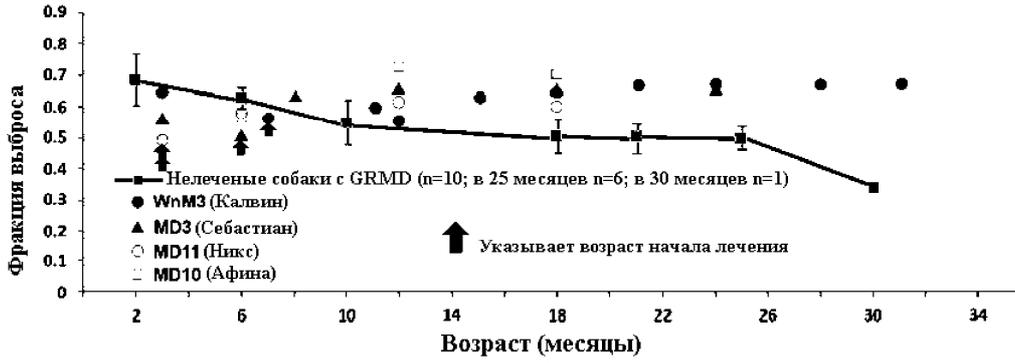
Фиг. 15



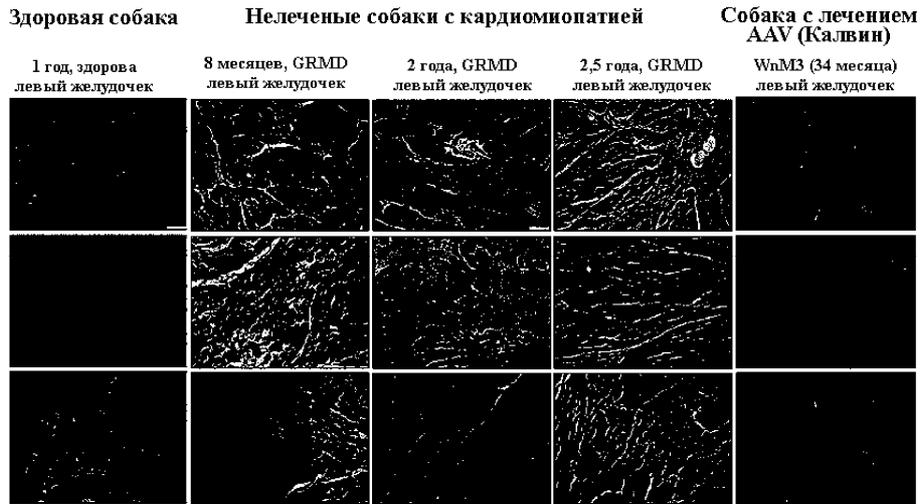
Фиг. 16



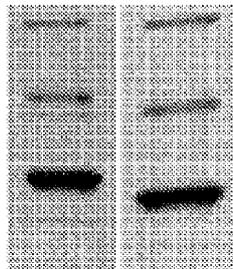
Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20