(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202292634 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.01.31

(22) Дата подачи заявки
2017.04.14

(51) Int. Cl. ***A61K 48/00*** (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(54) ДОСТАВКА МИКРОДИСТРОФИНА ВЕКТОРОМ НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ

(31) **62/323,163; 62/473,253**
(32) **2016.04.15; 2017.03.17**
(33) **US**
(62) **201892338; 2017.04.14**

(71) Заявитель:
РИСЕРЧ ИНСТИТЬЮТ ЭТ НЭШНУАЙД ЧИЛДРЕН'С ХОСПИТАЛ (US)

(72) Изобретатель:
Родино-Клапак Луиза, Менделл Джерри Р. (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Согласно данному изобретению предложены рекомбинантные AAV-векторы, содержащие миниатюризированный ген микродистрофина человека, и способы применения указанных рекомбинантных векторов для уменьшения или предотвращения фиброза у субъектов, страдающих от мышечной дистрофии.

202292634 A1

202292634 A1

ДОСТАВКА МИКРОДИСТРОФИНА ВЕКТОРОМ НА ОСНОВЕ АДЕНО-АССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ

[0001] Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке США № 62/323163, поданной 15 апреля 2016 года, и предварительной заявке США № 62/473253, поданной 17 марта 2017 года, которые обе включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Согласно изобретению предложены геннотерапевтические векторы, такие как векторы на основе адено-ассоциированного вируса (AAV), экспрессирующие миниатюризованный ген микродистрофина человека, и способы применения этих векторов для уменьшения и предотвращения фиброза у субъектов, страдающих от мышечной дистрофии. Согласно изобретению также предложены комбинированные способы генной терапии для защиты мышечных волокон от травм, увеличения мышечной силы.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Важность мышечной массы и силы в повседневной физической деятельности, такой как перемещение и дыхание, а также для метаболизма всего тела, неоспорима. Нарушение мышечной функции вызывает мышечные дистрофии (МД), которые характеризуются слабостью мышц и истощением, и оказывают серьезное влияние на качество жизни. Наиболее хорошо охарактеризованные МД являются результатом мутаций в генах, кодирующих члены дистрофин-ассоциированного белкового комплекса (ДАБК). Эти МД являются результатом слабой прочности мембраны, связанной с потерей сарколеммно-цитоскелетного прикрепления ДАБК. Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) является одним из самых губительных мышечных заболеваний, поражающих 1 из 5000 новорожденных особей мужского пола.

[0004] Данная заявка включает в себя два трансляционных подхода к разработке лечения МДД. При МДД фиброзная инфильтрация глубока и является серьезным препятствием для любой потенциальной терапии. Также важно учитывать то, что сама по себе замена генов затруднена тяжестью фиброза, уже

присутствующего у очень маленьких детей с МДД. Фактически, биопсии мышц в типичном возрасте постановки диагноза, между 4-5 годами, показывают очень значительные уровни фиброза.

[0005] МДД вызван мутациями в гене МДД, приводящими к уменьшению количества мРНК и отсутствию дистрофина, т.е. сарколеммного белка 427 кД, связанного с дистрофин-ассоциированным белковым комплексом (ДАБК) (Hoffman et al., Cell 51(6):919-28, 1987). ДАБК состоит из нескольких белков в мышечной сарколемме, которые образуют структурную связь между внеклеточной матрицей (ВКМ) и цитоскелетом через дистрофин, актин-связывающий белок, и альфа-дистрогликан, ламин-связывающий белок. Функция этих структурных звеньев состоит в стабилизации мембран мышечных клеток во время сокращения и в защите от повреждения, вызванного сокращением. При потере дистрофина, хрупкость мембраны приводит к разрывам сарколлемы и притоку кальция, запускающему активирующиеся кальцием протеазы и сегментный некроз волокон (Straub et al., Curr Opin. Neurol. 10(2): 168-75, 1997). Этот неконтролируемый цикл разрушения и восстановления мышц в конечном счете исчерпывает популяцию мышечных стволовых клеток (Sacco et al., Cell, 2010. 143(7): p. 1059-71; Wallace et al., Annu Rev Physiol, 2009. 71: p. 37-57), что приводит к прогрессирующей мышечной слабости, эндомизиальному воспалению и фиброзному рубцеванию.

[0006] Без стабилизации мембраны дистрофином или микродистрофином МДД будет проявляться в виде неконтролируемых циклов повреждения и восстановления тканей, и в конечном итоге заменит утраченные мышечные волокна фиброзной рубцовой тканью путем пролиферации соединительной ткани. Фиброз характеризуется чрезмерными отложениями белков матрицы ВКМ, включающие в себя коллаген и эластин. Белки ВКМ в основном подуцируются цитокинами, такими как TGFβ, который высвобождается активированными фибробластами, реагирующими на стресс и воспаление. Хотя первичным патологическим признаком МДД является разрушение и некроз мышечных волокон, фиброз как патологическое следствие имеет такое же влияние. Чрезмерное продуцирование

фиброзной ткани ограничивает восстановление мышц и способствует прогрессирующей мышечной слабости у пациента с МДД. В одном исследовании наличие фиброза в начальных мышечных биопсиях с МДД сильно коррелировало с плохим для двигательной системы исходом при 10-летнем наблюдении (Desguerre et al., J Neuropathol Exp Neurol, 2009. **68**(7): p. 762-7). Эти результаты указывают на фиброз как основной фактор появления мышечной дисфункции при ДМД, и подчеркивают необходимость разработки методов лечения, уменьшающие количество фиброзной ткани. Большинство анти-фиброзных терапий, которые были протестированы на мышах с мышечной дистрофией, сцепленной с Х-хромосомой (mdx), действуют путем блокирования сигнализации фиброзных цитокинов через ингибирование пути TGFβ. МикроРНК (миРНК) представляют собой одноцепочечные РНК из примерно 22 нуклеотидов, которые опосредуют подавление экспрессии генов на пост-транскрипционном уровне путем образования пар с основаниями в пределах 3'-UTR мРНК, ингибируя трансляцию или способствуя разрушению мРНК. Ключевая (seed) последовательность из 7 п. н. на 5'-конце миРНК нацелена на миРНК; дополнительное распознавание обеспечивается остальной частью последовательности-мишени, а также ее вторичной структурой. МиРНК играют важную роль в патологии мышечных заболеваний и имеют профили экспрессии, которые однозначно зависят от конкретного типа мышечной дистрофии (Eisenberg et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(43): p. 17016-21). Все больше доказательств свидетельствует о том, что миРНК вовлечены в фиброзный процесс во многих органах, включая сердце, печень, почки и легкие (Jiang et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(43): p. 17016-21). Недавно было показано, что снижение экспрессии miR-29 способствует сердечному фиброзу (Cacchiarelli et al., Cell Metab, 2010. **12**(4): p. 341-51), и сниженная экспрессия miR-29 была генетически связана с мышцами пациентов-людей с DMD (Eisenberg et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(43): p. 17016-2). Семейство miR-29 состоит из трех членов семьи, экспрессированных из двух бицистронных кластеров миРНК. MiR-29a ко-экспрессируется с miR-29b (miR-29b-1); miR-29c ко-

экспрессируется с второй копией miR-29b (miR-29b-2). Семейство miR-29 имеет общую консервативную ключевую последовательность, а miR-29a и miR-29b отличаются только одной основой от miR-29c. Кроме того, электропорация плазмиды miR-29 (кластер miR-29a и miR-29b-1) в мышцу мыши mdx уменьшала уровни экспрессии компонентов ВКМ, коллагена и эластина, и сильно уменьшала отложение коллагена в срезах мышц в течение 25 дней после обработки (Cacchiarelli et al., Cell Metab, 2010. **12**(4): p. 341-51).

[0007] Адено-ассоциированный вирус (AAV) является парвовирусом с дефектной репликацией, чей одноцепочечный ДНК-геном имеет длину около 4,7 т.п.н., включая 145 нуклеотидные инвертированные концевые повторы (ITR). Существует несколько серотипов AAV. Нуклеотидные последовательности геномов серотипов AAV известны. Например, нуклеотидная последовательность генома AAV серотипа 2 (AAV2) представлена в Srivastava *et al., J Virol, 45*: 555-564 (1983), и в скорректированном виде в Ruffing *et al., J Gen Virol, 75*: 3385-3392 (1994). В качестве других примеров полный геном AAV-1 представлен под номером доступа ГенБанка NC_002077; полный геном AAV-3 представлен под номером доступа ГенБанка NC_1829; полный геном AAV-4 представлен под номером доступа ГенБанка NC_001829; геном AAV-5 представлен под номером доступа ГенБанка AF085716; полный геном AAV-6 представлен под номером доступа ГенБанка NC_00 1862; по меньшей мере части геномов AAV-7 и AAV-8 представлены под номерами доступа ГенБанка AX753246 и AX753249 соответственно (см. также патенты США № 7282199 и № 7790449, относящиеся к AAV-8); геном AAV-9 предоставлен в Gao *et al., J. Virol., 78*: 6381-6388 (2004); геном AAV-10 предоставлен в *Mol. Ther., 13*(1): 67-76 (2006); и геном AAV-11 предоставлен в *Virology, 330*(2): 375-383 (2004). Серотип AAVrh74 описан в Rodino-Klapac *et al. J. Trans. Med.* 5: 45 (2007). *Цис*-функционирующие последовательности, управляющие репликацией вирусной ДНК (rep), капсидированием/упаковкой, и интеграцией в хромосому клетки-хозяина, содержатся в ITR. Три промотора AAV (обозначенные p5, p19 и p40 по их относительному расположению на геномной карте) управляют экспрессией двух

внутренних открытых рамок считывания AAV, кодирующих гены rep и cap. Два промотора rep (p5 и p19) в сочетании с дифференциальным сплайсингом одного интрона AAV (например, по нуклеотидах 2107 и 2227 AAV2) приводят к продуцированию четырех белков rep (rep 78, rep 68, rep 52 и rep 40) из гена rep. Белки Rep обладают несколькими ферментными свойствами, которые в конечном счете отвечают за репликацию вирусного генома. Ген cap экспрессируется из промотора p40 и кодирует три капсидных белка VP1, VP2 и VP3. Альтернативный сплайсинг и неконсенсусные сайты трансляции ответственны за продуцирование трех родственных капсидных белков. Единственный консенсусный сайт полиаденилирования находится в позиции 95 карты генома AAV. Жизненный цикл и генетика AAV рассмотрены в Muzyczka, *Current Topics in Microbiology and Immunology, 158*: 97-129 (1992).

[0008] AAV обладает уникальными особенностями, которые делают его привлекательным в качестве вектора доставки чужеродной ДНК в клетки, например, при генной терапии. Инфицирование клеток AAV в культуре является нецитопатическим, а естественное инфицирование людей и других животных является скрытым и бессимптомным. Кроме того, AAV инфицирует многие клетки млекопитающих, что позволяет применять различные типы тканей *in vivo*. Кроме того, AAV трансдуцирует медленно делящиеся и не делящиеся клетки, и может по существу сохраняться в виде транскрипционно активной ядерной эписомы (внехромосомный элемент) в течение жизни данных клеток. Провирусный геном AAV остается инфекционным при клонировании ДНК в плазмиды, что делает возможным создание рекомбинантных геномов. Кроме того, поскольку сигналы, управляющие репликацией AAV, капсидированием генома и интеграцией, содержатся в ITR генома AAV, возможна замена некоторого или всего содержимого примерно 4,3 т.п.н. генома (кодирующее белки репликации и структурные капсидные белки, rep-cap) на чужеродную ДНК, такую как генная кассета, содержащая промотор, нужную ДНК и сигнал полиаденилирования. Белки rep и cap могут быть предоставлены *in trans*. Еще одна важная особенность AAV заключается в том, что он является чрезвычайно стабильным и крепким вирусом. Он легко выдерживает

условия, применяемые для инактивации аденовируса (от 56°C до 65°C в течение нескольких часов), делая холодильное хранение AAV менее сложным. AAV даже может быть лиофилизирован. Наконец, AAV-инфицированные клетки не устойчивы к суперинфекции.

[0009] Многочисленные исследования продемонстрировали долгосрочную (больше, чем полтора года) опосредованную рекомбинантным AAV экспрессию белка в мышцах. См., Clark *et al.*, *Hum Gene Ther, 8*: 659-669 (1997); Kessler *et al.*, *Proc Nat. Acad Sc. USA, 93*: 14082-14087 (1996); and Xiao *et al.*, *J Virol, 70*: 8098-8108 (1996). См. также, Chao *et al.*, *Mol Ther, 2*:619-623 (2000) and Chao *et al.*, *Mol Ther, 4*:217-222 (2001). Более того, поскольку мышца сильно васкуляризирована, трансдукция рекомбинантным AAV приводит к появлению трансгенных продуктов в кровеносной системе после внутримышечной инъекции, как описано в Herzog *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA, 94*: 5804-5809 (1997) и Murphy *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA, 94*: 13921-13926 (1997). Кроме того, Lewis *et al.*, *J Virol, 76*: 8769-8775 (2002) продемонстрировали, что волокна скелетных мышц обладают необходимыми клеточными факторами для правильного гликозилирования, свертывания и секреции антител, что указывает на то, что мышца способна к устойчивой экспрессии секретируемых белковых терапевтических агентов.

[0010] Функциональное улучшение у пациентов, страдающих от МДД и других мышечных дистрофий, требует как восстановления генов, так и уменьшения фиброза. Существует необходимость в способах уменьшения фиброза, которые могут быть объединены со способами восстановления генов для более эффективного лечения МДД и других мышечных дистрофий. Молекула miR29 является потенциальным регулятором гена и идеальным кандидатом для снижения мышечного фиброза.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0011] Данное изобретение относится к способам генной терапии, которые непосредственно уменьшают три основных компонента соединительной ткани (коллаген 1, коллаген 3 и фибронектин) путем доставки микроРНК miR29. В данной системе

miR29 связывается с 3'-UTR гена коллагена и фибронектина для того, чтобы снизить экспрессию. Изобретение относится к геннотерапевтическим векторам, например на основе AAV, экспрессирующим направляющую цепь микроРНК miR29, и способу доставки miR29 в мышцу для уменьшения и/или предотвращения фиброза.

[0012] Кроме того, согласно данному изобретению предложены комбинированные терапии, и подходы к восстановлению и предотвращению фиброза с использованием геннотерапевтических векторов, доставляющих miR-29 для подавления фиброза, наряду с микродистрофином для устранения дефекта гена, наблюдаемого при МДД. Как показано в Примерах 5-7, комбинированное лечение приводит к большему снижению фиброза, увеличению размера мышц и увеличению мышечной силы.

[0013] В одном варианте осуществления, согласно изобретению предложен rAAV-вектор, экспрессирующий miR-29. Например, rAAV-вектор содержит полинуклеотидную последовательность, экспрессирующую miR29c, такую как нуклеотидная последовательность, содержащая направляющую цепь-мишень miR-29c SEQ ID NO: 3, направляющую цепь miR-29c SEQ ID NO: 4, и природный каркас и петлю-на-стебле miR-30 (SEQ ID NO: 5). Иллюстративная полинуклеотидная последовательность, содержащая кДНК miR-29c в каркасе miR-30, представлена в виде SEQ ID NO: 2 (Рис. 1).

[0014] Иллюстративный rAAV согласно данному изобретению представляет собой pAAV.ЦМВ.Mir29C, который содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1; причем промотор ЦМВ охватывает нуклеотиды 120-526, интрон EF1a охватывает нуклеотиды 927-1087 и нуклеотиды 1380-1854, направляющая цепь miR-29c охватывает нуклеотиды 1257-1284, и shRNA-miR29-c с первичной ключевой последовательностью охватывает нуклеотиды 1088-1375, а последовательность поли-A охватывает нуклеотиды 1896-2091. В одном аспекте изобретения, rAAV-векторы согласно данному изобретению представляют собой AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAVrh.74, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 или AAV13.

[0015] Другой иллюстративный rAAV согласно данному

изобретению представляет собой pAAV.MHC.Mir29C, который содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12; причем энхансер МКК охватывает нуклеотиды 190-395, промотор МНС охватывает нуклеотиды 396-753, интрон EF1a охватывает нуклеотиды 1155-1315 и нуклеотиды 1609-2083, направляющая цепь miR-29c охватывает нуклеотиды 1487-1512, и shRNA-miR29-c с первичной ключевой последовательностью охватывает нуклеотиды 1316-1608, а последовательность поли-А охватывает нуклеотиды 2094-2146. В одном аспекте, rAAV-векторы согласно данному изобретению представляют собой AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAVrh.74, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 или AAV13.

[0016] В другом аспекте изобретения, rAAV-векторы согласно данному изобретению могут быть функционально связаны с регуляторным элементом, специфичным для мышц. Например, регуляторный элемент, специфичный для мышц, представляет собой человеческий элемент гена актина скелетных мышц, элемент гена актина сердца, миоцит-специфичный связывающий энхансер фактор MEF, мышечную креатинкиназу (МКК), tМКК (усеченную МКК), тяжелую цепь миозина (МНС), С5-12 (синтетический промотор), энхансерный элемент мышиной креатинкиназы, элемент гена тропонина С быстро сокращающихся волокон скелетных мышц, элемент гена тропонина С медленно сокращающихся мышечных волокон сердца, элемент гена тропонина I медленно сокращающихся мышечных волокон, индуцируемые гипоксией ядерные факторы, стероид-индуцируемый элемент или глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE).

[0017] Например, любой из rAAV-векторов согласно данному изобретению функционально связан с регуляторным элементом, специфичным для мышц, содержащим нуклеотидную последовательность энхансера МКК SEQ ID NO: 10 и/или промоторную последовательность МКК SEQ ID NO: 11.

[0018] Согласно данному изобретению также предложены фармацевтические композиции (иногда именуемые в данном документе просто «композициями»), содержащие любой из rAAV-векторов согласно данному изобретению.

[0019] В другом варианте осуществления, согласно данному изобретению предложены способы получения rAAV-векторной частицы,

включающие культивирование клетки, трансфицированной любым rAAV-вектором согласно данному изобретению, и извлечение частиц rAAV из супернатанта трансфицированных клеток. Согласно данному изобретению также предложены вирусные частицы, содержащие любой из рекомбинантных AAV-векторов согласно данному изобретению.

[0020] В другом варианте осуществления, согласно данному изобретению предложены способы уменьшения фиброза у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение терапевтически эффективного количества любого rAAV-вектора согласно данному изобретению, экспрессирующего miR-29. Например, любой из rAAV согласно данному изобретению вводится субъектам, страдающим от мышечной дистрофии, для уменьшения фиброза и, в частности, уменьшает фиброз в скелетных мышцах или в сердечной мышце субъекта. Данные способы могут дополнительно включать стадию введения rAAV экспрессирующего микродистрофин.

[0021] «Фиброз» относится к избыточному или нерегулируемому отложению компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ), и аномальным процессам восстановления в тканях после повреждения, включая скелетные мышцы, сердечную мышцу, печень, легкие, почки и поджелудочную железу. Компоненты ВКМ, которые осаждаются, включают фибронектин и коллаген, например коллаген 1, коллаген 2 или коллаген 3.

[0022] В другом варианте осуществления, согласно данному изобретению предложены способы предотвращения фиброза у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение терапевтически эффективного количества любого рекомбинантного AAV-вектора согласно данному изобретению, экспрессирующего miR-29. Например, любой из rAAV изобретения вводят субъектам, страдающим от мышечной дистрофии, чтобы предотвратить фиброз, например, rAAV согласно данному изобретению, экспрессирующий miR-29, вводят до того, как фиброз обнаруживается у субъекта. Кроме того, rAAV согласно данному изобретению, экспрессирующий miR-29, вводят субъекту, подверженному риску развития фиброза, например, страдающему от мышечной дистрофии или диагностированному с мышечной дистрофией, например МДД. rAAV согласно данному изобретению вводят субъекту, страдающему от мышечной дистрофии,

чтобы предотвратить новый фиброз у данных субъектов. Данные способы могут дополнительно включать стадию введения экспрессирующего микродистрофин rAAV.

[0023] Согласно данному изобретению также предложены способы увеличения мышечной силы и/или мышечной массы у субъекта, страдающего от мышечной дистрофии, включающие введение терапевтически эффективного количества любого из rAAV-векторов согласно данному изобретению, экспрессирующих miR-29. Данные способы могут дополнительно включать стадию введения rAAV, экспрессирующего микродистрофин.

Термины «комбинированная терапия» и «комбинированное лечение» относятся к введению rAAV-вектора согласно данному изобретению, экспрессирующего miR-29, и rAAV-вектора, экспрессирующего микродистрофин.

[0024] В любом из способов согласно данному изобретению субъект может страдать от мышечной дистрофии, такой как МДД, мышечной дистрофии Беккера или любой другой дистрофии, связанной с дистрофином. Кроме того, в любом из способов согласно данному изобретению субъект может страдать от дистрофинопатии.

[0025] В другом варианте осуществления, согласно данному изобретению предложены рекомбинантные AAV-векторы, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую белок микродистрофина. Согласно данному изобретению предложен rAAV, содержащий: a) нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 7 и кодирующую функциональный белок микродистрофина, b) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7 или c) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 9.

[0026] Иллюстративный rAAV, экспрессирующий микродистрофин, согласно данному изобретению представляет собой pAAV.mck.-микродистрофин, который содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 9, и показан на Рис. 10 и 11. Данный rAAV-вектор содержит промотор МКК, последовательность химерного интрона, кодирующую последовательность гена микродистрофина, полиА, устойчивость к ампициллину и каркас плазмиды pGEX с сайтом начала репликации pBR322. В одном аспекте изобретения,

рекомбинантные AAV-векторы согласно данному изобретению представляют собой AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAVrh.74, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 или AAV13.

[0027] Согласно данному изобретению предложены rAAV-векторы, кодирующие белок микродистрофина, который, например, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% или 89%, более характерно по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93% или 94% и еще более характерно по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% по последовательности идентичен SEQ ID NO: 8, причем белок сохраняет активность микродистрофина. Белок микродистрофина обеспечивает прочность мышечной мембраны во время сокращения мышц, например, микродистрофин действует как амортизатор при сокращении мышц.

[0028] Согласно данному изобретению предложены rAAV-векторы, экспрессирующие белок микродистрофина, содержащие нуклеотидную последовательность, которая имеет по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% или 89%, более характерно по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93% или 94% и еще более характерно по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7, и кодирует функциональный белок микродистрофин.

[0029] Согласно данному изобретению предложены rAAV-векторы, экспрессирующие микродистрофин, содержащие нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется в жестких условиях с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 7 или ее комплементарными вариантами, и кодирует функциональный белок микродистрофин.

[0030] Термин «жесткий» применяется для обозначения условий, которые обычно подразумеваются в данной области техники как жесткие. Жесткость гибридизации в основном определяется температурой, ионной силой и концентрацией денатурирующих агентов, таких как формамид. Примеры жестких условий гибридизации и промывок представляют собой 0,015 М хлорида

натрия, 0,0015 М цитрата натрия при 65-68°С, или 0,015 М хлорида натрия, 0,0015М цитрата натрия, и 50% формамида при температуре 42°С. См. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, N.Y. 1989). Могут также быть использованы более жесткие условия (такие как более высокая температура, более низкая ионная сила, более высокая концентрация формамида, или другой денатурирующий агент) однако будет затронута скорость гибридизации. В случаях, когда речь идет о гибридизации дезоксиолигонуклеотидов, дополнительные иллюстративные условия жесткой гибридизации включают в себя промывку 6х SSC 0,05% пирофосфата натрия при 37°С (для 14-основных олигонуклеотидов), 48°С (для 17-основных олигонуклеотидов), 55°С (для 20-основных олигонуклеотидов) и 60°С (для 23-основных олигонуклеотидов).

[0031] Другие агенты могут быть включены в гибридизационные и промывочные буферы с целью уменьшения неспецифической и/или фоновой гибридизации. Примеры представляют собой 0,1% бычьего сывороточного альбумина, 0,1% поливинилпирролидона, 0,1% пирофосфата натрия, 0,1% додецилсульфата натрия, NaDodSO4, (SDS), фиколл, раствор Денхардта, разрушенная ультразвуком ДНК спермы лосося (или другая не комплементарная ДНК) и сульфат декстрана, хотя могут быть применены и другие подходящие агенты. Концентрация и типы этих добавок могут быть изменены без существенного влияния на жесткость условий гибридизации. Эксперименты по гибридизации обычно проводят при pH 6,8-7,4, однако в типичных условиях ионной силы скорость гибридизации практически не зависит от pH. См. Anderson et al., Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach, Ch. 4, IRL Press Limited (Oxford, England). Специалистами в данной области техники могут быть скорректированы условия гибридизации, чтобы приспособить эти переменные и позволить ДНК с различной степенью родственности последовательности формировать гибриды.

[0032] В другом аспекте, rAAV-векторы, экспрессирующие микродистрофин, содержат кодирующую последовательность гена микродистрофина, функционально связанную с регуляторным

элементом, специфичным для мышц. Например, регуляторный элемент, специфичный для скелетных мышц, представляет собой человеческий элемент гена актина скелетных мышц, элемент гена актина сердца, миоцит-специфичный связывающий энхансер фактор MEF, мышечную креатинкиназу (МКК), tМКК (усеченную МКК), тяжелую цепь миозина (МНС), C5-12 (синтетический промотор), энхансерный элемент мышиной креатинкиназы, элемент гена тропонина С быстро сокращающихся волокон скелетных мышц, элемент гена тропонина С медленно сокращающихся мышечных волокон сердца, элемент гена тропонина I медленно сокращающихся мышечных волокон, индуцируемые гипоксией ядерные факторы, стероид-индуцируемый элемент или глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE).

[0033] Кроме того, согласно данному изобретению предложены rAAV-векторы, экспрессирующие микродистрофин, содержащий специфический для мышцы регуляторный элемент, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11.

[0034] Согласно данному изобретению также предложены фармацевтические композиции (или иногда называемые в данном документе просто «композиции»), содержащие любой из rAAV-векторов согласно данному изобретению.

[0035] В другом варианте осуществления, согласно данному изобретению предложены способы получения rAAV-векторной частицы, включающие культивирование клетки, которая была трансфицирована любым rAAV-вектором согласно данному изобретению, и извлечения частиц rAAV из супернатанта трансфицированных клеток. Согласно данному изобретению также предложены вирусные частицы, содержащие любой из рекомбинантных AAV-векторов согласно данному изобретению.

[0036] Согласно данному изобретению также предложены способы получения функционального белка микродистрофина, включающие инфицирование клетки-хозяина рекомбинантным AAV-вектором, экспрессирующим микродистрофин согласно данному изобретению, и экспрессию функционального белка микродистрофина в клетке-хозяине.

[0037] В другом варианте осуществления, согласно данному изобретению предложены способы уменьшения фиброза у нуждающегося

в этом субъекта, включающие в себя введение терапевтически эффективного количества любого rAAV-вектора согласно данному изобретению, экспрессирующего микродистрофин. Например, любой из rAAV согласно данному изобретению вводят субъектам, страдающим от мышечной дистрофии или дистрофинопатии, для уменьшения фиброза и, в частности, уменьшает фиброз в скелетной мышце или в сердечной мышце субъекта.

[0038] В другом варианте осуществления, согласно данному изобретению предложены способы предотвращения фиброза у нуждающегося в этом субъекта, включающие в себя введение терапевтически эффективного количества любого рекомбинантного AAV-вектора согласно данному изобретению, экспрессирующего микродистрофин. Например, любой из rAAV согласно данному изобретению вводят субъектам, страдающим от мышечной дистрофии или дистрофинопатии, чтобы предотвратить фиброз, например, rAAV согласно данному изобретению, экспрессирующий микродистрофин, вводят до того, как фиброз обнаруживается у субъекта. Кроме того, rAAV согласно данному изобретению, экспрессирующий микродистрофин, вводят субъекту, подверженному риску развития фиброза, например, страдающему от мышечной дистрофии или диагностированному с мышечной дистрофией, например МДД или мышечной дистрофией Беккера. rAAV согласно данному изобретению вводят субъекту, страдающему от дистрофинопатии или дистрофинопатической мышечной дистрофией, чтобы предотвратить новый фиброз у данных субъектов.

[0039] Согласно данному изобретению также предложены способы увеличения мышечной силы и/или мышечной массы у субъекта, страдающего от мышечной дистрофии или дистрофинопатии, включающие введение терапевтически эффективного количества любого из rAAV-векторов согласно данному изобретению, экспрессирующих miR-29.

[0040] Любой из вышеперечисленных способов, включающих стадию введения rAAV, экспрессирующего miR-29c согласно данному изобретению, может включать в себя дополнительную стадию введения любого из rAAV, экспрессирующих описанный в данном документе микродистрофин. Термины «комбинированная терапия» и

«комбинированное лечение» относятся к введению rAAV-вектора согласно данному изобретению, экспрессирующего miR-29, и rAAV-вектора, экспрессирующего микродистрофин.

[0041] В способах введения rAAV-вектора, экспрессирующего miR-29, и rAAV-вектора, экспрессирующего белок микродистрофин, эти rAAV-векторы могут вводиться одновременно, или вводиться последовательно, причем rAAV-вектор, экспрессирующий miR29, вводят непосредственно перед rAAV, экспрессирующим белок микродистрофин, или вводятся последовательно, при этом rAAV-вектор, экспрессирующий miR29, вводят непосредственно после rAAV, экспрессирующего белок микродистрофин. Альтернативно, способы согласно данному изобретению осуществляют так, что AAV-вектор, экспрессирующий белок микродистрофин, вводят в течение около 1-5 часов, или 5-12 часов, или 12-15 часов, или 15-24 часов после введения rAAV, экспрессирующего miR-29, или способы согласно данному изобретению осуществляют так, что AAV-вектор, экспрессирующий белок микродистрофин, вводят в течение около 1-5 часов, или 5-12 часов, или 12-15 часов, или 15-24 часов до введения rAAV, экспрессирующего miR-29. Альтернативно, способы согласно данному изобретению осуществляют так, что AAV-вектор, экспрессирующий белок микродистрофин, вводят в пределах около 1, или 6, или 12, или 24 часов после введения rAAV, экспрессирующего miR-29, или способы согласно данному изобретению осуществляют так, что AAV-вектор, экспрессирующий белок микродистрофин, вводят в пределах около 1, или 6, или 12, или 24 часов до введения rAAV, экспрессирующего miR-29.

[0042] Изобретение предусматривает введение любого из AAV-векторов согласно данному изобретению пациентам с диагностированной дистрофинопатией или мышечной дистрофией, такой как МДД или мышечная дистрофия Беккера, до того, как у субъекта обнаруживают фиброз, или до того, как у субъекта была уменьшена мышечная сила, или до того, как у субъекта была уменьшена мышечная масса.

[0043] Изобретение также предусматривает введение любого из rAAV согласно данному изобретению субъекту, страдающему от дистрофинопатии или мышечной дистрофии, такой как МДД или

мышечная дистрофия Беккера, у которого уже развился фиброз, чтобы предотвратить новый фиброз у данных субъектов. Изобретение также предусматривает введение любого из rAAV согласно данному изобретению пациенту, страдающему от мышечной дистрофии, у которого уже уменьшилась мышечная сила или уменьшилась мышечная масса, чтобы защитить мышцу от дальнейшего повреждения.

[0044] В любом из способов согласно данному изобретению rAAV-вектор вводят путем внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции.

[0045] Кроме того, в любом из способов согласно данному изобретению rAAV-вектор или композицию вводят системно. В качестве примеров, rAAV-вектор или композиция вводится парентерально путем инъекции, инфузии или имплантации.

[0046] В другом варианте осуществления, согласно данному изобретению предложена композиция, содержащая любой из rAAV-векторов, экспрессирующих miR29, или любой из rAAV-векторов, экспрессирующих микродистрофин, или содержащая как rAAV-вектор, экспрессирующий miR-29, так и rAAV-вектор, экспрессирующий микродистрофин, для уменьшения фиброза у субъекта, нуждающегося в этом. Кроме того, согласно данному изобретению предложены композиции, содержащие любой из рекомбинантных rAAV-векторов, экспрессирующих miR29, или любой из rAAV-векторов, экспрессирующих микродистрофин, или содержащие как rAAV-вектор, экспрессирующий miR-29, так и rAAV-вектор, экспрессирующий микродистрофин, для уменьшения фиброза у субъекта, страдающего от дистрофинопатии или мышечной дистрофии, такой как МДД или мышечная дистрофия Беккера.

[0047] Согласно данному изобретению предложены композиции, содержащие любой из rAAV-векторов, экспрессирующих miR29, или любой из rAAV-векторов, экспрессирующих белок микродистрофин, или содержащие как rAAV-вектор, экспрессирующий miR-29, так и rAAV-вектор, экспрессирующий белок микродистрофин, для увеличения мышечной силы и/или мышечной массы у субъекта, страдающего от дистрофинопатии или мышечной дистрофии, такой как МДД или мышечная дистрофия Беккера.

[0048] В дополнительном варианте осуществления, согласно

данному изобретению предложены композиции, содержащие любой из rAAV-векторов, экспрессирующих miR29, или любой из rAAV-векторов, экспрессирующих белок микродистрофин, или содержащие как rAAV-вектор, экспрессирующий miR-29, так и rAAV-вектор, экспрессирующий белок микродистрофин, для лечения дистрофинопатии или мышечной дистрофии, такой как МДД или мышечная дистрофия Беккера.

[0049] Композиции согласно данному изобретению составлены для внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции. Композиция согласно данному изобретению также составлена для системного введения, такого как парентеральное введение путем инъекции, инфузии или имплантации. Кроме того, любая из композиций составлена для введения субъекту, страдающему от дистрофинопатии или мышечной дистрофии, такой как МДД, мышечная дистрофия Беккера, или любой другой дистрофией, связанной с дистрофином.

[0050] В дополнительном варианте осуществления, согласно данному изобретению предложено применение любого из rAAV-векторов согласно данному изобретению, экспрессирующих miR29, или любого из rAAV-векторов, экспрессирующих микродистрофин, или включающее как rAAV-вектор, экспрессирующий miR-29, так и rAAV-вектор, экспрессирующий микродистрофин, для приготовления лекарственного средства для уменьшения фиброза у субъекта, нуждающегося в этом. Например, пациент является нуждающимся в лечении, страдающим от дистрофинопатии или мышечной дистрофии, такой как МДД, мышечная дистрофия Беккера, или любой другой дистрофии, связанной с дистрофином.

[0051] В дополнительном варианте осуществления, согласно данному изобретению предложено применение любого из rAAV-векторов согласно данному изобретению, экспрессирующих miR29, или любого из rAAV-векторов, экспрессирующих микродистрофин, или включающее как rAAV-вектор, экспрессирующий miR-29, так и rAAV-вектор, экспрессирующий микродистрофин, для приготовления лекарственного средства для профилактики фиброза у субъекта, страдающего от мышечной дистрофии. В дополнительном варианте осуществления, согласно данному изобретению предложено

применение рекомбинантных AAV-векторов согласно данному изобретению, экспрессирующих miR29, или любого из rAAV-векторов, экспрессирующих микродистрофин, или включающее как rAAV-вектор, экспрессирующий miR-29, так и rAAV-вектор, экспрессирующий микродистрофин, для приготовления лекарственного средства для увеличения мышечной силы и/или мышечной массы у субъекта, страдающего от дистрофинопатии или мышечной дистрофии, такой как МДД или мышечная дистрофия Беккера.

[0052] Изобретение предусматривает применение любого из AAV-векторов согласно данному изобретению для приготовления лекарственного средства для введения пациенту с диагностированной МДД, до того, как у субъекта обнаруживают фиброз, или до того, как у субъекта была уменьшена мышечная сила, или до того, как у субъекта была уменьшена мышечная масса.

[0053] Изобретение также предусматривает применение любого из AAV-векторов согласно данному изобретению для приготовления лекарственного средства для введения, чтобы вводить любой из rAAV согласно данному изобретению субъекту, страдающему от мышечной дистрофии, у которого уже развился фиброз, чтобы предотвратить новый фиброз у данных субъектов. Изобретение также предусматривает введение любого из rAAV согласно данному изобретению пациенту, страдающему от мышечной дистрофии, у которого уже уменьшилась мышечная сила или уменьшилась мышечная масса, чтобы защитить мышцу от дальнейшего повреждения.

[0054] Согласно данному изобретению предложено применение rAAV-векторов согласно данному изобретению, экспрессирующих miR296, или любого из rAAV-векторов, экспрессирующих микродистрофин, или включающее как rAAV-вектор, экспрессирующий miR-29, так и rAAV-вектор, экспрессирующий микродистрофин, для приготовления лекарственного средства для лечения мышечной дистрофией.

[0055] В любом из применений согласно данному изобретению лекарственное средство составляют для внутримышечной инъекции. Кроме того, любое лекарственное средство может быть приготовлено для введения субъекту, страдающему от мышечной дистрофии, такой как МДД, или любой другой мышечной дистрофией, связанной с

дистрофином.

[0056] Кроме того, любое лекарственное средство согласно данному изобретению может представлять собой комбинированную терапию, в которой rAAV-векторы, экспрессирующие miR-29, и rAAV-векторы, экспрессирующие микродистрофин, вводят одновременно, или вводят последовательно, причем rAAV-вектор, экспрессирующий miR29, вводят непосредственно перед rAAV, экспрессирующим микродистрофин, или вводят последовательно, при этом rAAV-вектор, экспрессирующий miR29, вводят непосредственно после rAAV, экспрессирующего микродистрофин. Альтернативно, лекарственно средство включает в себя введение AAV-вектора, экспрессирующего микродистрофин, который вводят в течение около 1-5 часов после введения rAAV, экспрессирующего miR-29, или лекарственное средство содержит AAV-вектор, экспрессирующий микродистрофин, который вводят в течение примерно 1-5 часов до введения rAAV, экспрессирующего miR-29.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0057] На Рис. 1 показана схема rAAV-вектора scAAVCrh.74.ЦМВ.miR29c и нуклеотидная последовательность miR-29c в природном каркасе miR-30, и нуклеотидная последовательность предсказанной структуры шпильки.

[0058] На Рис. 2A-CD показано, что инъекция miR-29c в мышцу уменьшает коллаген во всей мышце и восстанавливает экспрессию miR-29c.

[0059] На Рис. 3A-3C показано, что инъекция miR-29c улучшает абсолютную мышечную силу (панель A) и удельную мышечную силу (панель B), но не защищает от повреждения, вызванного сокращением (панель C).

[0060] На Рис. 4A-4C показано количество мышечных волокон, экспрессирующих микродистрофин, для измерения эффективности доставки трансгена.

[0061] На Рис. 5A-5C показано, что совместная доставка miR-29c с микродистрофином уменьшает экспрессию коллагена (панель A) и экспрессию дистрофина, индуцированную фиброзом.

[0062] На Рис. 6A-6D показано, что внутримышечная инъекция miR-29c/микродистрофин ингибирует внеклеточный матрикс (ВКМ) у

мышей mdx/utrn$^{+/-}$, как измерено по коллагену 1 альфа (панель A), коллагену 3 альфа (панель B), фибронектину (панель C) и TGF-β (панель D).

[0063] На Рис. 7A-7C показано, что внутримышечная инъекция miR-29c увеличила абсолютную силу (панель A), нормированную удельную силу (панель B) и предоставила защиту от повреждения, вызванного сокращением, в мышце (панель C).

[0064] На Рис. 8 показано, что комбинация miR-29c/μ-dys увеличивает размер мышц у мышей, получавших лечение в возрасте 3 месяцев. Показаны срезы обработанных и необработанных икроножных мышц mdx/utrn$^{+/-}$, окрашенных пикросириус-красным, для окрашивания коллагена. Фиброзные области розовые, а интактные мышцы зеленые. На макроскопическом уровне комбинация miR-29c/μ-dys снижает фиброз и увеличивает общую площадь поперечного сечения.

[0065] На Рис. 9A-F показано, что обработка miR-29c, совместно доставленным с микродистрофином, увеличивает мышечную гипертрофию и гиперплазию, как показано увеличением общего веса инъецированной икроножной мышцы по сравнению с случаем, когда вводиться отдельно что-то одно (панель A), увеличением средней величины волокна (панель B), увеличение площади поперечного сечения мышцы (панель D; не вводили: 24,6 по сравнению с miR-29c: 26,3 по сравнению с микродис: 26,6 по сравнению с микродис/miR-29c: 33,1) и увеличением количества мышечных волокон (панель E), но количество мышечных волокон на единицу площади не было затронуто (панель F). Панель C сравнивает контрольных mdx/utrn$^{+/-}$ с обработанным miR-29c/μ-dys mdx/utrn$^{+/-}$, средний диаметр увеличился с 25,96 до 30,97 мкм.

[0066] На Рис. 10A-G показано, что ранняя обработка комбинированной терапией AAV.miR-29c/микродистрофин более эффективна для уменьшении фиброза и экспрессии ВКМ. На панели A показано окрашивание пикросириус-красным мышей: дикого типа, неинъецированных, AAV.miR-29c, AAV.микродистрофин и AAV.miR-29c/AAV.микродистрофин, инъецированных в возрасте 4-5 недель, выведенных из исследования двенадцати недель после инъекции. Панель B показывает количественную оценку окрашивания

пикросириус-красным, показывая, что совместно обработанная мышца имела 51,1% снижение коллагена по сравнению с неинъецированной икроножной мышцей. Панель C демонстрирует, что ОТ-ПЦР подтверждает увеличение уровней транскрипции miR-29c в обработанных группах. Полуколичественная ОТ-ПЦР показывает значительное снижение уровней коллагена I и III (панелей d, e), fbn (панель f) и TGF-β1 (панель g) в обработанной AAV.miR-29c/AAV.микродистрофин мышце, по сравнению с контралатеральной конечностью и каждой из одиночных терапий. Планки погрешностей, СОС (стандартная ошибка среднего) для n=5 (scAAVrh.74.ЦМВ.miR-29c), n=5 (scAAVrh.74.ЦМВ.miR-29c/ssAAVrh.74.МКК.микродистрофин), n=6 (ssAAVrh.74.МКК.микродистрофин), n=9 (мыши mdx/utrn$^{+/-}$). Односторонний дисперсионный анализ (*p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001)

[0067] На Рис. 11 показано, что ранняя комбинированная терапия восстанавливает силу и защищает от повреждения, вызванного сокращением. Величина абсолютной (панель A) и нормированной удельной силы (панель B) после тетанического сокращения во всех трех обработанных инъецированных икроножных мышцах была значительно увеличена по сравнению с необработанной мышцей mdx/utrn$^{+/-}$ (панель C). Затем мышцы оценивали на потерю силы после повторяющихся эксцентрических сокращений. Только у мышей, совместно обработанных miR-29c/микродистрофином и только микродистрофином, проявилась защита от потери силы по сравнению с необработанными мышцами mdx/utrn $^{+\backslash-}$ (синий). Двусторонний дисперсионный анализ демонстрирует значимость в спадающих кривых. Планки погрешностей, СОС для n=5 (rAAVrh.74.ЦМВ.miR-29c), n=6 (rAAVrh.74.ЦМВ.miR-29c/rAAVrh.74.МКК.микрко-дистрофин), n=5 (rAAVrh.74.МКК.микродистрофин), n=15 (mdx/utrn+/- мыши). Односторонний дисперсионный анализ (*p<0,05, **p<0,01, *** p<0,001, ****p<0,0001).

[0068] На Рис. 12 показано, что комбинированная обработка miR-29c/микродистрофин увеличивает размер мышц у мышей, получавших лечение в возрасте 1 месяца. Обработанные и

необработанные икроножные мышцы mdx/utrn$^{+/-}$ нарезали и окрашивали пикросириус-красным для окрашивания коллагена. Фиброзные области розовые, а интактные мышцы зеленые. На макроскопическом уровне комбинация miR-29c/микродистрофин снижает фиброз и увеличивает общую площадь поперечного сечения.

[0069] На Рис. 13A-13G показано, что раннее лечение (на 4-5 неделе) комбинированной терапией AAV.MKK.miR-29c/микродистрофин более эффективно для уменьшения фиброза и экспрессии ВКМ. На панели A показано окрашивание пикросириус-красным неинъецированных мышей и мышей AAV.MKK.miR-29c/AAV.MKK.микродистрофин, инъецированных в возрасте 4-5 недель, выведенных из исследования через 12 недель после инъекции. Первоначальное увеличение, x20 На панели B показана количественная оценка окрашивания пикросириус-красным, демонстрирующая что совместно обработанная мышца имеет 50,9% уменьшения коллагена по сравнению с необработанной икроножной мышцей. На панели C показана ОТ-ПЦР, подтверждающая увеличение уровней транскрипции miR-29c в обработанной группе. Полуколичественная ОТ-ПЦР демонстрирует значительное уменьшения количеств коллагена 1A (Col1A, панель D) и коллагена 3A (Col3A, панель E), фибронектина (Fbn; панель F) и Tgfβ1 (панель G) в обработанных AAV.MKK.miR-29c/AAV.микродистрофин мышцах, по сравнению с обработками контралатеральных конечностей. (*p<0,05, ****p<0,0001).

[0070] На Рис. 14A-14G показано, что поздняя обработка (лечение на 12 неделе) комбинированной терапией AAV.MKK.miR-29c/микродистрофин эффективна для снижения фиброза и экспрессии ВКМ. На панели A показано окрашивание пикросириус-красным необработанных, AAV.MKK.miR-29c и AAV.MKK.miR-29c/AAV.микродистрофин через 12 недель после инъекции. Оригинальное увеличение, x20. На панели B показана количественная оценка окрашивания пикросириус-красным, что демонстрирует, что совместно обработанная мышца имела 30,3% снижение коллагена по сравнению с необработанной икроножной мышцей. На панели C показана ОТ-ПЦР, подтверждающая увеличение

уровней транскрипта miR-29c в обработанных группах. Полуколичественная ОТ-ПЦР продемонстрировала значительное снижение количеств коллагена 1A (Col1A, панель D), коллагена 3A (Col3A, панель E), фибронектина (Fbn; панель F) и Tgfβ1 (панель G) в обработанных AAV.miR-29c/AAV.микродистрофин мышцах, по сравнению с противолежащей конечностью. Односторонний дисперсионный анализ. Все данные представляют собой среднее ± СОС. (** p<0,01, ****p<0,0001).

[0071] На Рис. 15A-15C показано, что ранняя комбинированная терапия (обработка на 4-5 неделе) восстанавливает силу и защищает от повреждения, вызванного сокращением. Величина абсолютной (панель A) и нормированной удельной силы (панель B) после тетанического сокращения обработанных МКК.miR-29c/микродистрофин икроножных мышц была значительно увеличена по сравнению с необработанной мышцей mdx/utrn$^{+/-}$ (панель C). (C) Затем мышцы оценивали на потерю силы после повторяющихся эксцентрических сокращений. У мышей, совместно обработанных miR-29c/микродистрофин и только микродистрофином, проявилась защита от потери силы по сравнению с необработанными мышцами mdx/utrn $^{+\backslash-}$ (красный). Двухсторонний дисперсионный анализ. Все данные представляют собой среднее ± СОС (****p<0,0001).

[0072] На Рис. 16A-16C показано, что поздняя комбинированная терапия восстанавливала силу и защищала от повреждений, вызванных сокращением. Величина абсолютной (панель A) и нормированной удельной силы (панель B) после тетанического сокращения инъецированных rAAV.МКК.miR-29c и rAAV, экспрессирующим микродистрофин, икроножных мышц была значительно увеличена по сравнению с необработанной мышцей mdx/utrn$^{+/-}$. На панели C показано, что затем мышцы оценивали на потерю силы после повторяющихся эксцентрических сокращений. У мышей, совместно обработанных rAAV.МКК.miR-29c/экспрессирующим микродистрофин rAAV, проявилась защита от потери силы по сравнению с необработанными мышцами mdx/utrn$^{+\backslash-}$ (красный). Двухсторонний дисперсионный анализ. Все данные представляют собой среднее ± СОС (**p<0,01, ****p<0,0001).

[0073] На Рис. 17A-17D показано, что комбинированное лечение увеличивает мышечную гипертрофию через 3 месяца после инъекции. На панели A показано, что rAAV.MKK.miR-29c, совместно доставляемый с rAAV, экспрессирующим микродистрофин, не смог увеличить общую массу инъецированной икроножной мышцы. На панели B показано, что комбинированная обработка rAAV.MKK.miR-29c/экспрессирующим микродистрофин rAAV вызвала увеличение среднего размера волокна. Сравнивая контрольных mdx/utrn$^{+/-}$ с обработанным miR-29c/микродистрофин mdx/utrn$^{+/-}$, средний диаметр увеличился с 28,96 до 36,03 мкм. На панели C показано, что совместная доставка привела к сдвигу в сторону распределения размера волокна как у дикого типа. На панели D показано, что количество мышечных волокон на мм^2 при комбинированной терапии miR-29c/микродистрофин значительно меньше, чем у необработанных мышей и дикого типа (***p<0,01, ****p<0,0001).

[0074] На Рис.18A-18B показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 1 pAAV.ЦМВ.Mir29C) иллюстративного rAAV-вектора, содержащего зрелую направляющую цепь miR-29c (нуклеотиды 1257-1284) и природный каркас mi-30 (нуклеотиды 1088-1375). Конструкция также содержит промотор ЦМВ (нуклеотиды 120-526), два интрона EF1a в пределах нуклеотидов 927-1087 и 1380-1854, и polA в пределах нуклеотидов 1896-2091.

[0075] На Рис.19 представлена схема rAAV-вектора pAAV.MKK.микродистрофин.

[0076] На Рис. 20A-D показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 9, pAAV.MKK.микродистрофин) иллюстративного rAAV-вектора, экспрессирующего микродистрофин.

[0077] На Рис. 21A-D показана нуклеотидная последовательность нуклеотидной последовательности микродистрофина человека (SEQ ID NO: 7)

[0078] На Рис. 22 показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 12 pAAV.MKK.Mir29C) иллюстративного rAAV-вектора, содержащего зрелую направляющую цепь miR-29c (нуклеотиды 1487-1512) и природный каркас mi-30 (нуклеотиды 1088-1375). Конструкция также содержит энхансер MKK (нуклеотиды 190-395), промотор MKK (нуклеотиды 396-753), два интрона EF1a в пределах

нуклеотидов 1155-1315 и 1609-2083, и polA в пределах нуклеотидов 2094-2148.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0079] Согласно данному изобретению предложены геннотерапевтические векторы, например rAAV-векторы, сверхэкспрессирующие микроРНК miR-29, и способы уменьшения и предотвращения фиброза у пациентов с мышечной дистрофией. Согласно данному изобретению также предложены способы комбинированной генной терапии, которые включают в себя введение геннотерапевтического вектора, экспрессирующего miR-29, в комбинации с геннотерапевтическим вектором, экспрессирующим микродистрофин, который удален у пациентов с МДД.

[0080] Мышечные биопсии, взятые в самом раннем возрасте диагностики МДД показывают выраженную пролиферацию соединительной ткани. Мышечный фиброз вреден во многом. Он уменьшает нормальный транспорт эндомизиальных питательных веществ через барьеры соединительной ткани, уменьшает кровоток и лишает мышцы получаемых через сосуды пищевых компонентов, и функционально способствует ранней утрате способности передвигаться из-за контрактуры конечностей. Со временем трудности лечения увеличиваются в результате выраженного фиброза в мышцах. Это можно наблюдать в биопсиях мышц, сравнивая пролиферацию соединительной ткани в последующие моменты времени. Процесс продолжает усугубляться, приводя к потере способности передвигаться и ускорению выхода из-под контроля, особенно у пациентов, зависящих от инвалидных колясок.

[0081] Без параллельного подхода к уменьшению фиброза маловероятно, что преимущества терапий с пропусканием экзона, остановкой считывания стоп-кодоном, или заменой гена когда-либо будут полностью реализованы. Даже стратегии с малыми молекулами или заменой белка, скорее всего, потерпят неудачу без подхода, сокращающего мышечный фиброз. Предыдущая работа на мышах *mdx* среднего возраста с имеющимся фиброзом, обработанных AAV.микродистрофин, показала, что мы не смогли добиться полного функционального восстановления (*Human molecular genetics* **22**, 4929-4937 (2013)). Известно также, что прогрессирование

кардиомиопатии при МДД сопровождается рубцеванием и фиброзом в стенке желудочка. Доставка микроРНК особенно инновационна из-за отсутствия иммунных барьеров и относительной простоты доставки. Микро-РНК - это небольшие (примерно 200 п. н.) и поэтому могут быть упакованы в AAV вместе с терапевтической кассетой для коррекции или обхода генетического дефекта.

[0082] Как применяется в данном документе, термин «AAV» является стандартной аббревиатурой для адено-ассоциированного вируса. Адено-ассоциированный вирус представляет собой одноцепочечный ДНК парвовирус, который размножается только в клетках, в которых определенные функции обеспечиваются ко-инфицирующим вспомогательным вирусом. В настоящее время существует тринадцать серотипов AAV, которые были охарактеризованы. Общую информацию и обзоры по AAV можно найти, например, в Carter, 1989, Handbook of Parvoviruses, Vol. 1, pp. 169-228, и Berns, 1990, Virology, pp. 1743-1764, Raven Press, (New York). Однако нет сомнений, что эти же принципы будут применимы к дополнительным серотипам AAV, поскольку хорошо известно, что различные серотипы довольно тесно связаны как структурно, так и функционально даже на генетическом уровне. (См., например, Blacklowe, 1988, pp. 165-174 of Parvoviruses and Human Disease, J. R. Pattison, ed.; и Rose, Comprehensive Virology 3:1-61 (1974)). Например, все серотипы AAV, по-видимому, обладают очень сходными свойствами репликации, опосредованными гомологичными генами rep; и все они имеют три родственных капсидных белка, таких как те, которые экспрессируются в AAV2. Степень родства дополнительно предсказывается с помощью гетеродуплексного анализа, который показывает обширную кросс-гибридизацию между серотипами по всей длине генома; и наличие аналогичных самоотжигающихся сегментов на концах, которые соответствуют «последовательностям инвертированного концевого повтора» (ITR). Подобные закономерности инфекционности также предполагают, что функции репликации в каждом серотипе находятся под одинаковым регуляторным контролем.

[0083] «AAV-вектор», как применяется в данном документе,

относится к вектору, содержащему один или большее количество представляющих интерес полинуклеотидов (или трансгенов), которые фланкированы последовательностями концевого повтора AAV (ITR). Такие AAV-векторы могут быть реплицированы и упакованы в инфекционные вирусные частицы, когда они присутствуют в клетке-хозяине, которая была трансфицирована векторном, кодирующим и экспрессирующим продукты генов rep и cap.

[0084] «AAV вирион» или «AAV вирусная частица» или «AAV-векторная частица» относится к вирусной частице, состоящей из по меньшей мере одного капсидного белка AAV и инкапсидированного полинуклеотидного AAV-вектора. Если частица содержит гетерологичный полинуклеотид (то есть полинуклеотид, отличный от генома AAV дикого типа, такой как трансген, который должен быть доставлен в клетку млекопитающего), его обычно называют «AAV-векторная частица» или просто «AAV-вектор». Таким образом, продуцирование AAV-векторной частицы обязательно включает в себя получения AAV-вектора, поскольку такой вектор содержится в AAV-векторной частице.

AAV

[0085] Рекомбинантные геномы AAV согласно данному изобретению содержат молекулу нуклеиновой кислоты согласно данному изобретению, и один или большее количество ITR AAV, фланкирующих молекулу нуклеиновой кислоты. ДНК AAV в геномах rAAV может быть из любого серотипа AAV, для которого может быть получен рекомбинантный вирус, включая, но не ограничиваясь лишь этими серотипами AAV: AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12 и AAV-13. Получение псевдо-типированного rAAV описано, например, в WO 01/83692. Также рассматриваются другие типы вариантов rAAV, например rAAV с капсидными мутациями. См., например, Marsic et al., Molecular Therapy, 22(11): 1900-1909 (2014). Как отмечено в разделе «УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ» выше, нуклеотидные последовательности геномов различных серотипов AAV известны в данной области техники. Для способствования специфической для скелетных мышцах экспрессии могут применяться AAV1, AAV6, AAV8 или AAVrh.74.

[0086] ДНК-плазмиды согласно данному изобретению содержат

геномы rAAV согласно данному изобретению. ДНК-плазмиды переносят в клетки, пригодные для инфицирования вспомогательным для AAV вирусом (например, аденовирусом, аденовирусом с удаленным E1, или вирусом герпеса) для упаковки генома rAAV в инфекционные вирусные частицы. Методы получения частиц rAAV, в которых в клетку вводят геном AAV, который должен быть упакован, гены rep и cap, и вспомогательные вирусные функции, являются стандартными в данной области техники. Получение rAAV требует, чтобы в одной клетке (обозначенная в данном документе как упаковывающая клетка) присутствовали следующие компоненты: геном rAAV, отделенные от (*т.е.* не в) генома rAAV rep и cap гены AAV, и функции вспомогательного вируса. Гены rep и cap AAV могут быть из любого серотипа AAV, для которого может быть получен рекомбинантный вирус, и могут быть из серотипа AAV, который отличается от серотипа ITR генома rAAV, включая, но не ограничиваясь лишь этими серотипами AAV: AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAVrh.74, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12 и AAV-13. Получение псевдотипированного rAAV описано, например, в WO 01/83692, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0087] Способ получения упаковывающей клетки заключается в создании клеточной линии, которая стабильно экспрессирует все необходимые компоненты для продуцирования частиц AAV. Например, плазмида (или несколько плазмид), содержащая геном rAAV без генов rep и cap AAV, гены rep и cap AAV, отделенные от генома rAAV, и маркер селекции, такой как ген устойчивости к неомицину, интегрированы в геном клетки. Геномы AAV были введены в бактериальные плазмиды с помощью таких процедур, как приделывание GC (Samulski et al., 1982, Proc. Natl. Acad. S6. USA, 79:2077-2081), добавление синтетических линкеров, содержащих сайты расщепления эндонуклеазами рестрикции (Laughlin et al., 1983, Gene, 23:65-73) или прямым лигированием тупых концов (Senapathy & Carter, 1984, J. Biol. Chem., 259:4661-4666). Упаковывающая клеточная линия затем заражается вспомогательным вирусом, таким как аденовирус. Преимущества этого метода заключаются в том, что клетки можно отбирать, и они

подходят для крупномасштабного производства rAAV. Другие примеры подходящих способов задействуют аденовирус или бакуловирус, а не плазмиды, для введения геномов rAAV и/или генов rep и cap в упаковывающие клетки.

[0088] Общие принципы получения rAAV рассмотрены, например, Carter, 1992, Current Opinions in Biotechnology, 1533-539; и Muzyczka, 1992, Curr. Topics in Microbial. and Immunol., 158:97-129). Различные подходы описаны в Ratschin et al., Mol. Cell. Biol. 4:2072 (1984); Hermonat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6466 (1984); Tratschin et al., Mo1. Cell. Biol. 5:3251 (1985); McLaughlin et al., J. Virol., 62:1963 (1988); и Lebkowski et al., 1988 Mol. Cell. Biol., 7:349 (1988). Samulski et al. (1989, J. Virol., 63:3822-3828); патенте США № 5173414; WO 95/13365 и соответствующем патенте США № 5658776; WO 95/13392; WO 96/17947; PCT/US98/18600; WO 97/09441 (PCT/US96/14423); WO 97/08298 (PCT/US96/13872); WO 97/21825 (PCT/US96/20777); WO 97/06243 (PCT/FR96/01064); WO 99/11764; Perrin et al. (1995) Vaccine 13:1244-1250; Paul et al. (1993) Human Gene Therapy 4:609-615; Clark et al. (1996) Gene Therapy 3:1124-1132; патенте США № 5786211; патенте США № 5871982; и патенте США № 6258595. Вышеупомянутые документы тем самым включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме, с особым вниманием к тем разделам документов, которые касаются получения rAAV.

[0089] Таким образом, согласно изобретению предложены упаковывающие клетки, которые продуцируют инфекционный rAAV. В одном варианте осуществления, упаковывающие клетки могут быть стабильно трансформированными раковыми клетками, такими как клетки HeLa, клетки 293 и клетки PerC.6 (родственная линия 293). В другом варианте осуществления, упаковывающие клетки представляют собой клетки, которые не являются трансформированными раковыми клетками, такими как клетки небольшого числа пассажей 293 (клетки почки плода человека, трансформированные E1 аденовируса), клетки MRC-5 (фибробласты плода человека), клетки WI-38 (фибробласты плода человека), клетки Vero (клетки почки обезьяны) и клетки FRhL-2 (клетки

легкого плода макака резус).

[0090] Рекомбинантные AAV (то есть, инфекционные инкапсулированные частицы rAAV) согласно данному изобретению содержат геном rAAV. В иллюстративных вариантах осуществления, геномы обоих rAAV не содержат ДНК rep и cap AAV, то есть между ITR геномов нет ДНК rep или cap AAV. Примеры rAAV, которые могут быть сконструированы так, чтобы содержать молекулы нуклеиновой кислоты согласно данному изобретению, приведены в международной заявке на патент № PCT/US2012/047999 (WO 2013/016352), включенной в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0091] rAAV может быть очищен стандартными способами данной области техники, такими как колоночная хроматография или градиенты хлорида цезия. Способы очистки rAAV-векторов от хелперного вируса известны в данной области техники и включают в себя способы, описанные, например, в Clark *et al., Hum. Gene Ther., 10*(6): 1031-1039 (1999); Schenpp and Clark, *Methods Mol. Med., 69* 427-443 (2002); патенте США № 6566118 WO 98/09657.

[0092] В другом варианте осуществления, в изобретении рассматриваются композиции, содержащие rAAV согласно данному изобретению. Композиции согласно данному изобретению включают в себя rAAV и фармацевтически приемлемый носитель. Композиции могут также содержать другие ингредиенты, такие как разбавители и адъюванты. Приемлемые носители, разбавители и адъюванты являются нетоксичными для реципиентов и предпочтительно являются инертными в используемых дозах и концентрациях и включают в себя: буферы, такие как фосфатный, цитратный, или на основе других органических кислот; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота; полипептиды с низкой молекулярной массой; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включающие глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как

Tween, плюроники или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

[0093] Титры rAAV, которые будут вводит в способах согласно данному изобретению, будут варьировать в зависимости, например, от конкретного rAAV, способа введения, цели лечения, индивида и типа(-ов) клеток, которые будут мишенями, и могут быть определены посредством способов данной области техники. Титры rAAV могут находится в диапазоне от около 1×10^{6}, около 1×10^{7}, около 1×10^{8}, около 1×10^{9}, около 1×10^{10}, около 1×10^{11}, около 1×10^{12}, около 1×10^{13} до около 1×10^{14} или больше устойчивых к ДНКазам частиц (DRP) в мл. Дозировки могут также выражаться в единицах геномов вируса (гв).

[0094] В изобретении рассматриваются способы трансдукции клетки-мишени с помощью rAAV, *in vivo* или *in vitro*. Способы *in vivo* включают в себя стадию введения эффективной дозы или эффективных многократных доз композиции, содержащей rAAV согласно данному изобретению, животному (включая человека), нуждающемуся в этом. Если дозу вводят до развития нарушения/заболевания, введение является профилактическим. Если доза вводится после развития нарушения/заболевания, введение является терапевтическим. В вариантах осуществления изобретения, эффективная доза представляет собой дозу, которая облегчает (устраняет или уменьшает) по меньшей мере один симптом, связанный с состоянием нарушения/заболевания, которое лечат, что замедляет или предотвращает прогрессирование до состояния нарушения/заболевания, которое замедляет или предотвращает прогрессирование состояния нарушения/заболевания, которое уменьшает степень болезни, что приводит к ремиссии (частичной или полной) заболевания и/или продлевает выживание. FSHD представляет собой пример заболевания, которое рассматривается как пригодное для профилактики или лечения способами согласно данному изобретению.

[0095] В данном изобретении также рассматриваются комбинированные терапии. Комбинация, применяемая в данном документе, включает в себя как одновременное лечение, так и последовательное лечение. Специально рассматриваются комбинации

способов согласно данному изобретению с стандартными лекарственными терапиями (*например,* кортикостероидами), как и комбинации с новыми терапиями.

[0096] Введение эффективной дозы композиций может осуществляться стандартным путями, которые включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: внутримышечный, парентеральный, внутривенный, пероральный, буккальный, назальный, легочный, внутричерепной, внутрикостный, внутриглазной, ректальный или вагинальный. Маршрут(ы) введения и серотип(ы) компонентов AAV rAAV (в частности, ITR AAV и капсидный белок) согласно данному изобретению могут быть выбраны и/или сопоставлены специалистами в данной области техники, с учетом инфекции и/или состояния болезни, что подлежит лечению, и целевых клеток/ткани(тканей), которые должны экспрессировать микроРНК miR-29 и/или микродистрофин.

[0097] Согласно данному изобретению предложены местное введение и системное введение эффективной дозы rAAV и композиций согласно данному изобретению, включая комбинированную терапию согласно данному изобретению. Например, системное введение - это введение в систему кровообращения, чтобы повлиять на весь организм. Системное введение включает в себя энтеральное введение, такое как абсорбция через желудочно-кишечный тракт и парентеральное введение путем инъекции, вливания или имплантации.

[0098] В частности, фактическое введение rAAV согласно данному изобретению может быть выполнено с использованием любого физического метода, который будет переносить рекомбинантный rAAV-вектор в ткань-мишень животного. Введение согласно изобретению включает в себя, но не ограничивается лишь этими: инъекцию в мышцу, кровоток и/или непосредственно в печень. Было продемонстрировано, что просто ресуспендирование rAAV в фосфатно-солевом буффере является достаточным для получения переносчика, применимого для экспрессии в мышечной ткани, и нет никаких известных ограничений на носители или другие компоненты, которые могут быть введены совместно с rAAV (хотя для rAAV следует обычным способом избегать композиций, которые разрушают

ДНК). Капсидные белки rAAV могут быть модифицированы таким образом, чтобы rAAV был нацелен на конкретную ткань-мишень, представляющую интерес, такую как мышца. См., например, WO 02/053703, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки. Фармацевтические композиции могут быть получены в виде инъекционных препаратов или в виде местных составов, для доставки в мышцы путем трансдермального транспорта. Ранее были разработаны многочисленные составы для внутримышечной инъекции и трансдермального транспорта, и они могут быть применены в практике изобретения. rAAV могут быть использованы с любым фармацевтически приемлемым носителем для удобства введения и обращения.

[0099] Доза вводимого rAAV в способах, раскрытых в данном документе, будет варьировать в зависимости, например, от конкретного rAAV, способа введения, цели лечения, индивида и типа(-ов) клеток, и может определяться способами, стандартными в данной области техники. Титры каждого вводимого rAAV могут находится в диапазоне от около 1×10^{6}, около 1×10^{7}, около 1×10^{8}, около 1×10^{9}, около 1×10^{10}, около 1×10^{11}, около 1×10^{12}, около 1×10^{13}, около 1×10^{14}, до около 1×10^{15} или больше устойчивых к ДНКазам частиц (DRP) в мл. Дозы могут также выражаться в единицах геномов вируса (гв) (т. е. 1×10^{7} гв, 1×10^{8} гв, 1×10^{9} гв, 1×10^{10} гв, 1×10^{11} гв, 1×10^{12} гв, 1×10^{13} гв, 1×10^{14} гв, 1×10^{15} соответственно). Дозы могут также выражаться в единицах геномов вируса (гв) на килограмм (кг) массы тела (т. е. 1×10^{10} гв/кг, 1×10^{11} гв/кг, 1×10^{12} гв/кг, 1×10^{13} гв/кг, 1×10^{14} гв/кг, 1×10^{15} гв/кг соответственно). Способы титрования AAV описаны в Clark et al., Hum. Gene Ther., 10: 1031-1039 (1999).

[00100] В частности, фактическое введение rAAV согласно данному изобретению может быть выполнено с использованием любого физического метода, который будет переносить рекомбинантный rAAV-вектор в ткань-мишень животного. Введение согласно изобретению включает в себя, но не ограничивается лишь этими: инъекцию в мышцу, кровоток и/или непосредственно в печень. Было продемонстрировано, что просто ресуспендирование rAAV в

фосфатно-солевом буффере является достаточным для получения переносчика, применимого для экспрессии в мышечной ткани, и нет никаких известных ограничений на носители или другие компоненты, которые могут быть введены совместно с rAAV (хотя для rAAV следует обычным способом избегать композиций, которые разрушают ДНК). Капсидные белки rAAV могут быть модифицированы таким образом, чтобы rAAV был нацелен на конкретную ткань-мишень, представляющую интерес, такую как мышца. См., например, WO 02/053703, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки. Фармацевтические композиции могут быть получены в виде инъекционных препаратов или в виде местных составов, для доставки в мышцы трансдермальным транспортом. Ранее были разработаны многочисленные составы для внутримышечной инъекции и трансдермального транспорта, и они могут быть применены в практике изобретения. rAAV могут быть использованы с любым фармацевтически приемлемым носителем для удобства введения и обращения.

[00101] Для внутримышечной инъекции могут быть использованы растворы в адъюванте, таком как кунжутное или арахисовое масло, или водный раствор пропиленгликоля, а также стерильные водные растворы. При желании такие водные растворы могут быть забуфферены, а жидкий разбавитель сначала подвергается изотоническому воздействию солевого раствора или глюкозы. Растворы rAAV в виде свободной кислоты (ДНК содержит кислые фосфатные группы) или фармакологически приемлемой соли могут быть приготовлены в воде, подходящим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсия rAAV также может быть приготовлена в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, и в маслах. В обычных условиях хранения и применения данные препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов. В связи с этим применяемые стерильные водные среды легко доступны для получения стандартными способами, хорошо известными специалистам в данной области техники.

[00102] Фармацевтические носители, разбавители или наполнители, пригодные для инъекционного применения, включают в

себя стерильные водные растворы или дисперсии, и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Во всех случаях форма должна быть стерильной, и должна быть текучей в той степени, чтобы существовала возможность ее ввести с помощью шприца. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения, и должна быть защищена от загрязняющих воздействий микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), их подходящие смеси, и растительные масла. Нужную текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии, и с использованием поверхностно-активных веществ. Предотвращение воздействия микроорганизмов может быть достигнуто различными антибактериальными и противогрибковыми средствами, например парабенами, хлорбутанолом, фенолом, сорбиновой кислотой, тимеросалом и тому подобным. Во многих случаях предпочтительно включать изотонические агенты, например сахара или хлорид натрия. Продленная абсорбция инъецируемых композиций может быть достигнута за счет применения агентов, замедляющих абсорбцию, например моностеарата алюминия и желатина.

[00103] Стерильные растворы для инъекций получают путем внесения rAAV в необходимом количестве в соответствующий растворитель с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, при необходимости с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии получают путем внесения стерилизованного активного ингредиента в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления инъецируемых стерильных растворов, предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и метод сублимационной сушки, которые дают порошок активного ингредиента, плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из его предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

[00104] Трансдукция с помощью rAAV также может проводиться *in vitro*. В одном варианте осуществления, желаемые мышечные клетки-мишени удаляют из субъекта, трансдуцируются rAAV и повторно вводят субъекту. Альтернативно, могут применяться изогенные или ксеногенные мышечные клетки, поскольку данные клетки не будут вызывать неуместный иммунный ответ у субъекта.

[00105] Подходящие способы трансдукции и реинтродукции трансдуцированных клеток в субъект известны в данной области техники. В одном варианте осуществления, клетки могут быть трансдуцированы *in vitro* путем объединения rAAV с мышечными клетками, например, в соответствующей среде, и проведен поиск клеток, несущих ДНК интереса, с использованием обычных методов, таких как саузерн-блоттинг и/или ПЦР, или с использованием селективных маркеров. Затем трансдуцированные клетки могут быть приготовлены в виде фармацевтических композиций, а композицию вводят субъекту различными способами, такими как внутримышечная, внутривенная, подкожная и внутрибрюшинная инъекция, или путем инъекции в гладкую и сердечную мышцу, используя, например, катетер.

[00106] Трансдукция клеток с помощью rAAV по изобретению приводит к устойчивой экспрессии miR-29 или микродистрофина. Таким образом, данное изобретение относится к способам введения/доставки rAAV, который экспрессирует miR-29 и/или микродистрофин, животному, предпочтительно человеку. Данные способы включают в себя трансдуцирование тканей (включая, но не ограничиваясь лишь тканями, такими как мышцы, органами, такими как печень и мозг, и железами, такими как слюнные железы) одним или большим количеством rAAV согласно данному изобретению. Трансдукция может быть проведена с помощью генных кассет, содержащих специфичные для ткани регуляторные элементы. Например, в одном варианте осуществления, согласно данному изобретению предложены способы трансдуцирования мышечных клеток и мышечных тканей, управляемые с помощью специфических для мышц регуляторных элементов, включающих в себя, но не ограничивающихся лишь этими: те, которые получены из семейств генов актина и миозина, например, из семейства генов myoD [см.

Weintraub *et al., Science, 251*: 761-766 (1991)], специфичный для миоцитов энхансер-связывающий фактор MEF-2 [Cserjesi and Olson, *Mol Cell Biol* 11: 4854-4862 (1991)], регуляторные элементы, полученные из гена актина скелетных мышц человека [Muscat *et al., Mol Cell Biol, 7*: 4089-4099 (1987)], гена актина серда, последовательности элементов креатинкиназы мышц [см. Johnson *et al., Mol Cell Biol, 9*:3393-3399 (1989)] и энхансерный элемент мышиной креатинкиназы (mCK), регуляторные элементы, полученные из гена тропонина С быстро сокращающихся волокон скелетных мышц, гена тропонина С медленно сокращающихся мышечных волокон сердца и гена тропонина I медленно сокращающихся мышечных волокон: индуцируемые гипоксией ядерные факторы (Semenza *et al., Proc Natl Acad Sci USA, 88*: 5680-5684 (1991)), стероид-индуцибельные элементы и промоторы, включающие в себя глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE) (см. Mader and White, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5603-5607 (1993)) и другие регуляторные элементы.

[00107] Мышечная ткань является привлекательной мишенью для доставки ДНК *in vivo*, поскольку она не является жизненно важным органом и легко доступна. В изобретении рассматривается устойчивая экспрессия микроРНК из трансдуцированных миофибрил.

[00108] Под «мышечной клеткой» или «мышечной тканью» подразумевается клетка или группа клеток, полученных из мышц любого вида (например, скелетных мышц и гладких мышц, например, из пищеварительного тракта, мочевого пузыря, кровеносных сосудов или сердечной ткани). Такие мышечные клетки могут быть дифференцированными или недифференцированными, такими как миобласты, миоциты, миотубы, кардиомиоциты и кардиомиобласты.

[00109] Термин «трансдукция» применяется для обозначения введения/доставки направляющей цепи miiR29 или кодирующей области микродистрофина в клетку-реципиент либо *in vivo,* либо *in vitro*, с помощью rAAV с дефектом репликации согласно данному изобретению, что приводит к экспрессии miR29 или микродистрофина клеткой-реципиентом.

[00110] Таким образом, согласно данному изобретению предложены способы введения пациенту, нуждающемуся в этом, эффективной дозы (или доз, вводимых, по существу, одновременно

или через заданные интервалы) rAAV, который кодирует miR29 и/или микродистрофин.

ПРИМЕРЫ

Пример 1 Подтверждение моделей мышечной дистрофии Дюшенна

[00111] Мышь mdx обеспечивает удобную, но неполную животную модель для изучения патогенеза DMD. Данная модель представляет собой гибрид мыши *mdx* с гетерозиготной нокаутной линией по гену атрофина (*mdx*:*utrn*+/-), которая существует с повышенным фиброзом и более точно повторяет патологию МДД человека. Мыши mdx имеют нонсенс-мутацию в экзоне 23 МДД, результатом чего является относительно мягкий фенотип и почти нормальная продолжительность жизни. К 3-недельному возрасту диафрагма и мышцы конечностей мышей md обретают признаки эндомизиального воспаления. Данные симптомы уменьшаются в мышцах конечностей после того, как мыши достигают зрелости, а воспаление в мышцах диафрагмы продолжает постепенно ухудшаться. У мышей mdx, лишенных теломеразы, мышечная дистрофия прогрессивно ухудшается с возрастом; мыши mdx, у которых отсутствует атрофин (DKO), имеют фенотип, более характерный для человеческого МДД с ранним проявлением мышечной слабости, сильным фиброзом и преждевременной смертью. Атрофин, аутосомный паралог дистрофина, обладает высокой степенью гомологии последовательности, который может компенсировать отсутствие дистрофина у мыши mdx с двойным КО (дистрофин плюс атрофин); наблюдается тяжелый фенотип с ранней смертью. Преждевременная смерть мыши DKO препятствует прогрессированию воспаления и фиброза, но мышь mdx:utrn$^{+/-}$ представляет собой модель, сходную с человеческим заболеванием, проявляющая внушительную степень фиброза и более длительную выживаемость, чем DKO, обеспечивая лучшую модель для наших предлагаемых исследований, передаваемых в клиническую практику. Недавний отчет подтверждает использование мыши mdx:utrn$^{+/-}$ как идеальной модели для изучения фиброза в контексте МДД. В данном исследовании увеличение фиброза, измеряемое окрашиванием сириус-красным, сопровождалось увеличением уровней транскрипта коллагена и снижением уровней mir29c.

Пример 2 Доставка miR29 мышам МДД снижает фиброз

[00112] Предварительные исследования показали, что наблюдается значительное увеличение окрашивания сириус-красным коллагена и снижение уровней miR-29c у пациентов-людей с МДД и мыши *mdx/utrn*$^{+/-}$. Доставка гена miR-29 с использованием AAV-векторов, специфичных для мышц, потенциально безопасна и эффективна. Для получения rAAV-вектора, обозначенного в данном документе как rAAVrh.74.ЦМВ.miR29c, последовательность miR29c из 22 нуклеотидов (направляющая цепь SEQ ID NO: 3 и направляющая цепь SEQ ID NO: 4) была клонирована в каркас miR-30, по управлением промотора ЦМВ. Экспрессионная кассета (SEQ ID NO: 2) была клонирована в самокомплементарную плазмиду AAV и упакована с использованием AAVrh.74, серотипа, который, как известно, хорошо экспрессируется в мышцах. кДНК miR-29c синтезировали применяя специальный праймер, содержащий цепь-мишень (смысловую) miR-29c, петлю-на-стебле miR-30 и направляющую (антисмысловую) цепь miR-29c в каркасе miR-30. Были модифицированы три основания последовательности miR-29c. Затем данную последовательность клонировали в самокомплементарную AAV содержащую ITR плазмиду, под управлением промотора ЦМВ и последовательности polyA.

[00113] Как показано на Рис. 1, плазмида pAAV.ЦМВ.miR29C содержит кДНК mir29c в каркасе петли-на-стебле miR-30, фланкированную последовательностями инвертированного концевого повтора AAV2 (ITR). Именно данная последовательность была инкапсидирована в вирионы AAVrh.74. Кроме того, несколько нуклеотидов с последовательностью-мишенью miR-29c были изменены для того, чтобы имитировать создание пар по Уотсону-Крику в данном сайте, как в мшРНК-miR(luc). Согласно дизайну мшРНК-luc, шпилька должна быть идеально комплементарной по всей длине. Кроме того, чем больше изменений в сопровождающей цепи, тем вероятнее устранение любого эндогенного механизма, который регулирует процессинг miR-29, которая могла бы распознать микроРНК через стебель. 19-тое основание направляющей цепи было модифицировано на цитозин, чтобы имитировать нуклеотид, который предшествует сайту расщепления в природной последовательности mi-29c, и соответствующее основание на другой цепи было изменено для сохранения спаривания.

[00114] Геннотерапевтический вектор scAAVrh.74.ЦМВ.miR29c (1×10^{11} гв) вводили в четырехглавую мышцу 3-месячной mdx/utrn$^{+/-}$ мыши. Четырехглавую мышцу анализировали через 3 месяца после инъекции окрашиванием сириус-красным и анализировали с помощью программного обеспечения NIH ImageJ как описано в Nevo et al. (PloS One, 6: e18049 (2011). Уровни miR29c, коллагена и эластина определяли с помощью RT-PCR. Доставка miR-29c в молодых *mdx/utrn* $^{+/-}$ мышей значительно увеличивает уровни mir-29c и значительное снижение окрашивания сириусом красным в четырехглавой мышце 6-месячных mdx/utrn$^{+/-}$ мышей (через 3 месяца после инъекции). Наблюдалось снижение уровней коллагена и эластина в обработанных мышцах при оценке количественной ПЦР.

[00115] Демонстрация увеличенного фиброза и сниженной экспрессии miR29 у мышей mdx/utrn$^{+/-}$ и пациентов с дефицитом дистрофина подтверждают, что мышиная модель является заместительной для человеческого заболевания. Первоначальные результаты с применением доставленной с помощью AAV miR29 в качестве антифибротической терапии свидетельствуют о том, что существует значительный положительный эффект с уменьшением окрашивания сириус-красным, и уровней коллагена и эластина, которые являются ключевыми факторами фиброза.

Пример 3 Инъекция MiR-29c снижает количество коллагена и восстанавливает miR-29c

[00116] Чтобы определить, может ли rAAVrh.74.ЦМВ.MiR-29c уменьшить фиброз, 12-недельные мыши mdx/utrn $^{+\backslash-}$ получали внутримышечную инъекцию rAAVrh.74.ЦМВ.MiR-29c с 5×10^{11} гв в левую икроножную мышцу (GAS). Мышей анализировали через 12 недель после инъекции. Окрашивание пикросириус-красным показало значительное снижение окрашивания коллагена во всем объеме икроножных мышц (Рис. 2a) по сравнению с необработанной контралатеральной икроножной мышцей mdx/utrn +/-. Количественная оценка окрашивания пикросириус-красным показала, что обработанная мышца имела на 18,3% уменьшения коллагена по сравнению с необработанной мышцей (обработанная - 23,3% ± 1,3 против необработанной - 29,5% ± 0,7) (Рис. 2b). Чтобы подтвердить

избыточную экспрессию miR-29c в обработанной мышце, общую РНК выделяли из икроножной мышцы из мышей ДТ 24-недельного возраста, обработанных miR-29c и mdx/utrn$^{+/-}$, и подвергали количественной ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) для анализа экспрессии miR-29c. Результаты показали, что количество miR-29 было значительно увеличено в икроножной мышце обработанных мышей по сравнению с необработанными мышами (Рис. 2d).

Пример 4: MiR-29c улучшает абсолютную и удельную мышечную силу, но не защищает от вызванного сокращением повреждения

[00117] Зная, что фиброз может влиять на функцию мышц, мы хотели проверить, может ли снижение фиброза путем увеличения экспрессии MiR-29c защитить мышцу mdx/utrn$^{+/-}$ от травмы, вызванной сокращением, и увеличить общую силу. Были оценены функциональные свойства икроножной мышцы из мышей mdx/utrn$^{+/-}$, обработанных rAAVrh.74.ЦМВ.MiR-29c. Через 12 недель после инъекции получали икроножные мышцы для проведения измерений силы *in vivo*.

[00118] Процедура с икроножной мышцей следует протоколу, указанному в Hakim et al. (Methods Mol Biol. 709: 75-89, 2011) для анализа физиологии поперечной брюшной мышцы, но адаптированного для икроножной мышцы. Вкратце, мышей анестезировали с использованием смеси кетамин/ксилазин. Кожа задней конечности была удалена, чтобы обнажить икроножную мышцу и ахиллово сухожилие. Дистальное сухожилие было вскрыто, и двойной прямой узел был связан вокруг сухожилия нитью 4-0 как можно ближе к мышце, другой двойной прямой узел был связан прямо возле первого узла, а затем сухожилие разрезали. Обнаженную мышцу постоянно увлажняли физиологическим раствором. Мыши затем переносили на терморегулируемую платформу и поддерживали при 37°C. Колено было прикреплено к платформе иглой через сухожилие коленной чашечки, сухожильный шов к уровню плеча силового преобразователя (Aurora Scientific, Aurora, ON, Канада), и нога была закреплена лентой. Мышечные сокращения икроножной мышцы были вызваны стимуляцией седалищного нерва через биполярные платиновые электроды. Как только мышца стабилизировалась,

оптимальная длина определялась путем постепенного растяжения мышцы до тех пор, пока не достигалась максимальная сила сокращения. После 3-минутного периода отдыха икроножную мышцу стимулировали 50, 100, 150 и 200 Гц, делая 1-минутный период отдыха между каждым стимулом для определения максимальной тетанической силы. Измеряли длину мышцы. После 5-минутного отдыха оценивали восприимчивость икроножной мышцы к повреждению, вызванному сокращением. После 500 мс стимуляции мышцу удлиняли на 10% от оптимальной длины. Этого достигали, стимулируя мышцу 150 Гц в течение 700 мс. После стимуляции мышцу возвращали к оптимальной длине. Цикл повторяли каждую минуту в течение всего 5 циклов. Удельная сила была рассчитана путем деления максимальной тетанической силы на площадь поперечного сечения икроножной мышцы. После эксцентрических сокращений мышей подвергали эвтаназии, и икроножную мышцу иссекали, взвешивали и замораживали для анализа.

[00119] Каждый икроножную мышцу подвергали серии повторяемых эксцентрических сокращений. Сравнивая отношение силы каждого сокращения по сравнению с первым сокращением, выяснилось, что после пятого сокращения необработанная мышца ослаблялась до 0,56 ± 0,05 против 0,50 ± 0,04 ($p \leq 0,0001$). Инъецированная группа показала небольшое снижение степени защиты по сравнению с контролем ДТ, при ослаблении до 0,92 ± 0,02 (Рис. 3c). Эти данные показывают, что уменьшение фиброза за счет увеличения экспрессии miR-29c приводит к увеличению как абсолютной, так и удельной силы, но не обеспечивает значительной защиты мышц от травмы, вызванной сокращением.

[00120] Обработанная rAAVrh.74.MiR-29c икроножная мышца показала значительное улучшение абсолютной силы по сравнению с необработанной икроножной мышцей mdx/utrn$^{+/-}$ (rAAV.miR-29c- 2277 ± 161,7 против необработанной mdx/utrn$^{+/-}$ - 1722 ± 145,7, Рис. 3a), а также специфическое улучшение нормированной удельной силы в обработанной rAAVrh.74.miR-29c икроножной мышце, по сравнению с необработанной икроножной мышцей (rAAV.miR-29c - 204,7 ± 11,7 против необработанной mdx/utrn$^{+/-}$ - 151,6 ± 14,5, Рис. 3b). Сила

по-прежнему значительно снижалась по сравнению с контролем дикого типа (rAAV.miR-29c - 204,7 ± 11,7 против дикого типа - 312,0 ± 34,1).

Пример 5 Совместная с микродистрофином доставка дополнительно снижает фиброз

[00121] Чтобы определить, был ли подход с комбинированной генной терапией miR-29c/микродистрофин более предпочтительным для снижения фиброза, 12-недельные мыши mdx/utrn$^{+\backslash-}$ получали внутримышечную инъекцию rAAVrh.74.ЦМВ.MiR-29c при 5x10^{11} гв в левую икроножную мышцу. Следующие геннотерапевтические векторы вводили внутримышечной инъекцией (IM) в левую икроножную мышцу (GAS) 3-месячных мышей mdx/utrn$^{+/-}$, мышиной модели МДД: только scAAVrh.74.ЦМВ.miR-29c, ко-доставлен с rAAVrh.74.МКК.микродистрофин, и только rAAVrh.74.МКК.микродистрофин.

[00122] Плазмида pAAV.МКК.микродистрофин содержит экспрессионную кассету кДНК микродистрофина человека, фланкированную последовательностями концевого инвертированного повтора AAV2 (ITR), как показано на Рис. 10. Именно данную последовательность инкапсидировали в вирионы AAV rh.74. Плазмиду pAAV.МКК.микродистрофин конструировали, вставляя экспрессионную кассету МКК, управляющую кодон-оптимизированной последовательностью кДНК микродистрофина человека, в AAV-вектор клонирования, как описано в Rodino-Klapac et al. (Mol Ther. 2010 Jan;18(1):109-17). Последовательность промотора/энхансера МКК использовали для управления экспрессией генов, специфичных для мышц, и она состояла из сердцевины энхансера МКК мыши (206 пар оснований), слитой с сердцевиной промотора МКК 351 п. о. (проксимальным). После сердцевины промотора следует 53 п. н. екзон-1 МКК мыши (нетранслируемый), для эффективной инициации транскрипции, за которым следуют сплайс сигналы поздних 16S/19S SV40 (97 п. н.) и небольшой 5'UTR (61 п. н.). Интрон и 5'-UTR получают из плазмиды pЦМВß (Clontech). Кассета с микродистрофином имеет консенсус Козак сразу перед старт-кодоном ATG и небольшой синтетический сигнал полиА из 53 п. н. для

терминации мРНК. Кассета микродистрофина человека содержит (R4-R23/Δ71-78) домены. Комплементарная ДНК была кодоном-оптимизированной для использования в человеке и синтезированная с помощью GenScript (Пискатауэй, Нью-Джерси).

[00123] Мышей анализировали через 12 недель и 24 недели после инъекции. Сперва, использовали количество мышечных волокон, экспрессирующих микродистрофин, для оценки эффективности доставки трансгена и чтобы убедится, что мы имели одинаковые количества микродистрофина, экспрессированного в каждой группе. Мы обнаружили, что микродистрофин не отличается в разных группах, обработанных только микродистрофином (71,85 ± 2,25%) по сравнению с комбинированной терапией miR-29c/микродистрофин (75,03 ± 1,91%) (Рис. 4).

[00124] Икроножные мышцы анализировали через 12 месяцев после инъекции для оценки накопления коллагена с помощью окрашивания сириус-красным и последующей количественной оценки с помощью ImageJ. Дополнительные результаты включали уровни транскриптов miR-29c и коллагена, измерения силы в икроножной мышце, измерения диаметра волокна и анализ вестерн-блоттинг для белков, участвующих в регенерации мышц (MyoD, Myogenin). Количество фиброза было проанализировано окрашиванием пикросириус-красным, которое выявило значительное снижение окрашивания коллагена во всех икроножных мышцах во всех обработанных группах (Рис. 5a) по сравнению с необработанной контралатеральной икроножной мышцей mdx/utrn+/- или обработанной только микродистрофином. Количественное определение окрашиванием пикросириус-красным показывает, что совместно обработанная мышца имела на 40,8% процентов уменьшенное количество коллагена по сравнению с необработанной мышцей (обработанная - 17,47% ± 0,75 против необработанной - 29,5 ± 0,7) (Рис. 5b). Чтобы подтвердить экспрессию miR-29c, ОТ-ПЦР проводили на икроножной мышце, и все группы лечения имели увеличение miR-29c по сравнению с необработанной мышцей (Рис. 5c).

[00125] Аналогично ткани МДД наблюдалось значительное снижение уровней miR-29c в мышцах mdx/utrn$^{+/-}$, что коррелировало

с увеличением фиброза, как измерено окрашиванием пикросириус-красным. После 3 месяцев обработки только scAAV.miR-29c наблюдалось значительное снижение фиброза (обработанная - 23,5 ± 1,3 против необработанной - 27,8 ± 0,6) в икроножной мышце. При ко-доставке с микродистрофином наблюдалось дополнительное снижение количества коллагена (41%) при окрашивании пикросириус-красным (комбинированная обработка: 17,47 ± 0,75 против необработанной: 29,5 ± 0,7) ($p<0,0001$) (Рис. 5b). Чтобы подтвердить экспрессию miR-29c, проводили ОТ-ПЦР с икроножной мышцей, и все группы лечения имели увеличение miR-29c по сравнению с необработанной мышцей (Рис. 5b).

[00126] Через 24 недели после инъекции результаты были аналогичны тем, которые наблюдались через 12 недель после инъекции. Уменьшение коллагена составляло 47%, как определенно окрашиванием пикросириус-красным, по сравнению с необработанной мышцей (комбинированная терапия: 16,5 ± 1,23 против необработанной: 31,07 ± 0,93, $p<0,0001$) и одновременное увеличение уровня транскрипции miR-29c.

[00127] Для дополнительного подтверждения снижения количества коллагена, наблюдаемого при окрашивании пикросириус-красным, проводили ОТ-ПЦР с мышцей для количественного определения уровней транскриптот Col1A, Col3A, а также другого компонента ВКМ, фибронектина (Fbn). Анализ ОТ-ПЦР показал уменьшение количества Col1A и Col3A после каждой обработки, однако только группа, обработанная как микродистрофином, так и miR-29c, показала значительное снижение (Рис. 6a и 6b). Анализ показал, что Fbn был значительно снижен только в совместно обработанной группе (Рис. 6c).

[00128] Ранее было показано, что уровень TGF-β1 повышен в дистрофической мышце, что, вероятно, играет роль в инициировании фиброзного каскада. TGF-β1 является известным про-фибротическим цитокином, который снижает уровень miR-29c и ответственен за превращение миобластов в миофибробласты с увеличением коллагена и мышечного фиброгенеза. Анализ ОТ-ПЦР показывает, что совместно

обработанная мышца имела значительно более низкие уровни TGF-β1 по сравнению с необработанной мышцей и с обработками по отдельности (Рис. 6d). Через 6 месяцев после инъекции совместно обработанная мышца продолжала демонстрировать снижение уровней Col1A, Col3A, Fbn и TGF-β1, тогда как наблюдалось лишь незначительное снижение уровней мРНК Col1A в группах, обработанных только miR-29 и только микродистрофином.

[00129] Увеличение удельной и абсолютной силы наблюдалось в мышце, обработанной только miR-29c, по сравнению с необработанной конечностью, который в сочетании с микродистрофином приводил к таким абсолютной и удельной силам, который не отличались от таковых дикого типа. Мы также наблюдали значительное увеличение массы тех икроножных мышц, которые были совместно обработаны.

[00130] Первоначальные результаты, полученные с помощью rAAV.miR-29c в качестве анти-фибротической терапии, свидетельствуют о благоприятном эффекте в виде снижения уровня коллагена, ключевого фактора фиброза. Кроме того, в сочетании с микродистрофином для улучшения стабильности мембраны, повышение уровня miR29 нормализует мышечную силу.

Пример 6 Дополнительное увеличение абсолютной силы и добавленная защита от повреждения, вызванного сокращением

[00131] Зная, что мышца, обработанная miR-29, имела умеренное, но значительное увеличение абсолютной и специфической силы, было исследовано влияние комбинированной терапии сверхэкспрессии miR-29c и замещения гена микродистрофина на функцию мышцы. Через 12 недель после инъекции мы выделили икроножную мышцу, для которой мы выполнили измерения силы *in vivo*. Вектор rAAVrh.74.MiR-29c описанный выше в Примере 2, и rAAV.

[00132] Совместно обработанная rAAVrh.74.MiR-29c и rAAV, экспрессирующим миродистрофин, икроножная мышца продемонстрировала значительное улучшение абсолютной силы по сравнению с необработанной икроножной мышцей mdx/utrn$^{+/-}$ (совместно обработанная - 3582,4 ± 79,4 нМ против необработанной

mdx/utrn$^{+/-}$ - 1722 ± 145,7 нМ против дикого типа - 3005 ± 167,3 нМ) (Рис. 7), а также специфическое улучшение нормированной удельной силы в обработанной rAAVrh.74.miR-29c/микродис икроножной мышце, по сравнению с необработанной икроножной мышцей (совместно обработанные мыши - 244,2 ± 6,6 нМ/мм^2 против необработанных mdx/utrn$^{+/-}$ - 151,6 ± 14,5 нМ/мм^2 против 312,0 ± 34,1 нМ/мм^2) (Рис. 7). И абсолютная и удельная силы существенно не отличались от контрольного дикого типа.

[00133] Каждый икроножную мышцу подвергали серии повторяемых эксцентрических сокращений. Сравнивая отношение силы каждого сокращения с первым сокращением, выяснилось, что после пятого сокращения необработанная мышца ослаблялась до 0,54 ± 0,06 по сравнению с совместно обработанной 0,66 ± 0,04 ($p \leq 0,0001$), что может быть объяснено вкладом микродистрофин, поскольку обработанная только микродистрофином также ослаблялась до 0,66 ± 0,04. Обработанная группа была все еще значительно ниже, чем дикий тип, который ослаблялся до 0,92 ± 0,02 (Рис. 7c). Аналогичные результаты были обнаружены через 24 недели после инъекции. Эти данные показывают, что снижение фиброза и замена гена приводит к увеличению как абсолютной, так и удельной сил, и значительно защищает мышцы от повреждения, вызванного сокращением.

Пример 7 Комбинированное лечение увеличивает мышечную гипертрофию и гиперплазию

[00134] MiR-29c, ко-доставляемый с микродистрофином, увеличивал общую массу инъецированной икроножной мышцы по сравнению теми, что были инъецированы каждым по отдельности в течение трех месяцев (Рис. 8, Рис. 9a). Чтобы исследовать источник увеличенной мышечной массы, измеряли диаметры миофибрил. miR-29c/μ-dys комбинированное лечение продемонстрировало увеличение среднего размера волокна. Сравнивая контрольных mdx/utrn$^{+/-}$ с обработанными miR-29c/μ-dys mdx/utrn$^{+/-}$, средний диаметр увеличился с 25,96 до 30,97 мкм (Рис. 9b). Совместная доставка привела к сдвигу распределения

размера волокна к таковому дикого типа (Рис. 9c). Хотя средний размер волокна был увеличен, это не объясняет увеличение массы мышц на 30%. Также измерялась общая площадь поперечного сечения мышцы. Были полностью сканированы икроножные мышцы из всех групп, и измерена общая площадь. Мышцы, совместно обработанные микродистрофин/miR-29c, имели значительное увеличение площади поперечного сечения по сравнению с необработанными и обработанными только чем то одним (неинъецирована: 24,6 в сравнении с miR-29c: 26,3 в сравнении с микродистрофином: 26,6 в сравнении с микродистрофин/ miR-29c: 33,1) (Рис. 8, Рис. 9d).

[00135] Сообщалось, что miR-29 участвует в пути myoD/Pax7/миогенин, и было высказано предположение, что miR-29c может влиять на регенерацию и активацию клеток-сателлитов (мышечных стволовых клеток), приводя к их дифференциации в миогенную линию. Чтобы проверить это, было подсчитано общее количество мышечных волокон из полных сканированных изображений. Увеличенное количество мышечных волокон после комбинированной терапии miR-29c/μ-dys (Рис. 9e). Наконец, учитывая, что диаметр мышечных волокон у мышей mdx/utrn+/- является гетерогенным со многими малыми волокнами и некоторыми гипертрофированными волокнами, было определено, влияет ли обработка на количество волокон на единицу площади (клетки/мм^2). Обработка комбинацией miR-29c/μ-dys не отличалась от дикого типа (Рис. 9f).

Пример 8 Раннее лечение комбинацией предотвращает фиброз

[00136] Принимая во внимание потенциальную важность комбинирования miR-29c и микродистрофина в качестве профилактической терапии для МДД, группу молодых мышей mdx/utrn$^{+/-}$ лечили в возрасте 4 недель. Используя ту же парадигму, что и для других групп, описанных в данном документе, сравнивали следующие обработки по эффективности предотвращения фиброза, вводимые путем внутримышечной инъекцией в икроножную мышцу: scAAVrh.74.ЦМВ.miR-29c, ssAAVrh74.МКК.микродистрофин+scAAVrh.74.ЦМВ.miR-29c или только ssAAVrh74.МКК.микродистрофин, в одинаковых дозах. Мышей умерщвляли через 12 недель после инъекции. Наблюдалось

значительное снижение окрашивания коллагена в икроножных мышцах во всех обработанных группах по сравнению с необработанной контралатеральной икроножной мышцей mdx/utrn$^{+/-}$ (Рис. 10A). Количественное определение окрашиванием пикросириус-красным показало, что совместно обработанная с помощью микродистрофин/miR-29c мышца имела 51% снижение коллагена по сравнению с необработанной мышцей (обработанная - 11,32 ± 1,18 в сравнении с необработанной - 23,15 ± 0,90) ($p<0,0001$) (Рис. 10) и ОТ-ПЦР подтвердила снижение Col1A, Col3A, Fbn и TGF-β1 после комбинированной терапии (Рис. 10D и E).

Пример 9 Ранняя комбинированная терапия восстанавливает силу и защищает от вызванного сокращением повреждения лучше позднего лечения

[00137] Измерение силы *in vivo* проводилось на икроножных мышцах мышей, которых лечили на ранней стадии комбинированной терапией, как описано в Примере 8. У 4-недельных мышей mdx/utrn$^{+/-}$ совместно обработка с использованием miR-29c/микродистрофин показала значительное улучшение абсолютной силы по сравнению с необработанными мышами mdx/utrn$^{+/-}$, и не было никакой разницы по сравнению с диким типом (совместно обработанные: 2908 ± 129,5 мН в сравнении с необработанными: 1639,4 ± 116,9 мН в сравнении с диким типом: 3369,73 ± 154,1 мН). Удельная сила также была нормирована по уровням дикого типа после комбинированной терапии (совместно обработанные 338,9 ± 22,34 мН/мм^2 в сравнении с необработанными 184,3 ± 13,42 мН/мм^2 в сравнении с ДТ 364,3 ± 7,79 мН/мм^2) (Рис. 11A и B и 12).

[00138] Затем каждую икроножную мышцу подвергался серии повторяемых эксцентрических сокращений. Сравнивая отношение силы каждого сокращения с пятым сокращением, необработанная мышца ослаблялась до 0,53 ± 0,04 по сравнению с совместно обработанной 0,82 ± 0,04 ($p \leq 0,0001$). Группа комбинированного лечения была несколько ниже дикого типа, но не сильно отличалась, с ослаблением до 0,93 ± 0,01 (Рис. 11C). Эти данные показывают, что снижение фиброза и замена гена приводит к увеличению как

абсолютной, так и удельной силы и существенно защищает мышцы от травмы, вызванной сокращением.

[00139] Данные эксперименты предполагают, что замена гена должна начинаться в неонатальный период. Усилия явно прилагаются в направлении идентификации МДД и других мышечных дистрофий в неонатальный период. Исследование скрининга новорожденных в Огайо иллюстрирует потенциал идентификации МДД у новорожденных с использованием СК 7 Neurol. в качестве биомаркера (>2000 Ед./ю) с ДНК-подтверждением на том же высушенном пятне крови (Mendell et al., Ann. Neurol. 71: 304-313, 2012). Данная методология теперь распространяется в другие штаты США (PPMD 16 мая 2016 года: следующие шаги в скрининге новорожденных) и в других странах, особенно в Великобритании (Британский национальный комитет по скринингу) и в Китае (Perkin Elmer ™ запускает скрининг в Китае).

[00140] miR-29 также показала себя перспективной в качестве способа лечения сердечного, легочного и печеночного фиброза. Инфаркт миокарда у мышей и людей связан с снижением уровня miR-29. Rooij et al. (Proc. Natl. Acad. Sci, USA 105:13027-13032, 2008) продемонстрировали, что воздействие миметика miR-29b на фибробласты уменьшает количество транскриптов коллагена, обеспечивая путь для перехода к клиническому применению при сердечном фиброзе. Последующие исследования показали, что в модели мышиного легочного фиброза, индуцированного блеомицином, ослабление фиброза может быть достигнуто с помощью miR-29b.14., доставляемого системой Sleeping Beauty (SB) на основе транспозона. В настоящее время миметик miR-29b находится в клинической фазе 1 безопасности-допустимости локального внутрикожного испытания на здоровых добровольцах (miRagen Therapeutics™ MRG-201). По сравнению с доставкой олигонуклеотида miR-29, которая потребовала бы повторяемого введения, связанного с периодом полувыведения олигонуклеотидов, генная терапия AAV могла бы потенциально обеспечить путь для одиночного переноса-доставки гена.

Пример 10 Лечение с помощью специфичной для мышц экспрессии

miR-29 и микродистрофина снижает фиброз и экспрессию ВКМ

[00141] AAV-векторы, содержащие последовательность miR29c и специфичный для мышц промотор МКК, также получали и тестировали в качестве комбинированной терапии вместе с AAV-векторами, экспрессирующими микродистрофин. Для получения rAAV-вектора, обозначенного в данном документе как rAAV.МКК.miR29c, 22-ух нуклеотидная последовательность miR29c (цепь-мишень SEQ ID NO: 3 и направляющая цепь SEQ ID NO: 4) была клонирована в каркас miR-30, под управлением промотора МКК (SEQ ID NO: 11). Экспрессионную кассету (SEQ ID NO: 12) клонировали в одноцепочечную AAV-плазмиду и упаковывали с использованием AAVrh74, серотипа, который, как известно, хорошо экспрессируется в мышцах. кДНК miR-29c синтезировали применяя специальный праймер, содержащий цепь-мишень (смысловую) miR-29c, петлю-на-стебле miR-30 и направляющую (антисмысловую) цепь miR-29c в каркасе miR-30. Были модифицированы три основания последовательности miR-29c. Затем данную последовательность клонировали в одноцепочечную содержащую ITR плазмиду AAV, под управлением промотора МКК и последовательности polyA.

[00142] Плазмида pAAV.МКК.miR29C содержит кДНК mir29c в петле-на-стебле miR-30, фланкированной последовательностями концевого инвертированного повтора AAV2 (ITR). Именно данная последовательность была инкапсидирована в вирионы AAVrh74. Кроме того, несколько нуклеотидов с последовательностью-мишенью miR-29c были изменены для того, чтобы имитировать создание пар по Уотсону-Крику в данном сайте, как в мшРНК-miR(luc). Согласно дизайну мшРНК-luc, шпилька должна быть идеально комплементарной по всей длине. Кроме того, чем больше изменений в сопровождающей цепи, тем вероятнее устранение любого эндогенного механизма, который регулирует процессинг miR-29, которая могла бы распознать микроРНК через стебель. 19-тое основание направляющей цепи было модифицировано на цитозин, чтобы имитировать нуклеотид, который предшествует сайту расщепления в природной последовательности mi-29c, и соответствующее основание на другой цепи было изменено для сохранения спаривания.

[00143] Раннее лечение комбинированной терапией

AAV.МКК.miR-29c/микродистрофин было более эффективным для снижения фиброза и экспрессии ВКМ. 4-5-недельные мыши mdx/utrn$^{+\backslash-}$ получали внутримышечную инъекцию rAAVrh.74.МКК.MiR-29c и rAAVrh74.МКК.микродистрофин в количестве 5x10^{11} гв в левую икроножную мышцу, как описано в Примере 5. Мышцы собирали через двенадцать недель после инъекции. Окрашивание пикросириус-красным мышц, собранных у неинъецированных мышей и мышей, инъецированных комбинированной терапией rAAV.МКК.miR-29c/rAAV.МКК.-микродистрофин, показало, что совместно обработанная мышца имела 50,9% снижение коллагена по сравнению с необработанной икроножной мышцей (см. Рис. 13a и 13b). ОТ-ПЦР подтвердила увеличение уровней транскрипции miR-29c в обработанной группе (Рис. 13c). Полуколичественная ОТ-ПЦР показала значительное снижение уровней коллагена A1 и коллагена 3A (Рис. 13d, e), фибронектина (Рис. 13f) и Tgfβ1 (Рис. 13g) в обработанной AAV.МКК.miR-29c/AAV.микродистрофин мышце, по сравнению с терапией контралатеральной конечности. (*p<0,05, ****p<0,0001).Позднее лечение комбинированной терапией AAV.МКК.miR-29c/микродистрофин является эффективным для снижения фиброза и экспрессии ВКМ. Трехмесячные мыши mdx/utrn$^{+\backslash-}$ получали внутримышечную инъекцию rAAVrh.74.МКК.MiR-29c и rAAVrh.74.МКК.микродистрофин в количестве 5x10^{11} гв в левую икроножную мышцу, как описано в Примере 5. Мышцы собирали через двенадцать недель после инъекции. Окрашивание пикросириус-красным необработанной мышцы, обработанной AAV.МКК.miR-29c и AAV.МКК.miR-29c/AAV.микродистрофин мышцы показало, что совместно обработанная мышца имела 30,3% снижение коллагена по сравнению с необработанной икроножной мышцей (см. Рис. 14a и 14b). ОТ-ПЦР подтвердила увеличение уровней транскрипции miR-29c в обработанных группах (Рис. 14c). Полуколичественная ОТ-ПЦР показала значительное снижение уровней коллагена 1A и коллагена 3A (Рис. 14d, e), фибронектина (Рис. 14f) и Tgfβ1 (Рис. 14G) в обработанной AAV.miR-29c/AAV.микродистрофин мышце, по сравнению с терапией контралатеральной конечности. Односторонний дисперсионный анализ. Все данные представляют собой среднее ±

СОС. (** p<0,01, ****p<0,0001).

Пример 11 Ранняя комбинированная терапия восстанавливает силу и защищает от вызванного сокращением повреждения лучше позднего лечения

[00144] Измерение силы *in vivo* проводилось на икроножных мышцах мышей, которых рано лечили с помощью miR-29 и микродистрофина, специфично экспрессирующихся в мышцах, как описано в Примерах 8 и 9. У 4-недельных мышей mdx/utrn$^{+/-}$ совместно обработка, применяя rAAV.MKK.miR-29c/и экспрессирующий микродистрофин rAAV, показала значительное улучшение абсолютной силы по сравнению с необработанными мышами mdx/utrn$^{+/-}$, и не было различий по сравнению с диким типом (Рис. 15a). Удельная сила также была нормирована по уровням дикого типа после комбинированной терапии (Рис. 15b).

[00145] Затем мышцы оценивали на потерю силы после повторяемых эксцентрических сокращений, как описано в Примере 9. Только у мышей, совместно обработанных rAAV.MKK.miR-29c/rAAV.MKK.микродистрофин и только rAAV.MKK.микродистрофин, проявилась защита от потери силы по сравнению с необработанными мышцами mdx/utrn $^{+\backslash-}$ (Рис. 15c).

[00146] У 12-недельных мышей mdx/utrn$^{+/-}$ совместно обработка с использованием rAAV.MKK.miR-29c/и экспрессирующего микродистрофин rAAV восстанавливала силу и защищала от повреждения, вызванного сокращением. Величина абсолютной (Рис. 16a) и нормированной удельной силы (Рис. 16b) после тетанического сокращения инъецированных rAAV.MKK.miR-29c и rAAV, экспрессирующим микродистрофин, икроножных мышц была значительно увеличена по сравнению с необработанной мышцей mdx/utrn$^{+/-}$. Затем мышцы оценивали на потерю силы после повторяемых эксцентрических сокращений, как описано в Примере 9. У мышей, совместно обработанных MKK.miR-29c/микродистрофином, проявилась защита от потери силы по сравнению с необработанными мышцами mdx/utrn $^{+\backslash-}$ (Рис. 16c). Эти данные показывают, что снижение фиброза и замена гена приводит к увеличению как абсолютной, так и удельной силы и существенно защищает мышцы от травмы, вызванной сокращением.

Пример 12 Раннее комбинированное лечение увеличивает

мышечную гипертрофию и гиперплазию

[00147] Совместная доставка rAAV.MKK.miR-29 с экспрессирующим микродистрофин rAAV не увеличивала общую массу инъецированной икроножной мышцы по сравнению с теми, что были инъецированы каждым по отдельности в течение трех месяцев (Рис. 17a). Также измерялись диаметры миофибрил. miR-29c/микродистрофин комбинированное лечение продемонстрировало увеличение среднего размера волокна. Сравнивая контрольных mdx/utrn$^{+/-}$ с обработанным miR-29c/микродистрофин mdx/utrn$^{+/-}$, средний диаметр увеличился с 28,96 до 36,03 мкм (Рис. 17b). Совместная доставка привела к сдвигу распределения размера волокна к таковому дикого типа (Рис. 17c). Количество мышечных волокон на мм^2 при комбинированной терапии miR-29c/микродистрофин значительно ниже, чем у необработанных мышей и дикого типа (Рис. 17d; ***p<0,01, ****p<0,0001).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hoffman, E.P., Brown, R.H., Jr. & Kunkel, L.M. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* **51**, 919-928 (1987).

2. Straub, V. & Campbell, K.P. Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. *Curr Opin Neurol* **10**, 168-175 (1997).

3. Sacco, A., *et al.* Short telomeres and stem cell exhaustion model Duchenne muscular dystrophy in mdx/mTR mice. *Cell* **143**, 1059-1071 (2010).

4. Wallace, G.Q. & McNally, E.M. Mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and repair in the muscular dystrophies. *Annu Rev Physiol* **71**, 37-57 (2009).

5. Zhou, L. & Lu, H. Targeting fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* **69**, 771-776 (2010).

6. Desguerre, I., *et al.* Endomysial fibrosis in Duchenne muscular dystrophy: a marker of poor outcome associated with macrophage alternative activation. *J Neuropathol Exp Neurol* **68**, 762-773 (2009).

7. Kim, J., *et al.* microRNA-directed cleavage of ATHB15 mRNA regulates vascular development in Arabidopsis inflorescence

stems. *Plant J* **42**, 84-94 (2005).

8. Ambros, V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell* **113**, 673-676 (2003).

9. Eisenberg, I., *et al.* Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 17016-17021 (2007).

10. Jiang, X., Tsitsiou, E., Herrick, S.E. & Lindsay, M.A. MicroRNAs and the regulation of fibrosis. *FEBS J* **277**, 2015-2021 (2010).

11. van Rooij, E., *et al.* Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 13027-13032 (2008).

12. Cacchiarelli, D., *et al.* MicroRNAs involved in molecular circuitries relevant for the Duchenne muscular dystrophy pathogenesis are controlled by the dystrophin/nNOS pathway. *Cell Metab* **12**, 341-351 (2010).

13. DiPrimio, N., McPhee, S.W. & Samulski, R.J. Adeno-associated virus for the treatment of muscle diseases: toward clinical trials. *Curr Opin Mol Ther* **12**, 553-560 (2010).

14. Mendell, J.R., *et al.* Sustained alpha-sarcoglycan gene expression after gene transfer in limb-girdle muscular dystrophy, type 2D. *Ann Neurol* **68**, 629-638 (2010).

15. Mendell, J.R., *et al.* Limb-girdle muscular dystrophy type 2D gene therapy restores alpha-sarcoglycan and associated proteins. *Ann Neurol* **66**, 290-297 (2009).

16. Mendell, J.R., *et al.* A phase 1/2a follistatin gene therapy trial for becker muscular dystrophy. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* **23**, 192-201 (2015).

17. Carnwath, J.W. & Shotton, D.M. Muscular dystrophy in the mdx mouse: histopathology of the soleus and extensor digitorum longus muscles. *J Neurol Sci* **80**, 39-54 (1987).

18. Coulton, G.R., Morgan, J.E., Partridge, T.A. & Sloper, J.C. The mdx mouse skeletal muscle myopathy: I. A histological, morphometric and biochemical investigation. *Neuropathol Appl Neurobiol* **14**, 53-70 (1988).

19. Cullen, M.J. & Jaros, E. Ultrastructure of the skeletal muscle in the X chromosome-linked dystrophic (mdx) mouse. Comparison with Duchenne muscular dystrophy. *Acta Neuropathol* **77**, 69-81 (1988).

20. Dupont-Versteegden, E.E. & McCarter, R.J. Differential expression of muscular dystrophy in diaphragm versus hindlimb muscles of mdx mice. *Muscle Nerve* **15**, 1105-1110 (1992).

21. Stedman, H.H., *et al.* The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature* **352**, 536-539 (1991).

22. Deconinck, A.E., *et al.* Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* **90**, 717-727 (1997).

23. Grady, R.M., *et al.* Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* **90**, 729-738 (1997).

24. Love, D.R., *et al.* An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature* **339**, 55-58 (1989).

25. Tinsley, J.M., *et al.* Primary structure of dystrophin-related protein. *Nature* **360**, 591-593 (1992).

26. Tinsley, J., *et al.* Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat Med* **4**, 1441-1444 (1998).

27. Squire, S., *et al.* Prevention of pathology in mdx mice by expression of utrophin: analysis using an inducible transgenic expression system. *Hum Mol Genet* **11**, 3333-3344 (2002).

28. Rafael, J.A., Tinsley, J.M., Potter, A.C., Deconinck, A.E. & Davies, K.E. Skeletal muscle-specific expression of a utrophin transgene rescues utrophin-dystrophin deficient mice. *Nat Genet* **19**, 79-82 (1998).

29. Zhou, L., *et al.* Haploinsufficiency of utrophin gene worsens skeletal muscle inflammation and fibrosis in mdx mice. *J Neurol Sci* **264**, 106-111 (2008).

30. Gutpell, K.M., Hrinivich, W.T. & Hoffman, L.M. Skeletal Muscle Fibrosis in the mdx/utrn+/- Mouse Validates Its

Suitability as a Murine Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *PloS one* **10**, e0117306 (2015).

31. Rodino-Klapac, L.R., *et al.* Micro-dystrophin and follistatin co-delivery restores muscle function in aged DMD model. *Human molecular genetics* **22**, 4929-4937 (2013).

32. Cushing, L., *et al.* MIR-29 is a Major Regulator of Genes Associated with Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* (2010).

33. Roderburg, C., *et al.* Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology* **53**, 209-218 (2011).

34. Nevo, Y., *et al.* The Ras antagonist, farnesylthiosalicylic acid (FTS), decreases fibrosis and improves muscle strength in dy/dy mouse model of muscular dystrophy. *PloS one* **6**, e18049 (2011).

35. Rodino-Klapac, L.R., *et al.* A translational approach for limb vascular delivery of the micro-dystrophin gene without high volume or high pressure for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J Transl Med* **5**, 45 (2007).

36. Mulieri, L.A., Hasenfuss, G., Ittleman, F., Blanchard, E.M. & Alpert, N.R. Protection of human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3-butanedione monoxime. *Circ Res* **65**, 1441-1449 (1989).

37. Rodino-Klapac, L.R., *et al.* Persistent expression of FLAG-tagged micro dystrophin in nonhuman primates following intramuscular and vascular delivery. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* **18**, 109-117 (2010).

38. Grose, W.E., *et al.* Homologous recombination mediates functional recovery of dysferlin deficiency following AAV5 gene transfer. *PloS one* **7**, e39233 (2012).

39. Liu, M., *et al.* Adeno-associated virus-mediated microdystrophin expression protects young mdx muscle from contraction-induced injury. *Mol Ther* **11**, 245-256 (2005).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Плазмида, содержащая в направлении от 5' к 3' инвертированный концевой повтор (ITR), специфичный для мышц регуляторный элемент, последовательность химерного интрона, нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7, поли-А-хвост и ITR.

2. Плазмида по п.1, где указанная плазмида не содержит генов rep и cap AAV.

3. Плазмида по п.1 или 2, дополнительно содержащая селектируемый маркер.

4. Плазмида по любому из пп.1-3, где специфичный для мышц регуляторный элемент содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11.

5. Плазмида по любому из пп.1-4, дополнительно содержащая последовательность химерного интрона между указанной нуклеотидной последовательностью и указанным специфичным для мышц регуляторным элементом, где последовательность химерного интрона представлена как нуклеотиды 844-993 SEQ ID NO:9.

6. Плазмида по любому из пп.1-5, дополнительно содержащая поли-А-хвост с 3'-конца указанной нуклеотидной последовательности, где последовательность указанного поли-А-хвоста представлена как нуклеотиды с 4585 по 4640 SEQ ID NO:9.

7. Бактериальная клетка, содержащая плазмиду по любому из пп. 1-6.

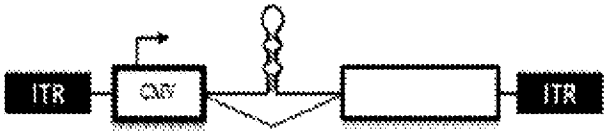
8. Упаковывающая клетка, содержащая плазмиду по любому из пп. 1-6.

9. Упаковывающая клетка по п.8, выбранная из группы, состоящей из клеток 293, клеток MRC-5, клеток WI-38, клеток Vero и клеток FrhL-2.

По доверенности

Фиг. 1

scAAVrh.74.CMV.miR29c



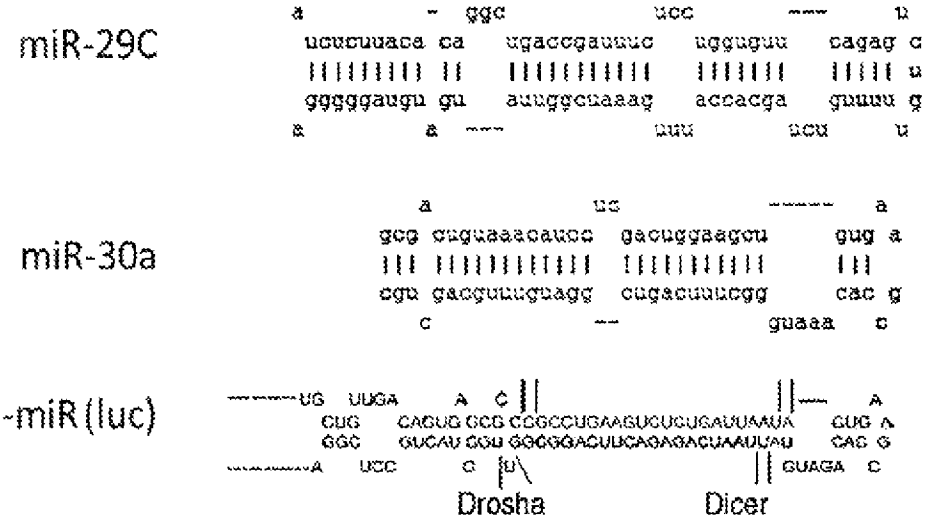
SEQ ID NO: 2: miR-29C IN A miR-30 КАРКАС

GGCCGGCC*tgtttgaatgaggcttcagtactttacagaat*CGTTGCCTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACT
TCTTCAGGTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGCAACCGA
TTTCAAATGGTGCTAGAGTGAAGCCACAGATGTCTAGCACCATTTGAAATCGGTTATGCCTACTG
CCTCGGAATTCAAGGGGCTACTTTAGGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTGCTA
TCTCTTTGATACATTGGCCGGCC

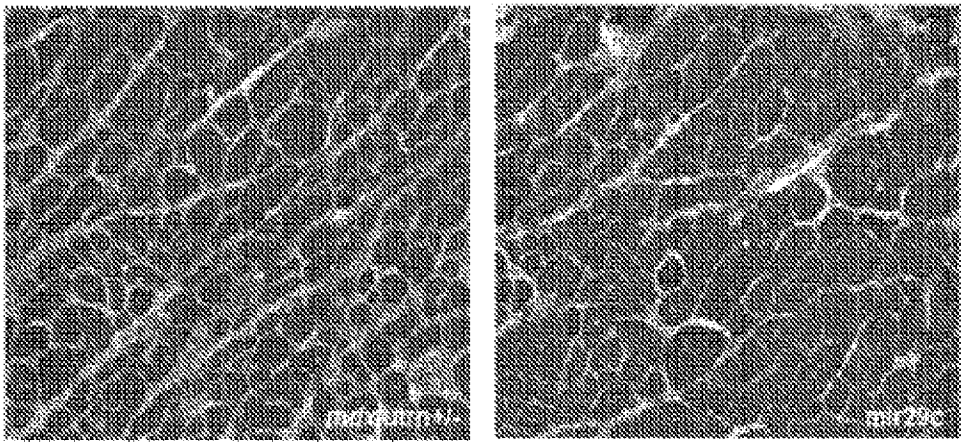
FSE-I сайт расщепления (сайт рестрикции)
miR-30 каркас
miR-30 шпилька (GTGAAGCCACAGATG; SEQ ID NO: 5)
miR-29c целевая (смысловая) цепь (ACCGATTTCAAATGGTGCTAGA; SEQ ID NO:3))
miR-29c направляющая (антисмысловая) цепь (TCTAGCACCATTTGAAATCGGTTA; SEQ ID NO: 4)

Предсказанная шпилечная структура (SEQ ID NO:6)

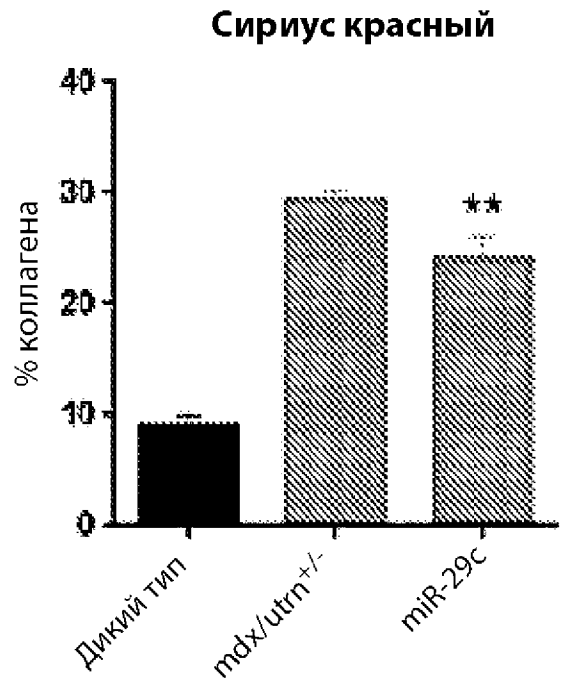
```
    G  UUGA      A   C                          -----    A
---U CUG    CAGUG GCG AACCGAUUUCAAAUGGUGCUAGA       GUG A
   | |||    ||||| ||| ||||||||||||||||||||||||       |||  >
---A GGC    GUCAU CGU UUGGCUAAAGUUUACCACGAUCU       CAC G
    A   UCC      C   A                          GUAGA   C
```



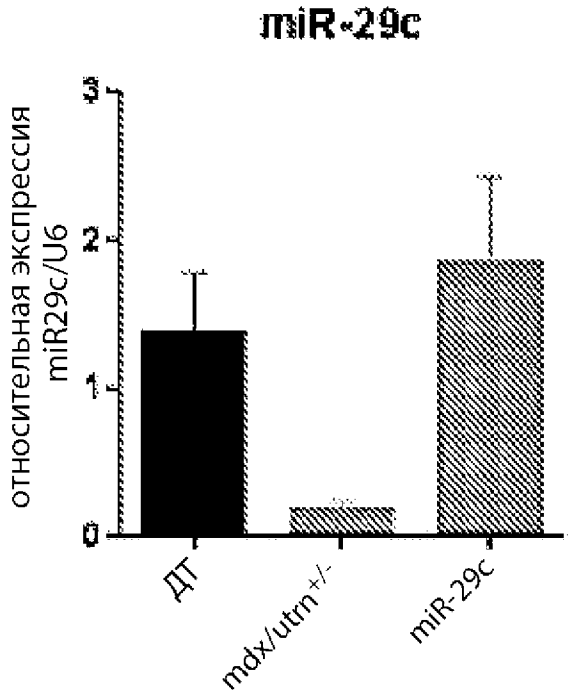
Фиг. 2A



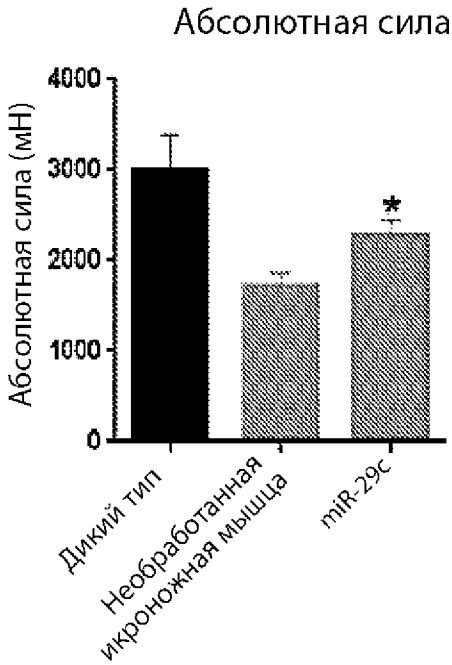
Фиг. 2B



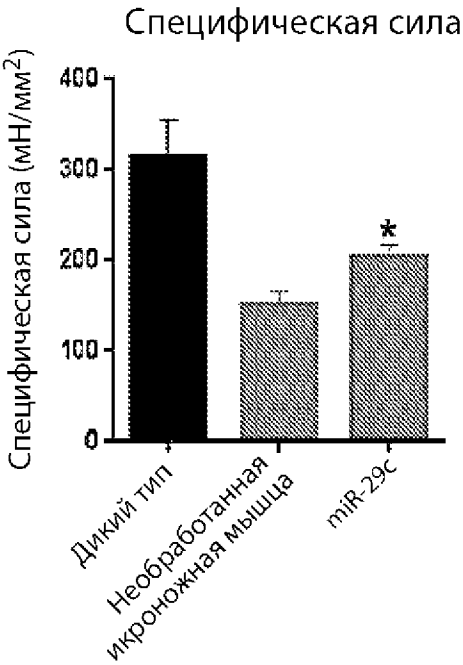
Фиг. 2C



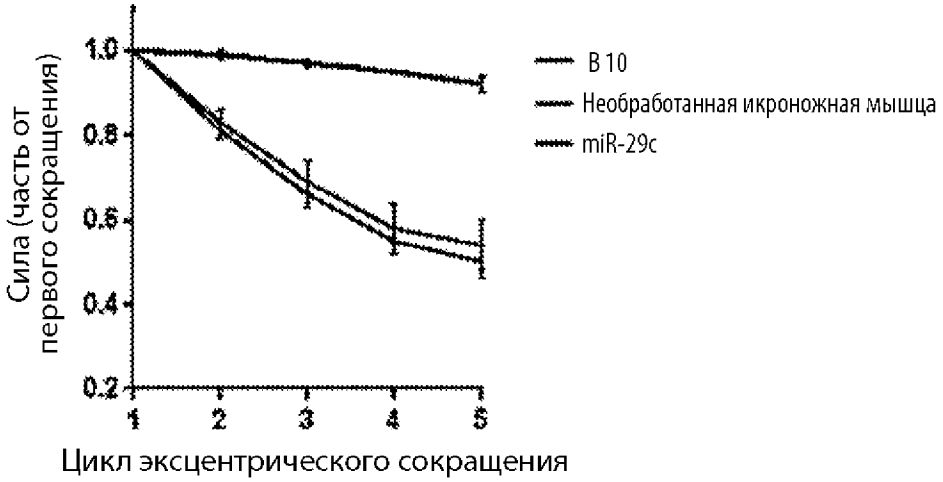
Фиг. 3A



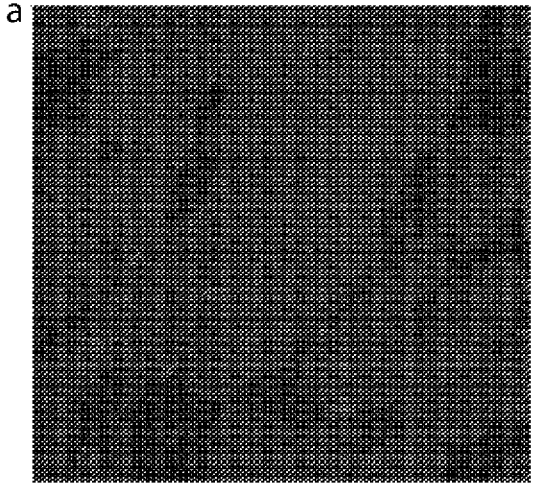
Фиг. 3B



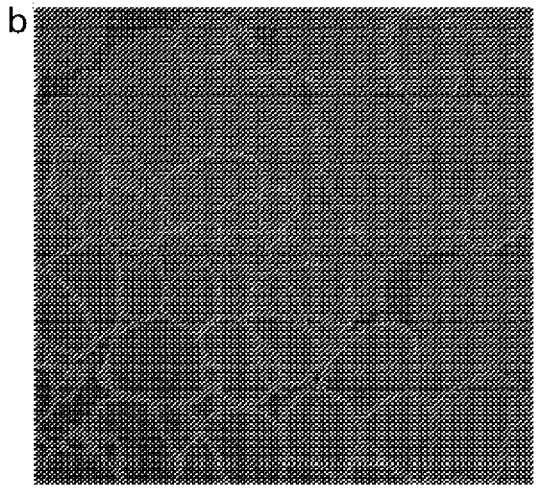
Фиг. 3C



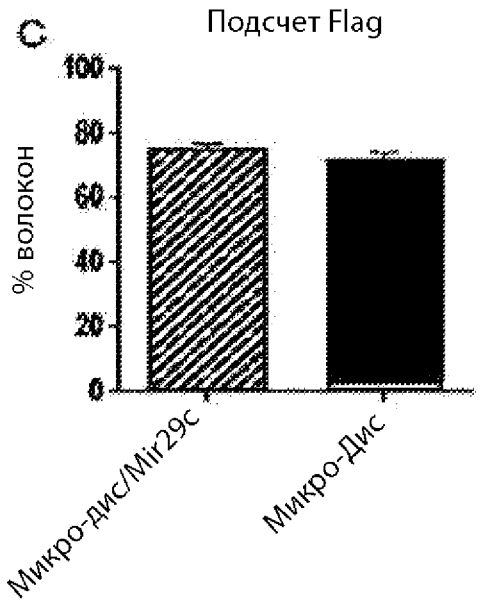
Фиг. 4A



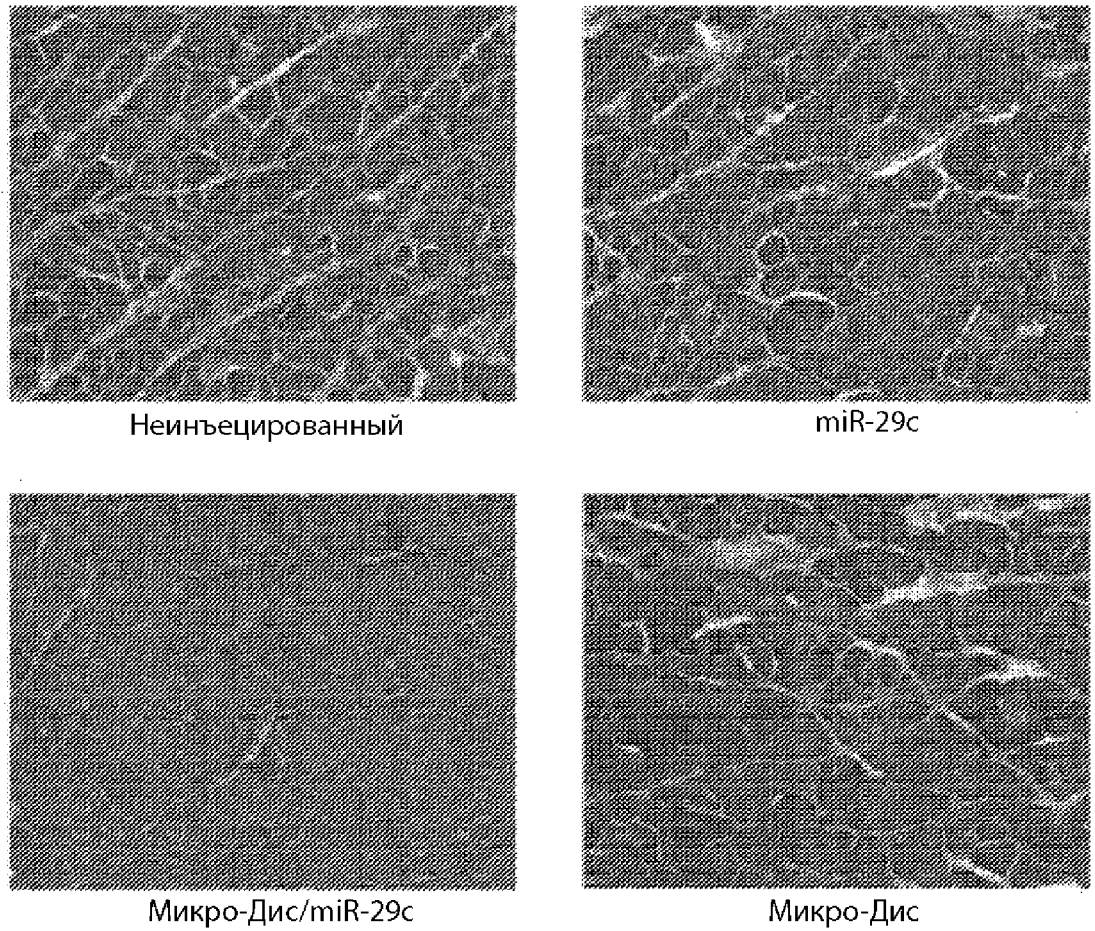
Фиг. 4B



Фиг. 4C

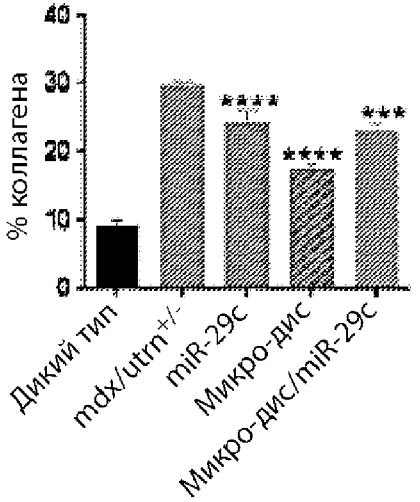


Фиг. 5A



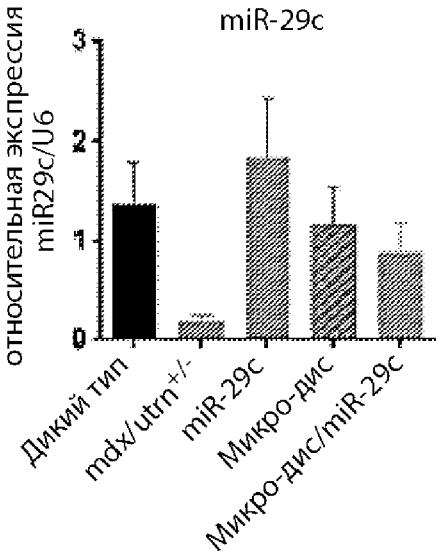
Фиг. 5B

Сириус красный

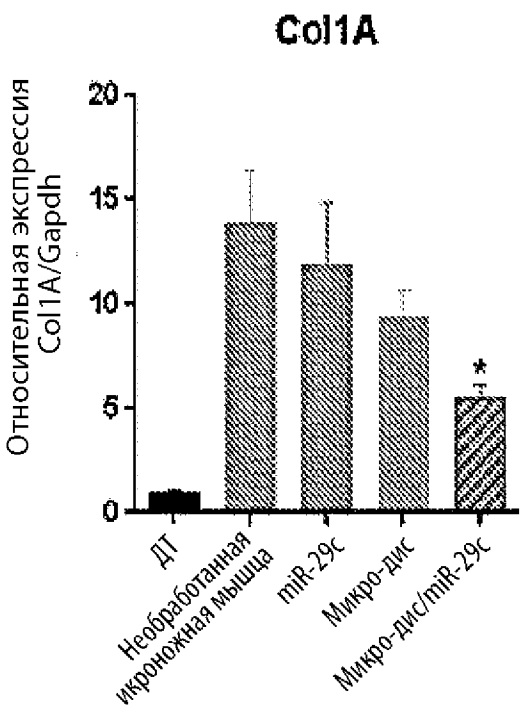


Фиг. 5C

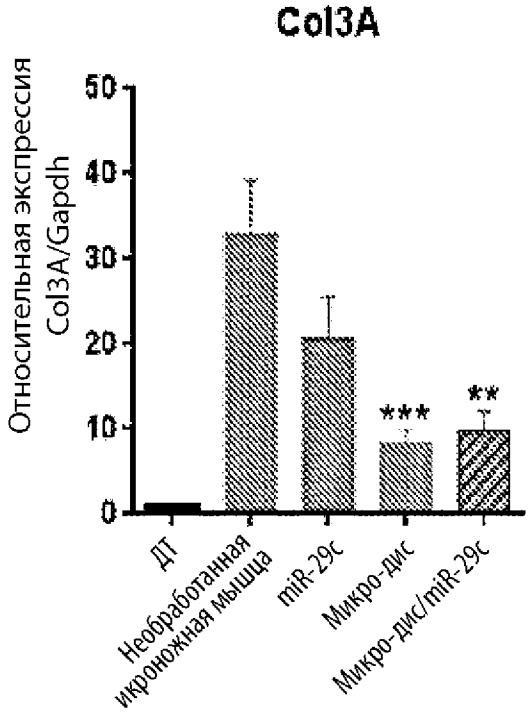
miR-29c



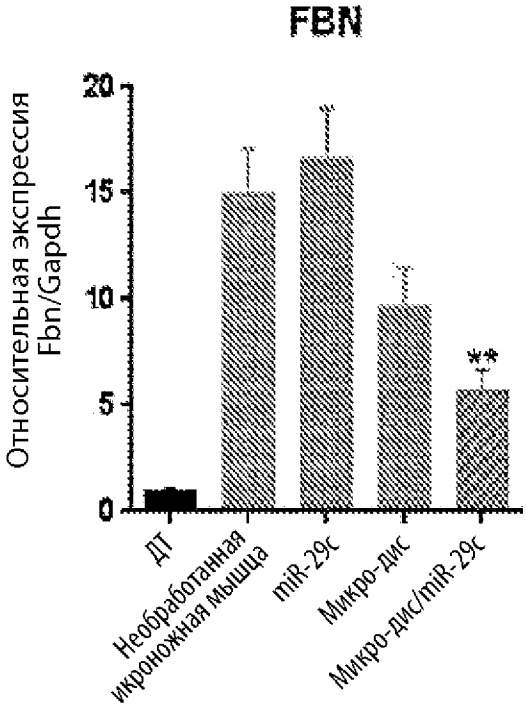
Фиг. 6A



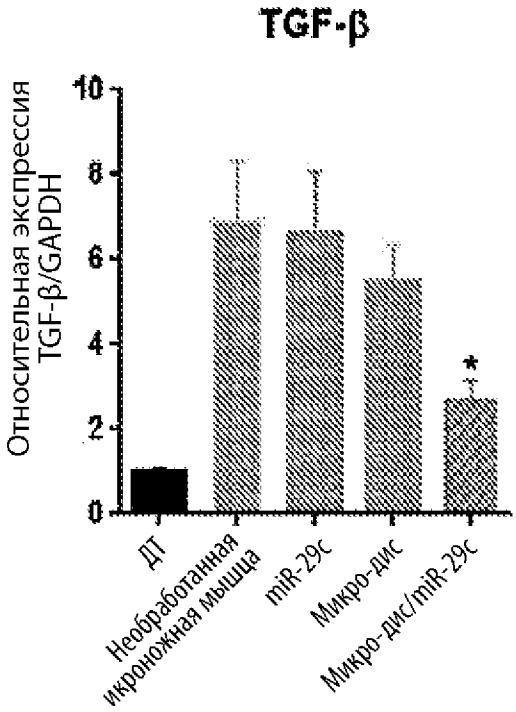
Фиг. 6B



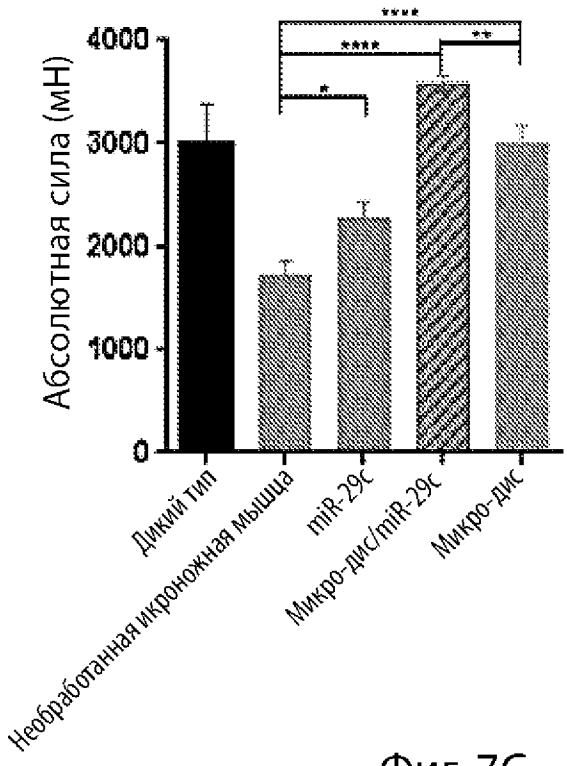
Фиг. 6C



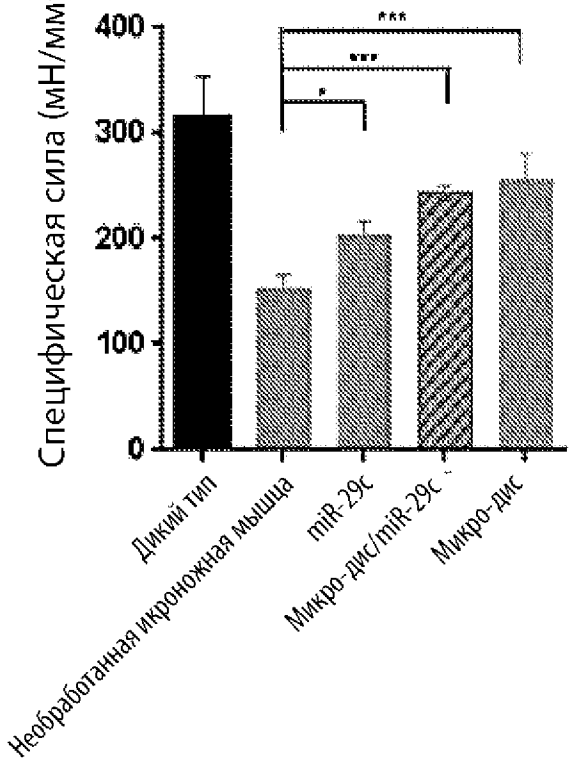
Фиг. 6D



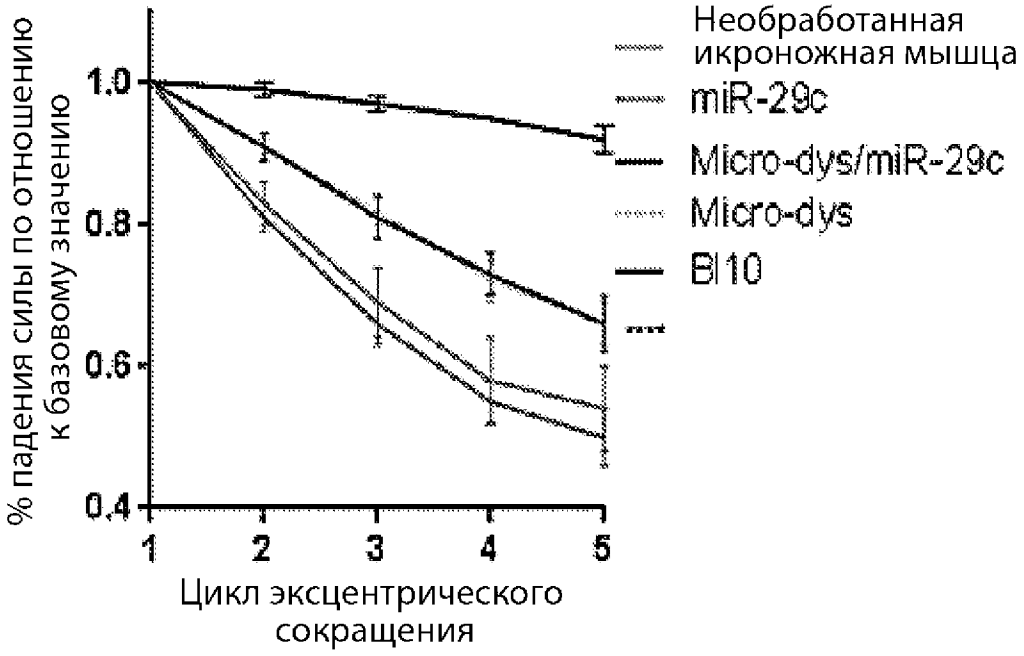
Фиг. 7A



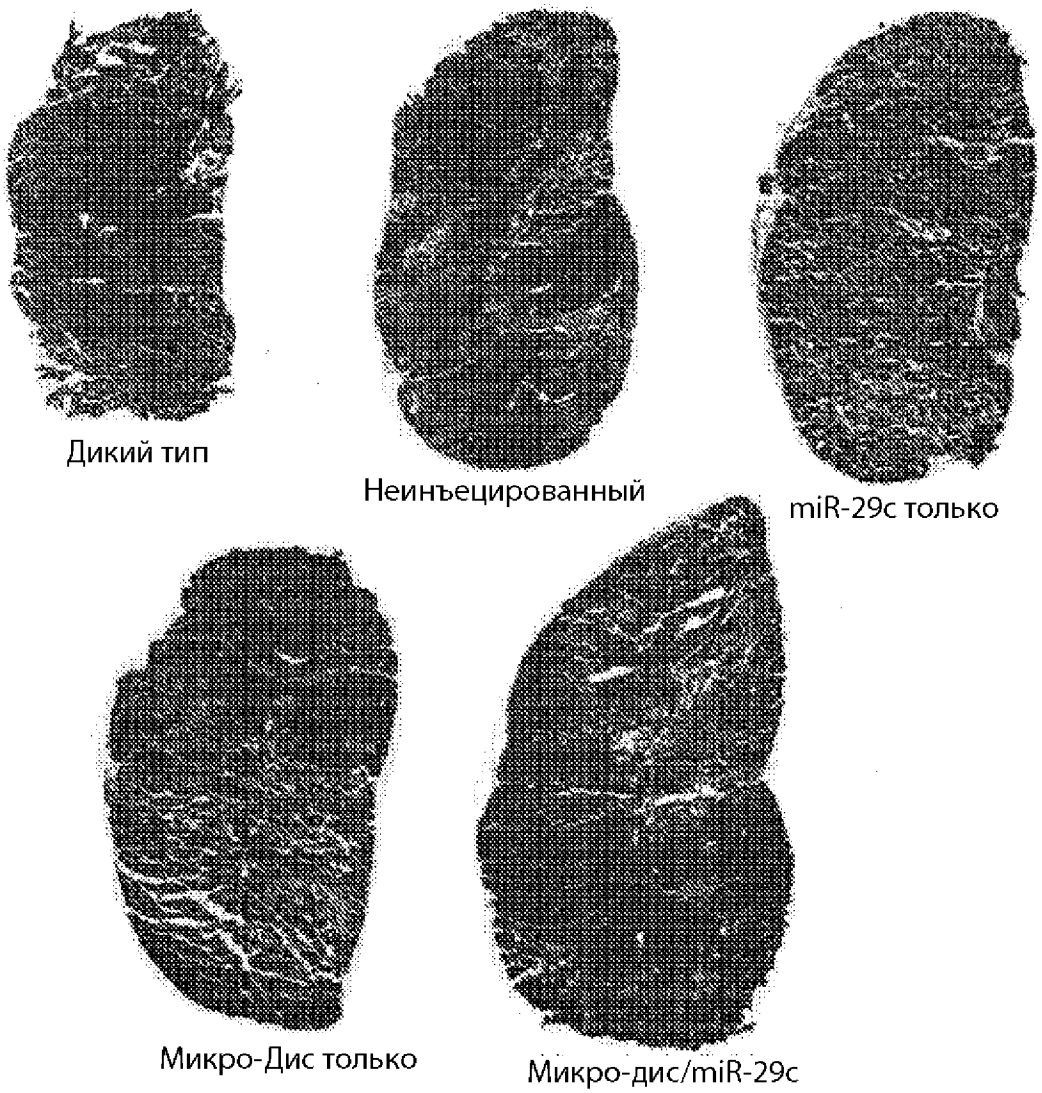
Фиг. 7B



Фиг. 7C

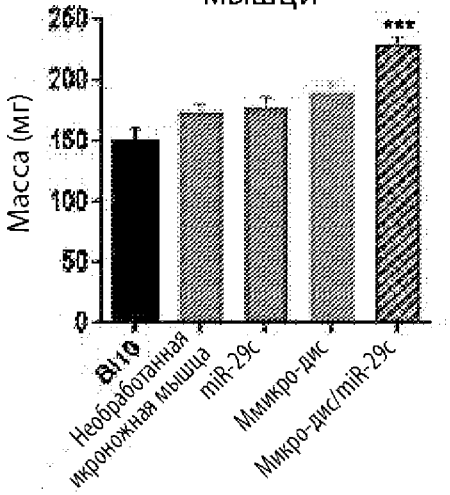


Фиг. 8


Дикий тип
Неинъецированный
miR-29c только
Микро-Дис только
Микро-дис/miR-29c

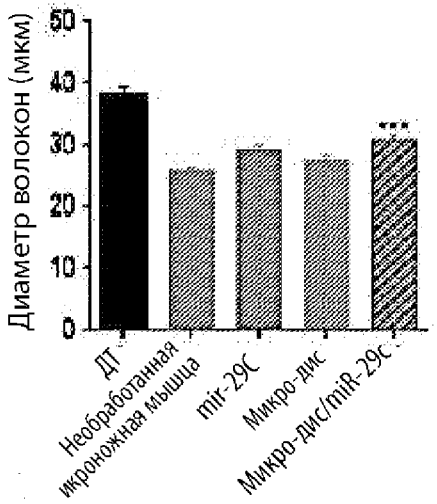
Фиг. 9A

Масса икроножной мышцы



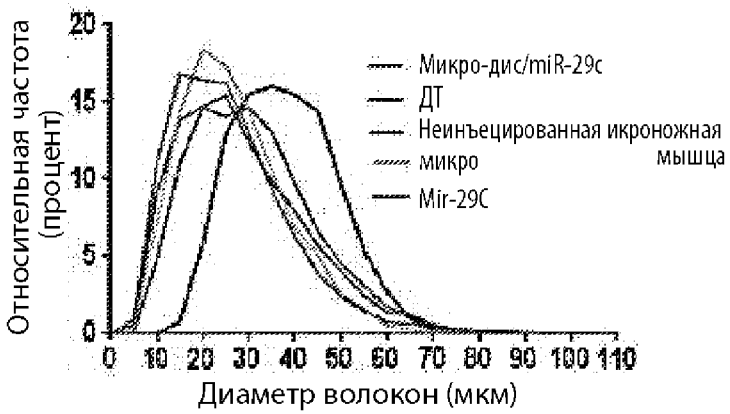
Фиг. 9B

Диаметры волокон



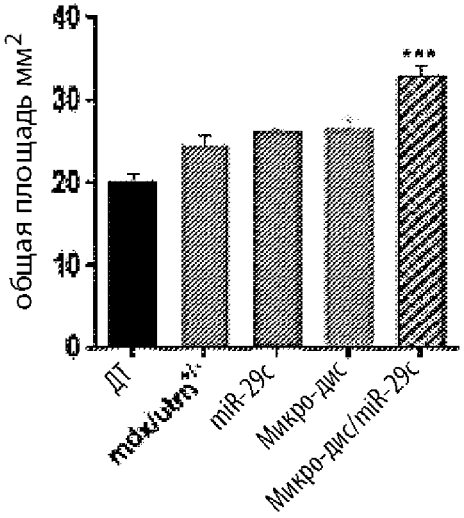
Фиг. 9C

Гистограмма всех диаметров



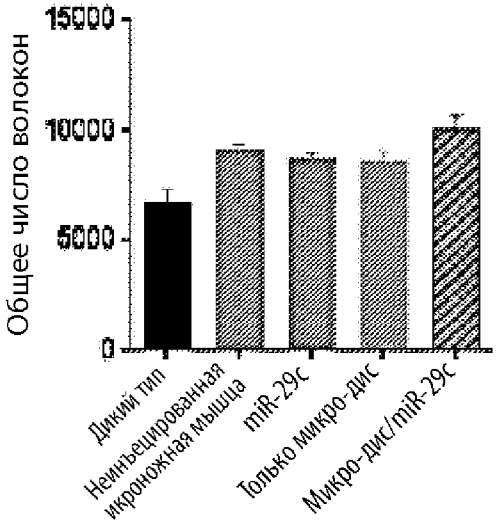
Фиг. 9D

Общая площадь



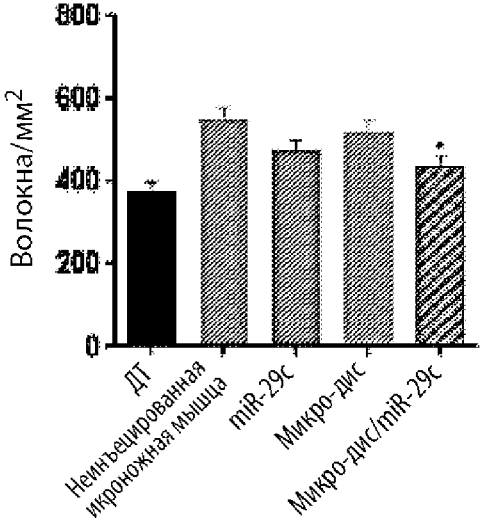
Фиг. 9E

общее число волокон

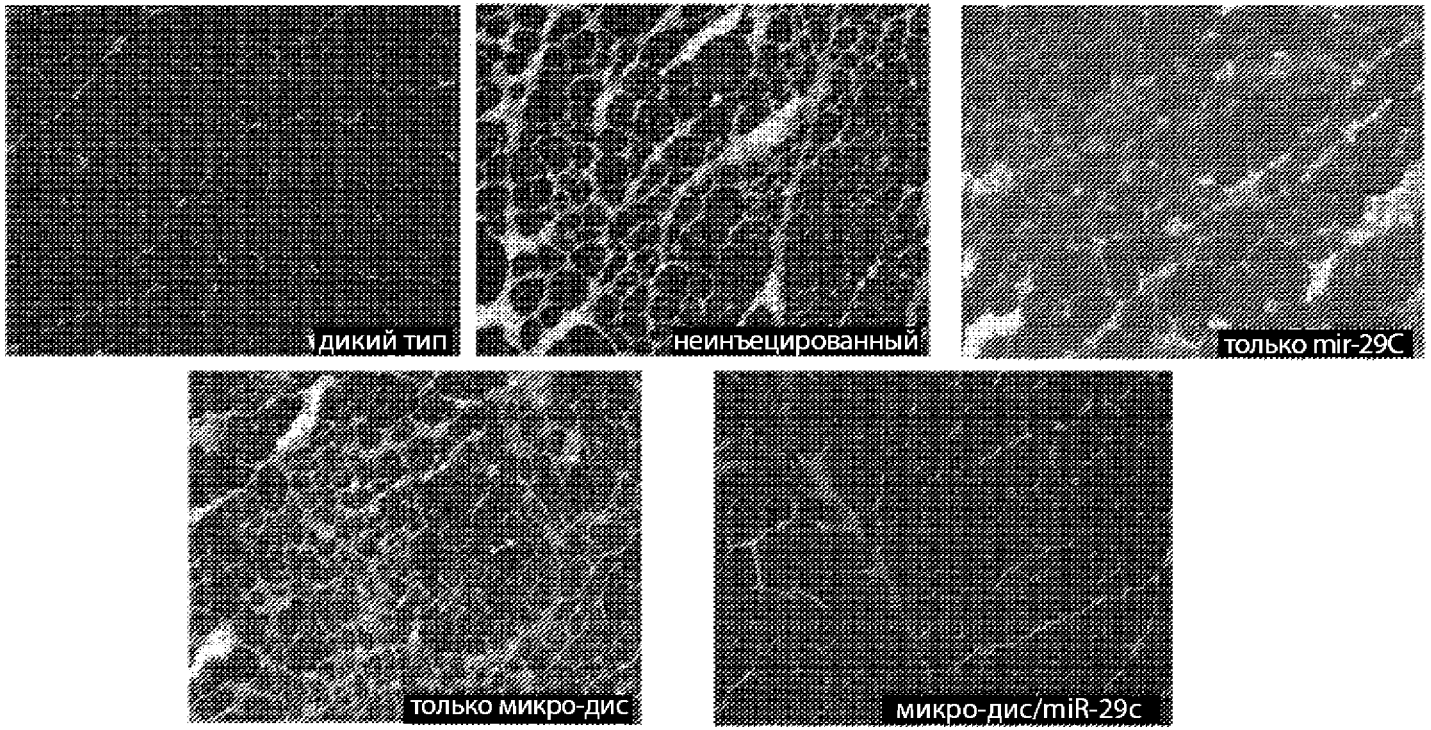


Фиг. 9F

Мышечные волокна/мм^2

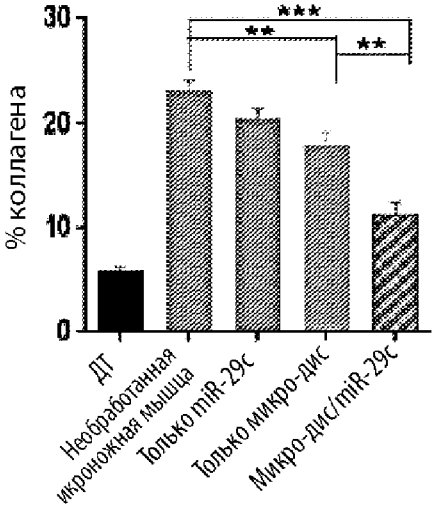


Фиг. 10A


дикий тип
неинъецированный
только mir-29C
только микро-дис
микро-дис/miR-29c

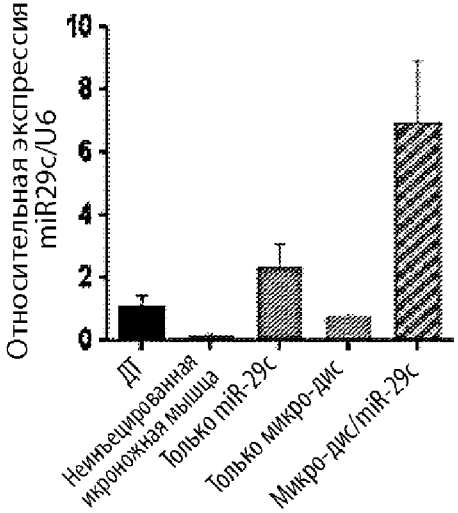
Фиг. 10B

Сириус красный



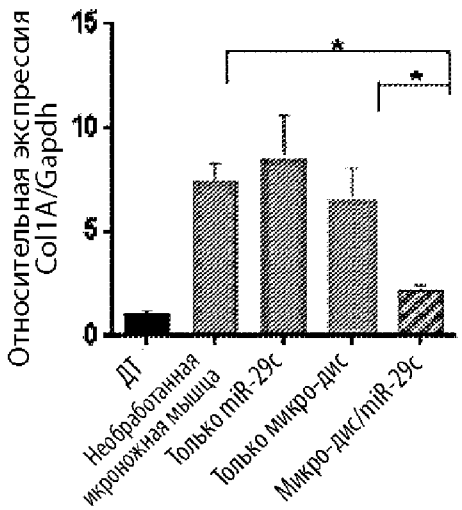
Фиг. 10C

miR-29c



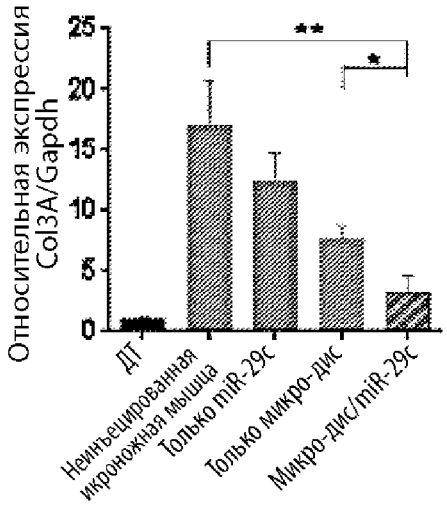
Фиг. 10D

Col1A



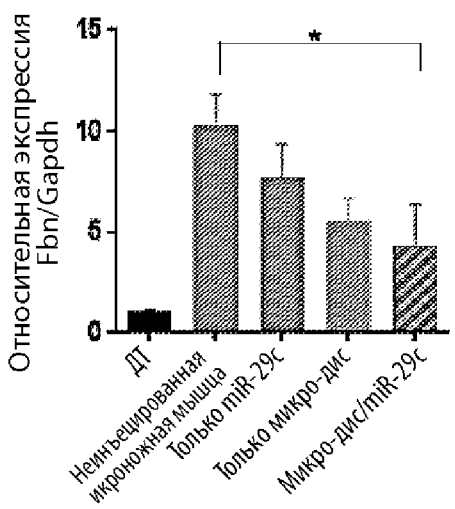
Фиг. 10E

Col13A



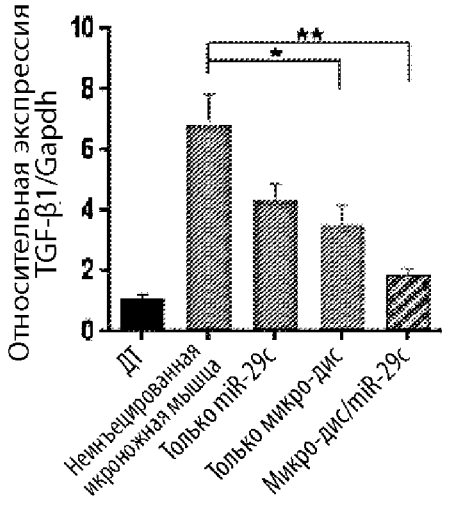
Фиг. 10F

Fbn

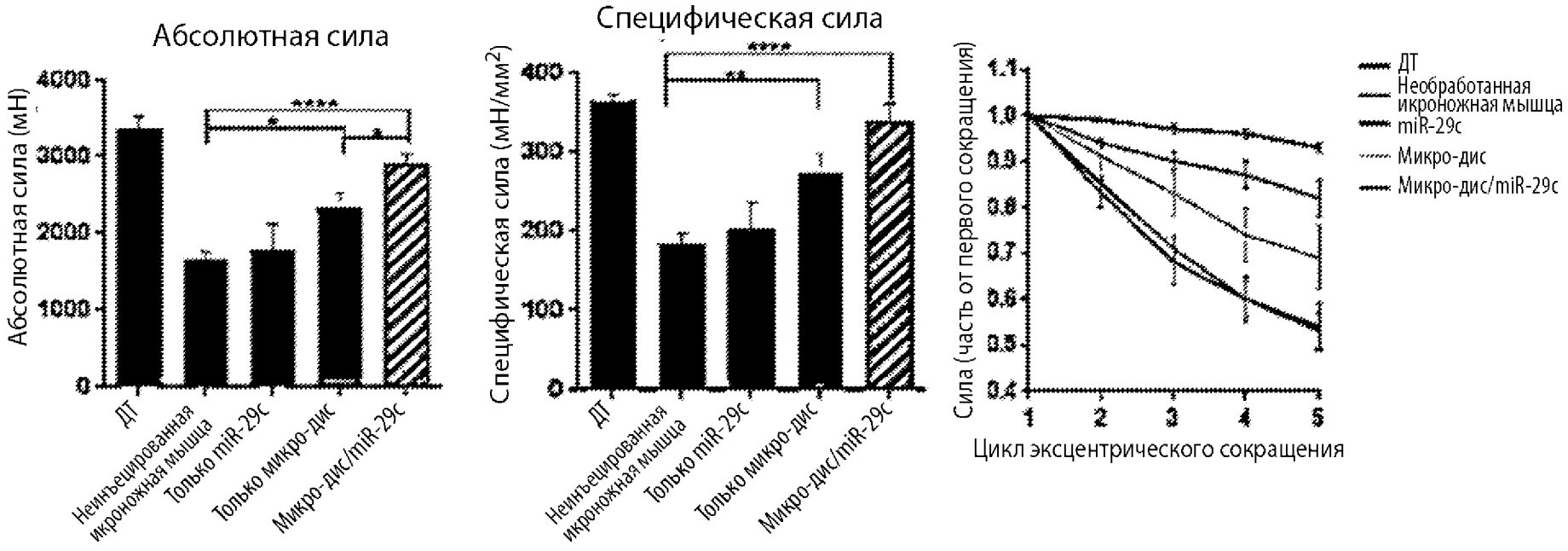


Фиг. 10G

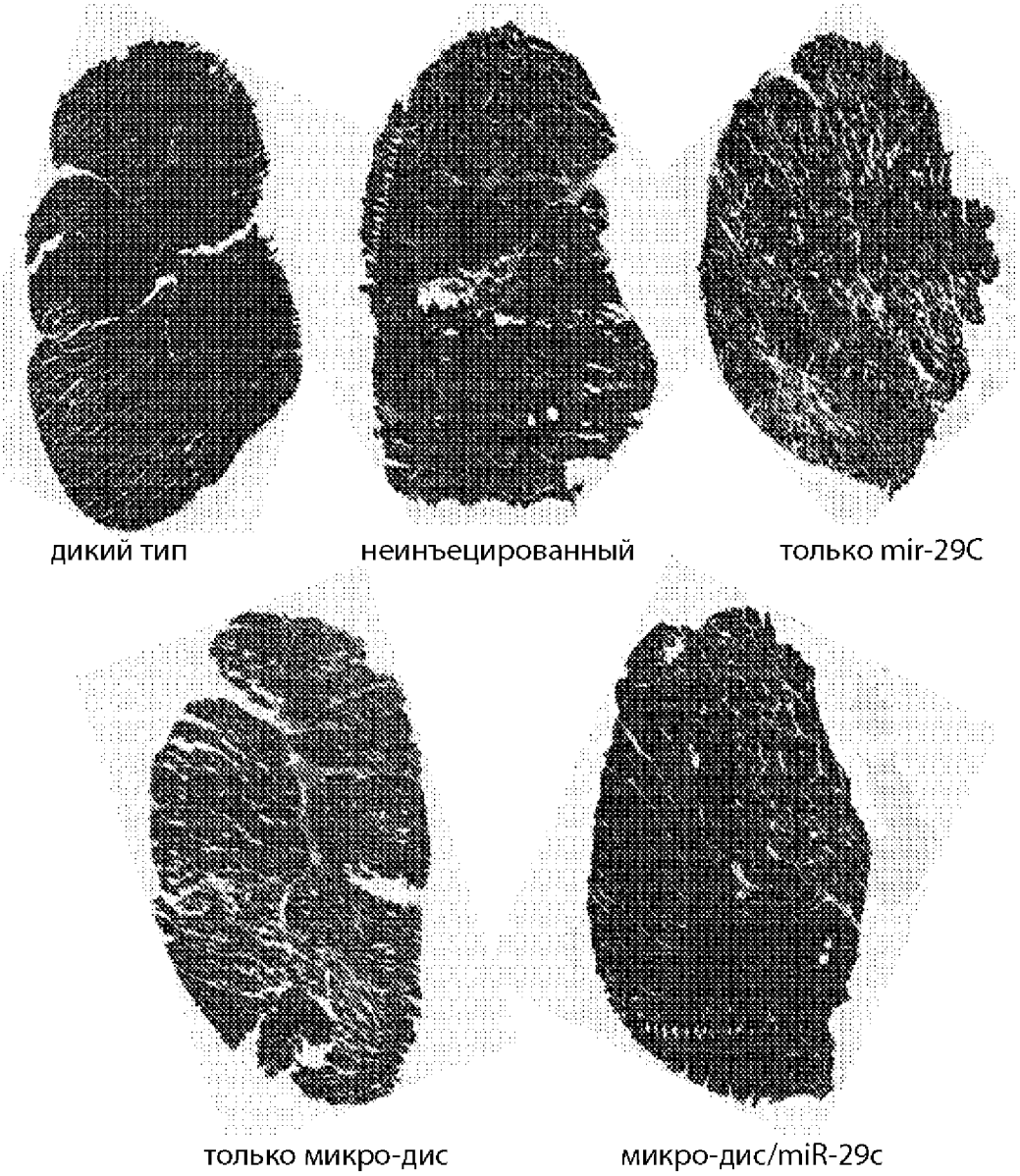
TGF-β1



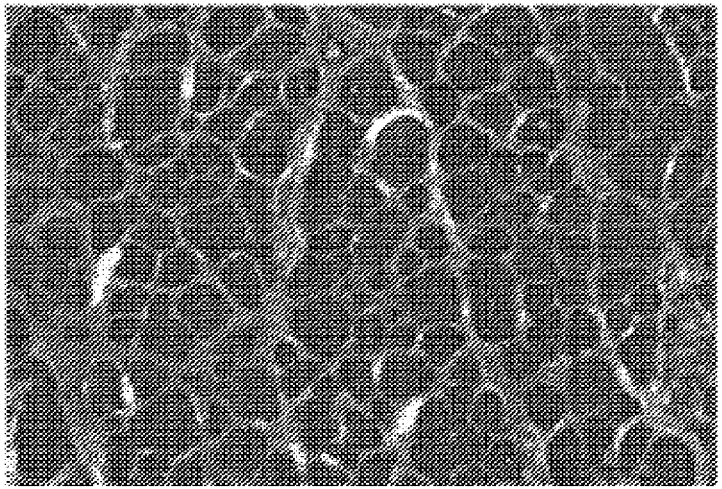
Фиг. 11


Абсолютная сила
Абсолютная сила (мН)
4000
3000
2000
1000
0
****
*
*
ДТ
Неинъецированная икроножная мышца
Только miR-29c
Только микро-дис
Микро-дис/miR-29c
Специфическая сила
Специфическая сила (мН/мм2)
400
300
200
100
0
****
**
ДТ
Неинъецированная икроножная мышца
Только miR-29c
Только микро-дис
Микро-дис/miR-29c
Сила (часть от первого сокращения)
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
1
2
3
4
5
Цикл эксцентрического сокращения
ДТ
Необработанная икроножная мышца
miR-29c
Микро-дис
Микро-дис/miR-29c

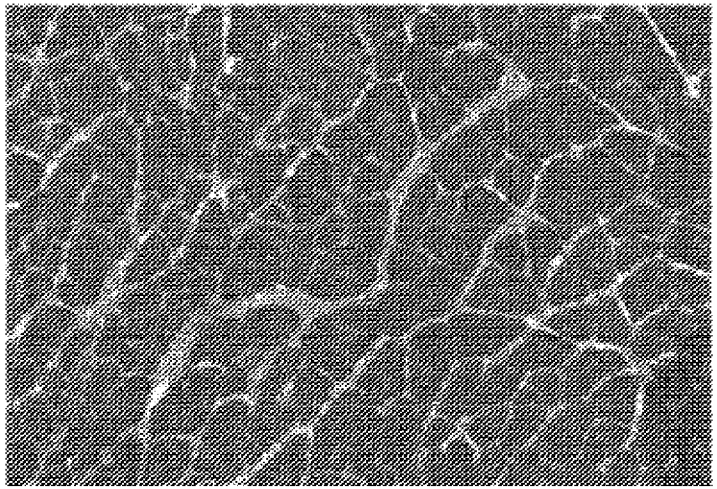
Фиг. 12


дикий тип
неинъецированный
только mir-29C
только микро-дис
микро-дис/miR-29c

Фиг. 13A

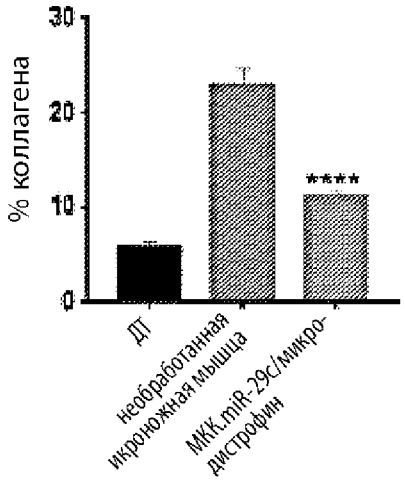


Необработанный

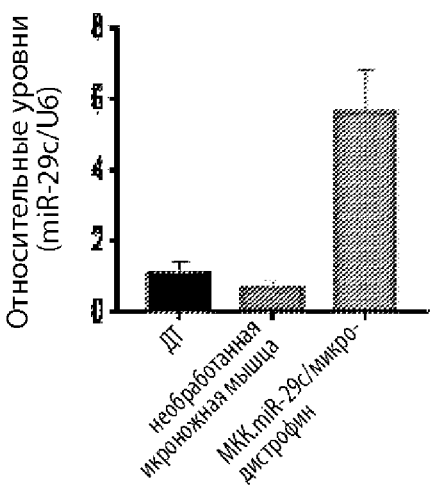


МКК.miR-29c/микро-дистрофин

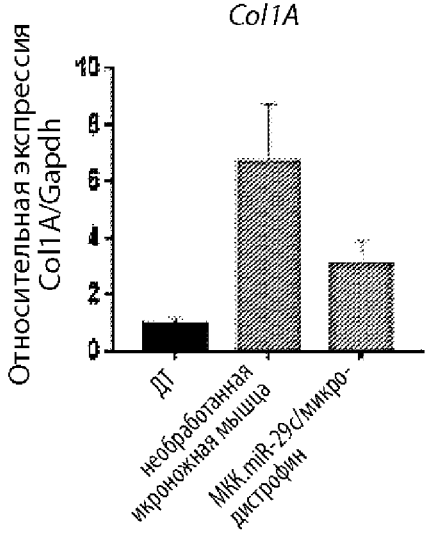
Фиг. 13B



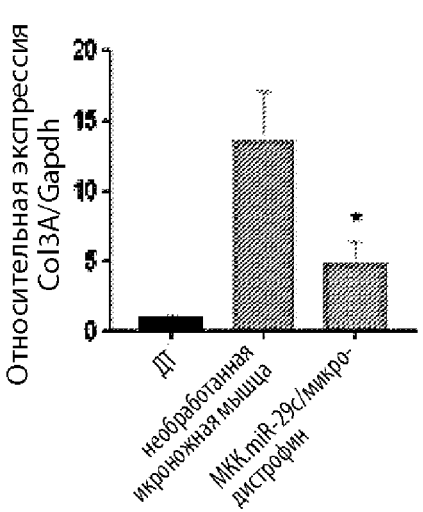
Фиг. 13C



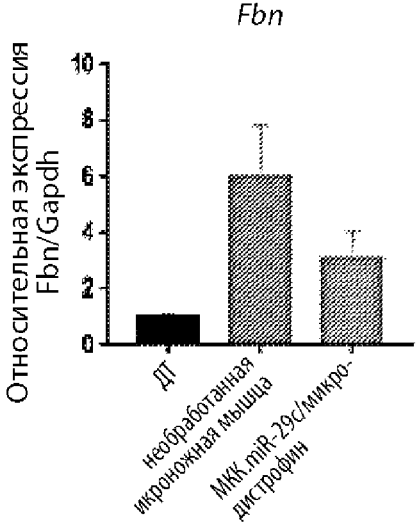
Фиг. 13D



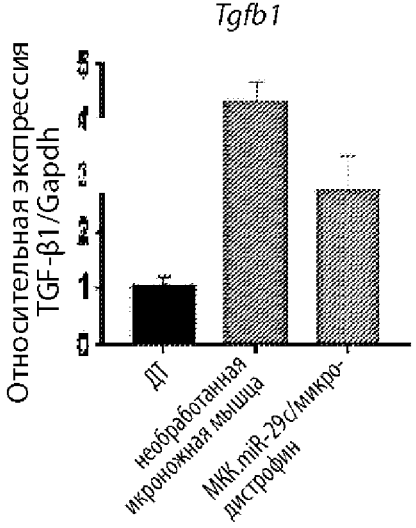
Фиг. 13E



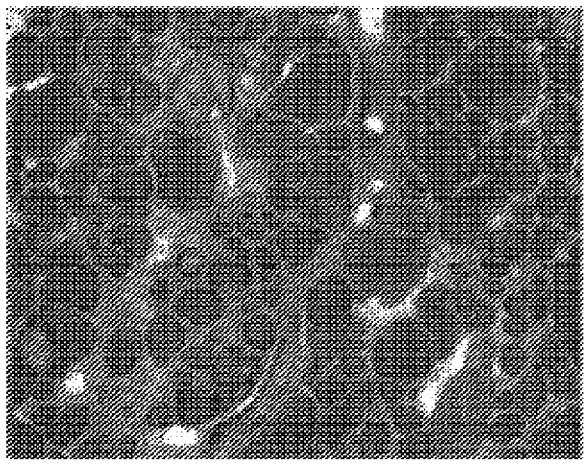
Фиг. 13F



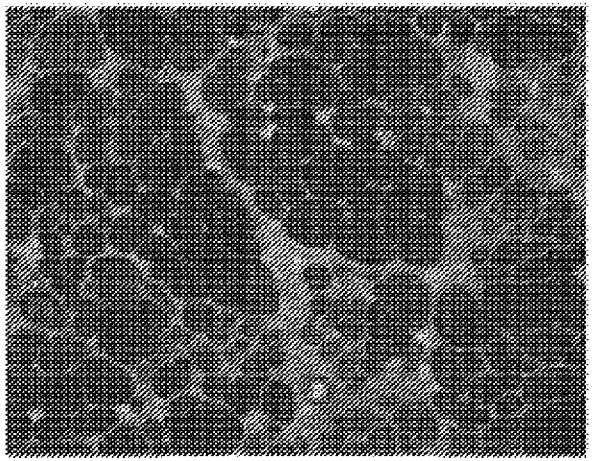
Фиг. 13G



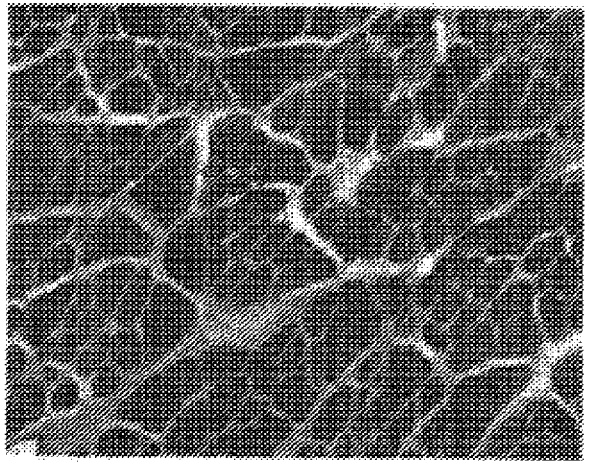
Фиг. 14



Необработанный



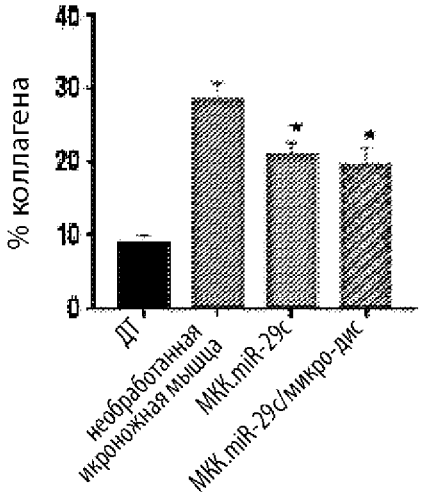
МКК.miR-29c



МКК.miR-29c/микро-дистрофин

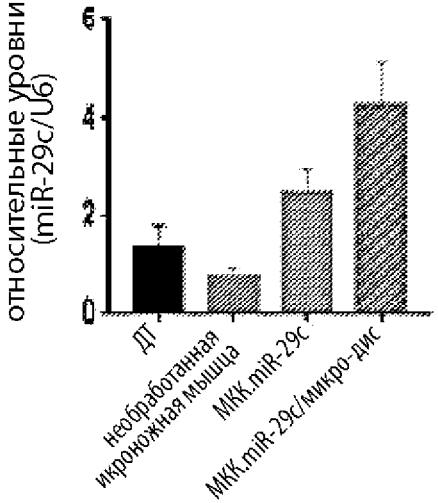
Фиг. 14B

Сириус красный



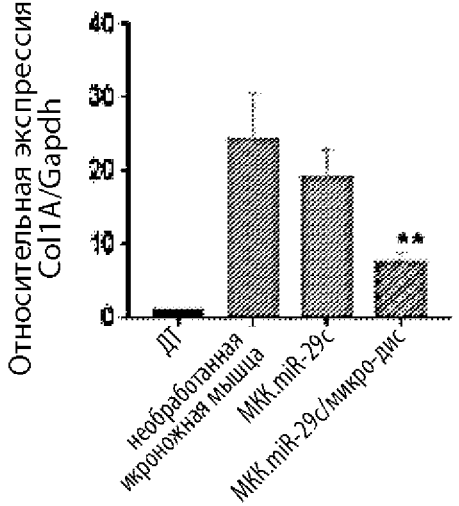
Фиг. 14C

Уровни miR-29c



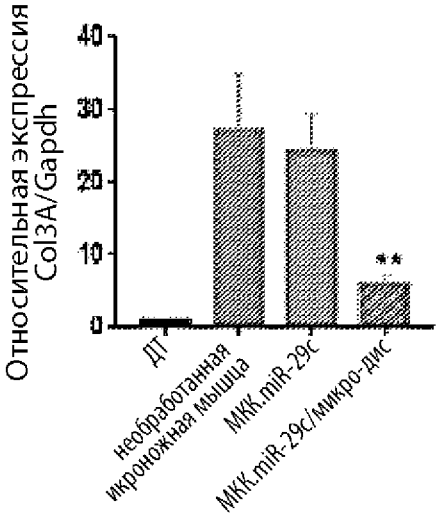
Фиг. 14D

Col1A



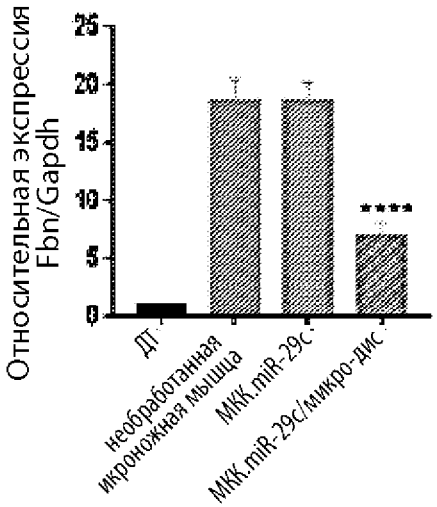
Фиг. 14E

Col13A



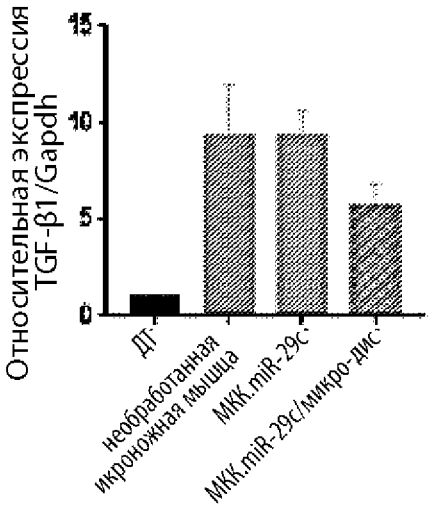
Фиг. 14F

Fbn

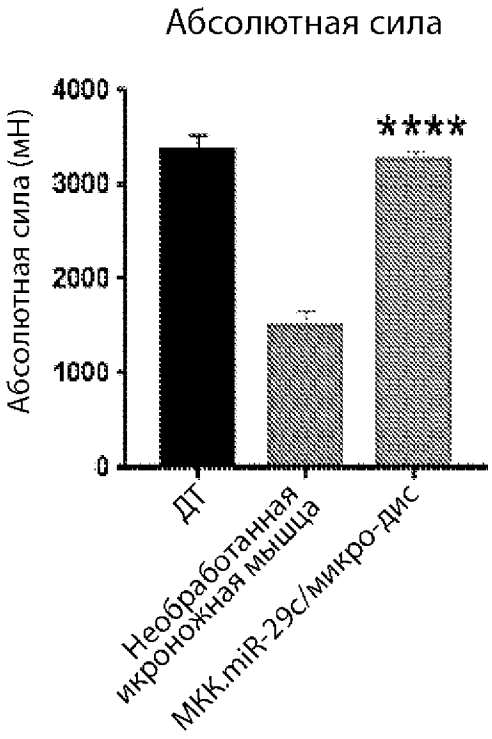


Фиг. 14G

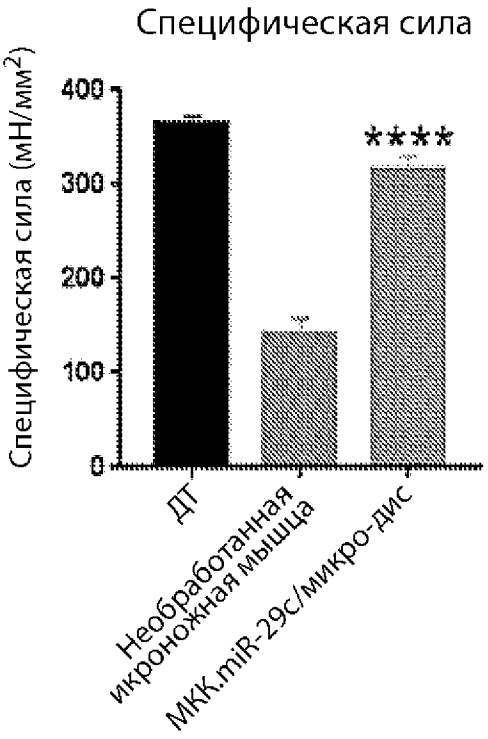
Tgfb1



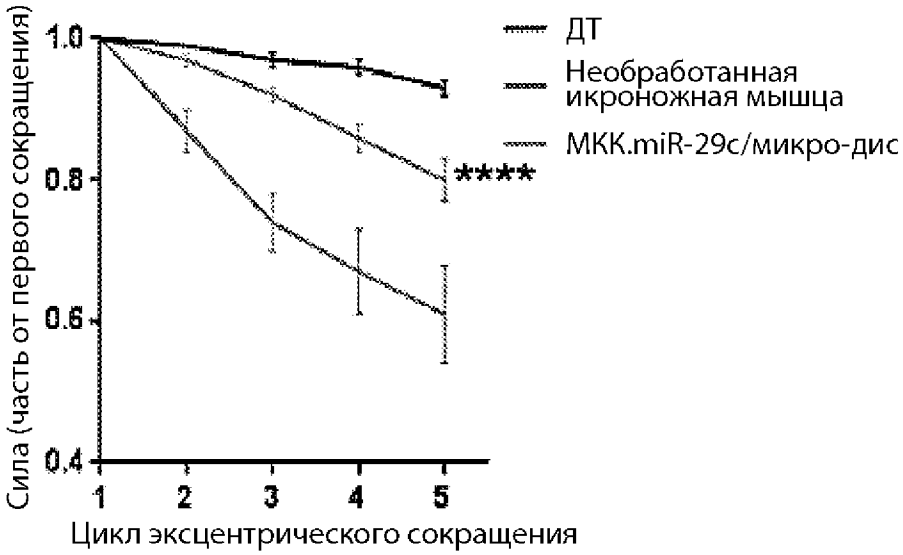
Фиг. 15A



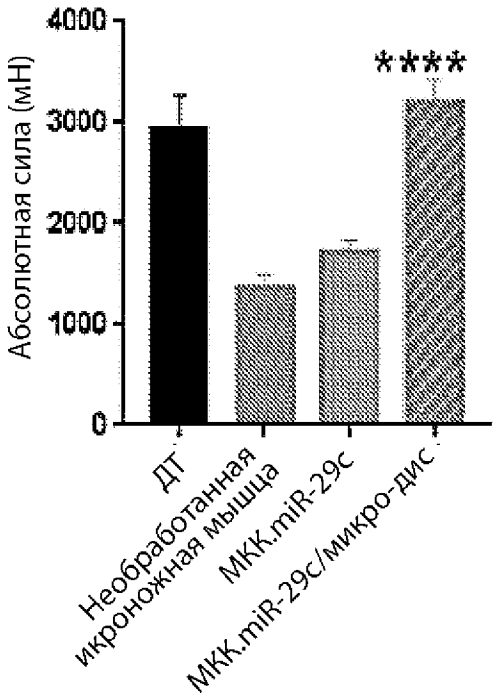
Фиг. 15B



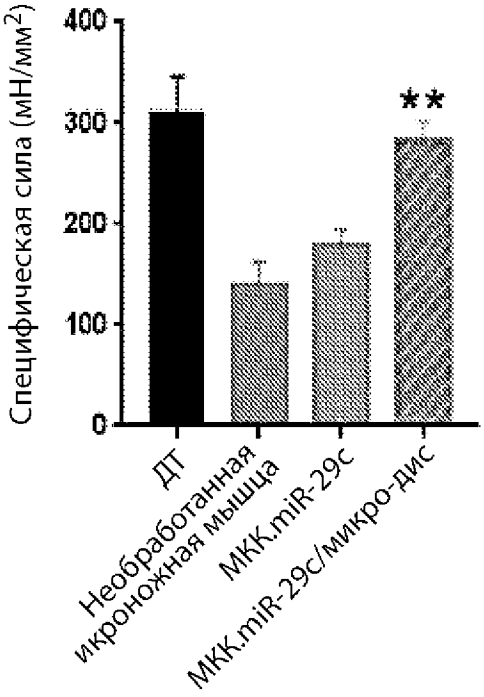
Фиг. 15C



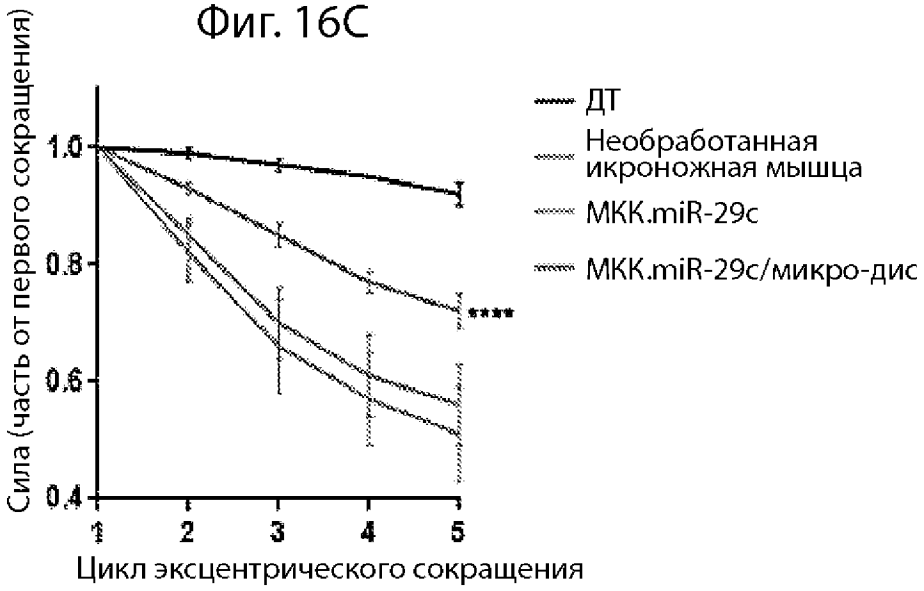
Фиг. 16A



Фиг. 16B

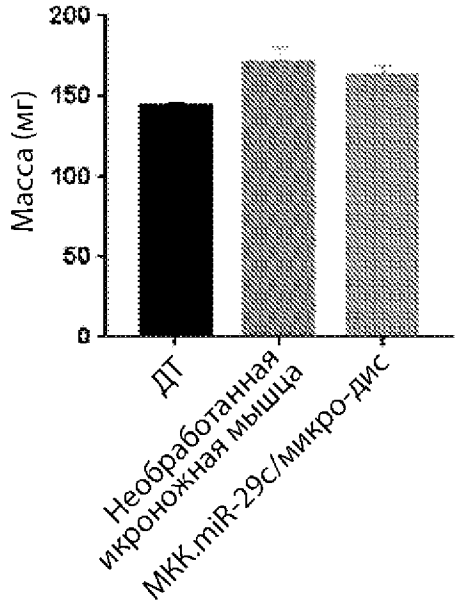


Фиг. 16C



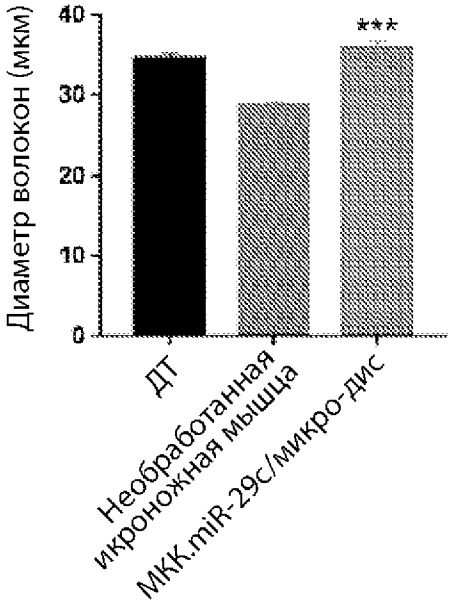
Фиг. 17A

Массы икроножных мышц



Фиг. 17B

Диаметр волокна

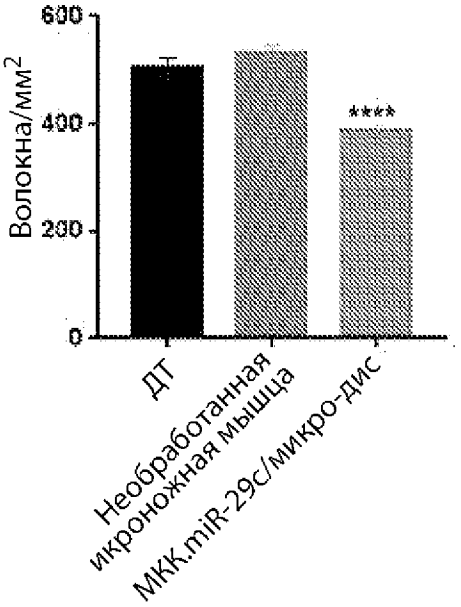


Фиг. 17C

Гистограмма всех диаметров

Фиг. 17D

Количество волокон/мм^2



Фиг. 18A

Последовательность pAAV.CMV.miR29C (SEQ ID NO: 1)

Основные характеристики:
Промотор ЦМВ – 120-526
Интрон EF1a – 927-1087, 1380-1854
miR-29c- 1257-1284
мшРНК-miR29-c с первичной затравочной последовательностью – 1088-1375
PolyA- 1896-2091

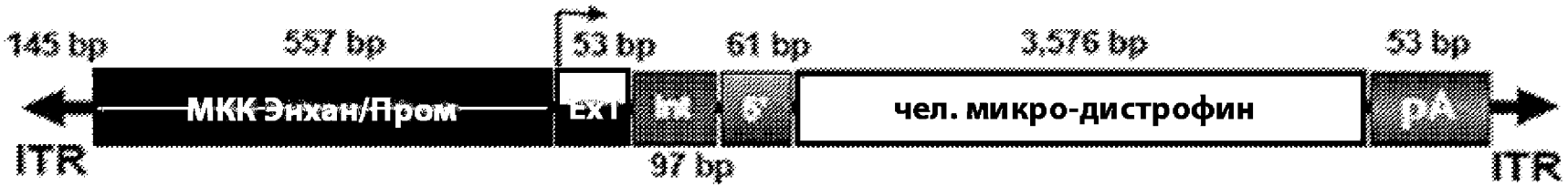
CAGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCG
GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGGGTTAAACTCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCG
CCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGA
CTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCC
AAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGAC
TTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGG
GCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCAC
CAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGG
TGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACC
TCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGGACTCTAGAGGATCCGGTACTCGAGGAACTGAAAAACCAGA
AAGTTAACTGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTTATTTCAGGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCAAATCAAAGAACTG
CTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATTGTAC
CCGGGGCCGATCCACCGGTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCG
CGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAG
AATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGCCTGC
ACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCTTCAGGTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTG
ACAGTGAGCGCAACCGATTTCAAATGGTGCTAGAGTGAAGCCACAGATGTCTAGCACCATTTGAAATCGGTTATG
CCTACTGCCTCGGAATTCAAGGGGCTACTTTAGGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTGCTATCTCTT
TGATACATTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTG
GCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAG
GACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCG
CTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTC
TTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAG
CTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAG
TGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGAAAAGCTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCT
GCGGGGATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACTAGAATGCAGTGAAAAAAATGCT
TTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATT
GCATTCATTTTATGTTTCAGGTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTCACTAGTAGCATGGCTACGTAGATAAGT
AGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTC
GCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAG
CGCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAA
TGGAATTCCAGACGATTGAGCGTCAAAATGTAGGTATTTCCATGAGCGTTTTTCCTGTTGCAATGGCTGGCGGTAA
TATTGTTCTGGATATTACCAGCAAGGCCGATAGTTTGAGTTCTTCTACTCAGGCAAGTGATGTTATTACTAATCAAA
GAAGTATTGCGACAACGGTTAATTTGCGTGATGGACAGACTCTTTTACTCGGTGGCCTCACTGATTATAAAAACAC
TTCTCAGGATTCTGGCGTACCGTTCCTGTCTAAAATCCCTTTAATCGGCCTCCTGTTTAGCTCCCGCTCTGATTCTAA
CGAGGAAAGCACGTTATACGTGCTCGTCAAAGCAAC

Фиг. 18B

CATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTG
CCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCT
AAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGAT
GGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTG
GACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTT
CGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATT
TAAATATTTGCTTATACAATCTTCCTGTTTTTGGGGCTTTTCTGATTATCAACCGGGGTACATATGATTGACATGCTA
GTTTTACGATTACCGTTCATCGATTCTCTTGTTTGCTCCAGACTCTCAGGCAATGACCTGATAGCCTTTGTAGAGACC
TCTCAAAAATAGCTACCCTCTCCGGCATGAATTTATCAGCTAGAACGGTTGAATATCATATTGATGGTGATTTGACT
GTCTCCGGCCTTTCTCACCCGTTTGAATCTTTACCTACACATTACTCAGGCATTGCATTTAAAATATATGAGGGTTCT
AAAAATTTTTATCCTTGCGTTGAAATAAAGGCTTCTCCCGCAAAAGTATTACAGGGTCATAATGTTTTTGGTACAAC
CGATTTAGCTTTATGCTCTGAGGCTTTATTGCTTAATTTTGCTAATTCTTTGCCTTGCCTGTATGATTTATTGGATGTT
GGAATTCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAA
TCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCT
GCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCACCGTCATCA
CCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTT
AGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATG
TATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATT
TCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAA
AAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGA
GTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATT
GACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACA
GAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCG
GCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTA
ACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTA
GCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACT
GGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAAT
CTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAG
TTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGA
TTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAA
GGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCA
GACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAA
ACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGC
AGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGC
CTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGA
CTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGG
AGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGA
AAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAAC
GCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGG
GCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATG
TTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAG
CCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCG
CGCGTTGGCCGATTCATTAATG

Фиг. 19

Figure 19



Фиг. 20A

SEQ ID NO: 9

Основные характеристики:

Промотор MKK

Химерная интронная последовательность

Последовательность микро-дистрофина человека

Поли А конец

Устойчивость к ампициллину

Каркас плазмиды pGEX с точкой начала репликации pBR322

GCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGC
GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTT
GGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCAT
CACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTAATTATCTACGTAGCC
ATGTCTAGACAGCCACTATGGGTCTAGGCTGCCCATGTAAGGAGGCAAGGCCTGGG
GACACCCGAGATGCCTGGTTATAATTAACCCAGACATGTGGCTGCTCCCCCCCCCCA
ACACCTGCTGCCTGAGCCTCACCCCCACCCCGGTGCCTGGGTCTTAGGCTCTGTACA
CCATGGAGGAGAAGCTCGCTCTAAAAATAACCCTGTCCCTGGTGGGCTGTGGGGGA
CTGAGGGCAGGCTGTAACAGGCTTGGGGGCCAGGGCTTATACGTGCCTGGGACTCC
CAAAGTATTACTGTTCCATGTTCCCGGCGAAGGGCCAGCTGTCCCCCGCCAGCTAGA
CTCAGCACTTAGTTTAGGAACCAGTGAGCAAGTCAGCCCTTGGGGCAGCCCATACA
AGGCCATGGGGCTGGGCAAGCTGCACGCCTGGGTCCGGGGTGGGCACGGTGCCCGG
GCAACGAGCTGAAAGCTCATCTGCTCTCAGGGGCCCCTCCCTGGGGACAGCCCCTCC
TGGCTAGTCACACCCTGTAGGCTCCTCTATATAACCCAGGGGCACAGGGGCTGCCCC
CGGGTCACCACCACCTCCACAGCACAGACAGACACTCAGGAGCCAGCCAGCCAGGT
AAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTTATTTCAGGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCAAATCAA
AGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTTACTT
CTGCTCTAAAAGCTGCGGAATTGTACCCGCGGCCGCCACCATGCTGTGGTGGGAGG
AGGTGGAGGATTGTTATGAAAGGGAGGACGTGCAGAAGAAGACTTTTACCAAGTGG
GTGAACGCTCAGTTCAGCAAATTTGGGAAGCAGCACATCGAGAATCTGTTTTCCGAC
CTGCAGGATGGGAGACGGCTGCTGGATCTGCTGGAAGGACTGACTGGCCAGAAGCT
GCCCAAAGAGAAGGGGAGCACTAGGGTGCACGCCCTGAACAACGTGAACAAAGCT
CTGAGAGTGCTGCAGAACAACAACGTGGATCTGGTGAATATTGGCAGTACTGATAT
CGTGGACGGGAACCACAAACTGACACTGGGCCTGATCTGGAACATTATTCTGCACTG
GCAGGTGAAAAATGTGATGAAGAACATCATGGCCGGGCTGCAGCAGACCAATTCCG
AGAAGATCCTGCTGTCTTGGGTGCGGCAGAGCACCCGCAACTATCCCCAGGTGAAC
GTGATTAACTTCACTACATCCTGGAGCGACGGGCTGGCCCTGAATGCTCTGATTCAC
AGCCACAGGCCTGATCTGTTCGACTGGAATAGCGTGGTGTGCCAGCAGTCTGCCACA
CAGCGCCTGGAACATGCCTTCAATATCGCTCGGTACCAGCTGGGGATCGAAAAACT
GCTGGACCCAGAGGATGTGGACACTACATACCCAGATAAAAAGTCTATTCTGATGT
ACATTACTAGCCTGTTCCAGGTGCTGCCACAGCAGGTGTCTATTGAAGCCATTCAGG
AGGTGGAAATGCTGCCCCGCCCCCCCAAAGTGACTAAAGAGGAGCATTTTCAGCTG
CATCATCAGATGCATTACAGCCAGCAGATTACCGTGAGCCTGGCTCAGGGATATGA
GCGCACCAGTAGTCCAAAACCACGGTTCAAGTCCTACGCTTATAC

Фиг. 20B

CCAGGCTGCCTACGTGACAACTAGCGACCCTACTAGATCCCCCTTTCCATCCCAGCA
CCTGGAGGCCCCAGAGGACAAGAGCTTTGGGTCCAGCCTGATGG
AAAGCGAGGTGAATCTGGATCGGTACCAGACAGCCCTGGAGGAGGTGCTGAGCTGG
CTGCTGAGTGCTGAAGACACACTGCAGGCCCAGGGCGAAATTTCCAATGACGTGGA
AGTGGTGAAGGATCAGTTCCACACACACGAGGGCTATATGATGGACCTGACAGCTC
ACCAGGGGCGCGTGGGCAATATCCTGCAGCTGGGCTCTAAACTGATCGGCACCGGG
AAACTGAGTGAGGACGAGGAAACAGAAGTGCAGGAGCAGATGAACCTGCTGAACA
GCCGCTGGGAGTGTCTGAGAGTGGCTAGTATGGAGAAGCAGTCCAACCTGCACCGG
GTGCTGATGGACCTGCAGAACCAGAAACTGAAAGAGCTGAACGACTGGCTGACAAA
GACTGAGGAACGCACAAGGAAGATGGAGGAGGAGCCACTGGGACCCGACCTGGAG
GATCTGAAGAGACAGGTGCAGCAGCATAAGGTGCTGCAGGAGGATCTGGAACAGG
AGCAGGTGCGGGTGAACTCCCTGACACATATGGTGGTGGTGGTGGACGAATCTAGT
GGAGATCACGCCACCGCCGCCCTGGAGGAACAGCTGAAGGTGCTGGGGGACCGGTG
GGCCAACATTTGCCGGTGGACCGAGGACAGGTGGGTGCTGCTGCAGGACATCCTGC
TGAAATGGCAGAGGCTGACCGAGGAGCAGTGTCTGTTTAGTGCTTGGCTGAGCGAG
AAAGAGGACGCCGTGAACAAGATCCACACAACCGGCTTTAAGGATCAGAACGAAAT
GCTGTCTAGCCTGCAGAAACTGGCTGTGCTGAAGGCCGATCTGGAGAAAAAGAAGC
AGAGCATGGGCAAACTGTATAGCCTGAAACAGGACCTGCTGAGCACCCTGAAGAAC
AAGAGCGTGACCCAGAAGACAGAAGCCTGGCTGGATAACTTTGCCCGCTGCTGGGA
CAACCTGGTGCAGAAACTGGAGAAAAGTACAGCTCAGATCTCTCAGGCTGTGACCA
CAACCCAGCCTAGCCTGACCCAGACAACCGTGATGGAAACCGTGACCACCGTGACA
ACCCGCGAACAGATCCTGGTGAAACATGCCCAGGAAGAGCTGCCACCTCCACCTCC
CCAGAAGAAGAGAACCCTGGAGCGGCTGCAGGAGCTGCAGGAAGCCACTGACGAA
CTGGACCTGAAGCTGAGGCAGGCCGAAGTGATTAAGGGGTCTTGGCAGCCTGTGGG
CGATCTGCTGATTGATTCCCTGCAGGACCACCTGGAAAAGGTGAAGGCTCTGAGAG
GCGAAATTGCTCCACTGAAGGAGAACGTGAGTCATGTGAACGATCTGGCTAGACAG
CTGACAACACTGGGCATCCAGCTGAGCCCATACAATCTGAGCACACTGGAGGACCT
GAATACCAGGTGGAAGCTGCTGCAGGTGGCTGTGGAAGACCGGGTGCGGCAGCTGC
ATGAGGCCCATCGCGACTTCGGACCAGCCAGCCAGCACTTTCTGAGCACATCCGTGC
AGGGGCCCTGGGAGAGGGCCATTTCTCCCAACAAGGTGCCCTACTATATTAATCACG
AGACCCAGACCACTTGTTGGGACCATCCCAAGATGACAGAACTGTACCAGTCCCTG
GCCGATCTGAACAACGTGAGGTTTAGCGCTTACAGAACCGCTATGAAGCTGAGACG
GCTGCAGAAGGCCCTGTGCCTGGATCTGCTGTCCCTGTCCGCCGCCTGCGATGCCCT
GGATCAGCATAATCTGAAGCAGAACGATCAGCCAATGGATATCCTGCAGATCATCA
ACTGCCTGACCACTATCTACGACAGGCTGGAGCAGGAGCACAACAACCTGGTGAAC
GTGCCTCTGTGCGTGGATATGTGCCTGAACTGGCTGCTGAACGTGTATGACACTGGG
CGCACCGGCCGGATCAGAGTGCTGAGTTTTAAAACTGGGATTATCTCCCTGTGTAAG
GCCCACCTGGAGGACAAGTACAGGTACCTGTTCAAGCAGGTGGCTAGTAGCACTGG
ATTTTGTGACCAGCGCCGCCTGGGACTGCTGCTGCATGATAGTATCCAGATTCCTAG
ACAGCTGGGAGAGGTGGCTAGTTTCGGAGGATCTAACATCGAACCCAGCGTGCGCA
GCTGTTTCCAGTTTGCCAATAACAAACCTGAAATCGAGGCTGCTCTGTTCCTGGATT
GGATGCGCCTGGAACCACAGAGCATGGTGTGGCTGCCTGTGCTGCACAGAGTGG

Фиг. 20C

CTGCCGCCGAAACTGCCAAGCACCAGGCTAAATGCAACATCTGCAAGGAATGTCCC
ATTATCGGCTTTCGCTACAGGAGTCTGAAACATTTTAACTACGAT
ATTTGCCAGAGCTGCTTCTTTTCCGGAAGAGTGGCCAAAGGACACAAGATGCACTAC
CCTATGGTGGAATATTGCACCCCAACTACATCTGGCGAAGATGTGCGCGATTTTGCC
AAGGTGCTGAAGAATAAGTTTCGGACTAAGAGGTACTTCGCCAAGCACCCCCGCAT
GGGGTATCTGCCAGTGCAGACAGTGCTGGAAGGAGACAATATGGAGACCGATACAA
TGTGAGCGGCCGCAATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTG
TGTGTCTAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACA
AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG
AGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTG
AGCGAGCGAGCGCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTT
CCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGAAGTTCCAGACGATTGAGCGTCAA
AATGTAGGTATTTCCATGAGCGTTTTTCCTGTTGCAATGGCTGGCGGTAATATTGTTC
TGGATATTACCAGCAAGGCCGATAGTTTGAGTTCTTCTACTCAGGCAAGTGATGTTA
TTACTAATCAAAGAAGTATTGCGACAACGGTTAATTTGCGTGATGGACAGACTCTTT
TACTCGGTGGCCTCACTGATTATAAAAACACTTCTCAGGATTCTGGCGTACCGTTCCT
GTCTAAAATCCCTTTAATCGGCCTCCTGTTTAGCTCCCGCTCTGATTCTAACGAGGAA
AGCACGTTATACGTGCTCGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATT
AAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCC
TAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCC
CGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGATTTACGGCAC
CTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGA
TAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGT
TCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGAT
TTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGC
GAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTAAATATTTGCTTATACAATCTTCCTG
TTTTTGGGGCTTTTCTGATTATCAACCGGGGTACATATGATTGACATGCTAGTTTTAC
GATTACCGTTCATCGATTCTCTTGTTTGCTCCAGACTCTCAGGCAATGACCTGATAGC
CTTTGTAGAGACCTCTCAAAAATAGCTACCCTCTCCGGCATGAATTTATCAGCTAGA
ACGGTTGAATATCATATTGATGGTGATTTGACTGTCTCCGGCCTTTCTCACCCGTTTG
AATCTTTACCTACACATTACTCAGGCATTGCATTTAAAATATATGAGGGTTCTAAAA
ATTTTTATCCTTGCGTTGAAATAAAGGCTTCTCCCGCAAAAGTATTACAGGGTCATA
ATGTTTTTGGTACAACCGATTTAGCTTTATGCTCTGAGGCTTTATTGCTTAATTTTGCT
AATTCTTTGCCTTGCCTGTATGATTTATTGGATGTTGGAAGTTCCTGATGCGGTATTT
TCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAATC
TGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCG
CCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCC
GGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAA
GGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAG
ACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCT
AAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAAT
AATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTT

Фиг. 20D

ATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGA
AAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTAC
ATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGT
TTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTG
ACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTG
AGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTA
TGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACG
ATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAC
TCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTG
ACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAA
CTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTT
GCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCT
GGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAA
GCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACG
AAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAG
ACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAG
GATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTT
TTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCC
TTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGT
GGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAG
CAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTT
CAAGAACTCTGTAGCACCGCGTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGC
TGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACC
GGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGG
AGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCC
ACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAA
CAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCT
GTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGG
CGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGC
TGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTA
TTACCGGGTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGC
GAGTCAGTGAGCGACCAAGCGGAAGAGC

Фиг. 21A

SEQ ID NO: 7 : ген микро-дистрофина человека

ATGCTGTGGTGGGAGGAGGTGGAGGATTGTTATGAAAGGGAGGACGTGCAGAAGA
AGACTTTTACCAAGTGGGTGAACGCTCAGTTCAGCAAATTTGGGAAGCAGCACATC
GAGAATCTGTTTTCCGACCTGCAGGATGGGAGACGGCTGCTGGATCTGCTGGAAGG
ACTGACTGGCCAGAAGCTGCCCAAAGAGAAGGGGAGCACTAGGGTGCACGCCCTGA
ACAACGTGAACAAAGCTCTGAGAGTGCTGCAGAACAACAACGTGGATCTGGTGAAT
ATTGGCAGTACTGATATCGTGGACGGGAACCACAAACTGACACTGGGCCTGATCTG
GAACATTATTCTGCACTGGCAGGTGAAAAATGTGATGAAGAACATCATGGCCGGGC
TGCAGCAGACCAATTCCGAGAAGATCCTGCTGTCTTGGGTGCGGCAGAGCACCCGC
AACTATCCCCAGGTGAACGTGATTAACTTCACTACATCCTGGAGCGACGGGCTGGCC
CTGAATGCTCTGATTCACAGCCACAGGCCTGATCTGTTCGACTGGAATAGCGTGGTG
TGCCAGCAGTCTGCCACACAGCGCCTGGAACATGCCTTCAATATCGCTCGGTACCAG
CTGGGGATCGAAAAACTGCTGGACCCAGAGGATGTGGACACTACATACCCAGATAA
AAAGTCTATTCTGATGTACATTACTAGCCTGTTCCAGGTGCTGCCACAGCAGGTGTC
TATTGAAGCCATTCAGGAGGTGGAAATGCTGCCCCGCCCCCCCAAAGTGACTAAAG
AGGAGCATTTTCAGCTGCATCATCAGATGCATTACAGCCAGCAGATTACCGTGAGCC
TGGCTCAGGGATATGAGCGCACCAGTAGTCCAAAACCACGGTTCAAGTCCTACGCTT
ATACCCAGGCTGCCTACGTGACAACTAGCGACCCTACTAGATCCCCCTTTCCATCCC
AGCACCTGGAGGCCCCAGAGGACAAGAGCTTTGGGTCCAGCCTGATGGAAAGCGAG
GTGAATCTGGATCGGTACCAGACAGCCCTGGAGGAGGTGCTGAGCTGGCTGCTGAG
TGCTGAAGACACACTGCAGGCCCAGGGCGAAATTTCCAATGACGTGGAAGTGGTGA
AGGATCAGTTCCACACACACGAGGGCTATATGATGGACCTGACAGCTCACCAGGGG
CGCGTGGGCAATATCCTGCAGCTGGGCTCTAAACTGATCGGCACCGGGAAACTGAG
TGAGGACGAGGAAACAGAAGTGCAGGAGCAGATGAACCTGCTGAACAGCCGCTGG
GAGTGTCTGAGAGTGGCTAGTATGGAGAAGCAGTCCAACCTGCACCGGGTGCTGAT
GGACCTGCAGAACCAGAAACTGAAAGAGCTGAACGACTGGCTGACAAAGACTGAG
GAACGCACAAGGAAGATGGAGGAGGAGCCACTGGGACCCGACCTGGAGGATCTGA
AGAGACAGGTGCAGCAGCATAAGGTGCTGCAGGAGGATCTGGAACAGGAGCAGGT
GCGGGTGAACTCCCTGACACATATGGTGGT

Фиг. 21B

GGTGGTGGACGAATCTAGTGGAGATCACGCCACCGCCGCCCTGGAGGAACAGCTGA
AGGTGCTGGGGGGACCGGTGGGCCAACATTTGCCGGTGGACCGAGGACAGGTGGGTG
CTGCTGCAGGACATCCTGCTGAAATGGCAGAGGCTGACCGAGGAGCAGTGTCTGTTT
AGTGCTTGGCTGAGCGAGAAAGAGGACGCCGTGAACAAGATCCACACAACCGGCTT
TAAGGATCAGAACGAAATGCTGTCTAGCCTGCAGAAACTGGCTGTGCTGAAGGCCG
ATCTGGAGAAAAAGAAGCAGAGCATGGGCAAACTGTATAGCCTGAAACAGGACCTG
CTGAGCACCCTGAAGAACAAGAGCGTGACCCAGAAGACAGAAGCCTGGCTGGATA
ACTTTGCCCGCTGCTGGGACAACCTGGTGCAGAAACTGGAGAAAAGTACAGCTCAG
ATCTCTCAGGCTGTGACCACAACCCAGCCTAGCCTGACCCAGACAACCGTGATGGA
AACCGTGACCACCGTGACAACCCGCGAACAGATCCTGGTGAAACATGCCCAGGAAG
AGCTGCCACCTCCACCTCCCCAGAAGAAGAGAACCCTGGAGCGGCTGCAGGAGCTG
CAGGAAGCCACTGACGAACTGGACCTGAAGCTGAGGCAGGCCGAAGTGATTAAGGG
GTCTTGGCAGCCTGTGGGCGATCTGCTGATTGATTCCCTGCAGGACCACCTGGAAAA
GGTGAAGGCTCTGAGAGGCGAAATTGCTCCACTGAAGGAGAACGTGAGTCATGTGA
ACGATCTGGCTAGACAGCTGACAACACTGGGCATCCAGCTGAGCCCATACAATCTG
AGCACACTGGAGGACCTGAATACCAGGTGGAAGCTGCTGCAGGTGGCTGTGGAAGA
CCGGGTGCGGCAGCTGCATGAGGCCCATCGCGACTTCGGACCAGCCAGCCAGCACT
TTCTGAGCACATCCGTGCAGGGGCCCTGGGAGAGGGCCATTTCTCCCAACAAGGTG
CCCTACTATATTAATCACGAGACCCAGACCACTTGTTGGGACCATCCCAAGATGACA
GAACTGTACCAGTCCCTGGCCGATCTGAACAACGTGAGGTTTAGCGCTTACAGAACC
GCTATGAAGCTGAGACGGCTGCAGAAGGCCCTGTGCCTGGATCTGCTGTCCCTGTCC
GCCGCCTGCGATGCCCTGGATCAGCATAATCTGAAGCAGAACGATCAGCCAATGGA
TATCCTGCAGATCATCAACTGCCTGACCACTATCTACGACAGGCTGGAGCAGGAGC
ACAACAACCTGGTGAACGTGCCTCTGTGCGTGGATATGTGCCTGAACTGGCTGCTGA
ACGTGTATGACACTGGGCGCACCGGCCGGATCAGAGTGCTGAGTTTTAAAACTGGG
ATTATCTCCCTGTGTAAGGCCCACCTGGAGGACAAGTACAGGTACCTGTTCAAGCAG
GTGGCTAGTAGCACTGGATTTTGTGACCAGCGCCGCCTGGGACTGCTGCTGCATGAT
AGTATCCAGATTCCTAGACAGCTGGGAGAGG

Фиг. 21C

TGGCTAGTTTCGGAGGATCTAACATCGAACCCAGCGTGCGCAGCTGTTTCCAGTTTG
CCAATAACAAACCTGAAATCGAGGCTGCTCTGTTCCTGGATTGGATGCGCCTGGAAC
CACAGAGCATGGTGTGGCTGCCTGTGCTGCACAGAGTGGCTGCCGCCGAAACTGCC
AAGCACCAGGCTAAATGCAACATCTGCAAGGAATGTCCCATTATCGGCTTTCGCTAC
AGGAGTCTGAAACATTTTAACTACGATATTTGCCAGAGCTGCTTCTTTTCCGGAAGA
GTGGCCAAAGGACACAAGATGCACTACCCTATGGTGGAATATTGCACCCCAACTAC
ATCTGGCGAAGATGTGCGCGATTTTGCCAAGGTGCTGAAGAATAAGTTTCGGACTAA
GAGGTACTTCGCCAAGCACCCCCGCATGGGGTATCTGCCAGTGCAGACAGTGCTGG
AAGGAGACAATATGGAGACCGATACAATGTGAGC

Фиг. 22А

Последовательность pAAV.MKK.miR29C (SEQ ID NO: 12)

Основные характеристики:
Энхансер МКК- 190-395 (SEQ ID NO: 10)
Промотор МКК- 396-753 (SEQ ID NO: 11)
интрон EF1a - 1155-1315, 1609-2083
miR-29c-1487-1512
мшРНК-miR29-c с первичной затравочной последовательностью – 1316-1608
SV40 PolyA- 2094-2146

CTGNNNNNNGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTC
GGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG
GCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTAATTA
TCTACGTAGCCATGTCTAGACAGCCACTATGGGTCTAGGCTGCCCATGTAAGGAGGC
AAGGCCTGGGGACACCCGAGATGCCTGGTTATAATTAACCCAGACATGTGGCTGCTC
CCCCCCCCCAACACCTGCTGCCTGAGCCTCACCCCCACCCCGGTGCCTGGGTCTTAG
GCTCTGTACACCATGGAGGAGAAGCTCGCTCTAAAAATAACCCTGTCCCTGGTGGGC
TGTGGGGGACTGAGGGCAGGCTGTAACAGGCTTGGGGGCCAGGGCTTATACGTGCC
TGGGACTCCCAAAGTATTACTGTTCCATGTTCCCGGCGAAGGGCCAGCTGTCCCCCG
CCAGCTAGACTCAGCACTTAGTTTAGGAACCAGTGAGCAAGTCAGCCCTTGGGGCA
GCCCATACAAGGCCATGGGGCTGGGCAAGCTGCACGCCTGGGTCCGGGGTGGGCAC
GGTGCCCGGGCAACGAGCTGAAAGCTCATCTGCTCTCAGGGGCCCCTCCCTGGGGA
CAGCCCCTCCTGGCTAGTCACACCCTGTAGGCTCCTCTATATAACCCAGGGGCACAG
GGGCTGCCCCCGGGTCACCACCACCTCCACAGCACAGACAGACACTCAGGAGCCAG
CCAGCCAGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTTATTTCAGGTCCCGGATCCGGTGGTGG
TGCAAATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGG
AAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATTGTACCCGCCTAGAGGATCCGGTAC
TCGAGGAACTGAAAAACCAGAAAGTTAACTGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTTAT
TTCAGGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCAAATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTT
GCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATT
GTACCCGGGGCCGATCCACCGGTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGG
TAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCAC
ATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGT
CTCAAGCTGGCCGGCCTGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGCCTG
CACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCTTCAGGTTAACCCAACAGAAGGCTC
GAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGCAACCGATTTCAAATGGTGCTAGAGT
GAAGCCACAGATGTCTAGCACCATTTGAAATCGGTTATGCCTACTGCCTCGGAATTC
AAGGGGCTACTTTAGGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTGCTATCT
CTTTGATACATTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCC
CCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATG
GCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAG
AGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTC
GCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTT

Фиг. 22B

CTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGA
GTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTA
ATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAG
ACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGAAAAGCTAGTGCGGCC
GCAATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTCTAGAC
ATGGCTACGTAGATAATTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACAAGGAACCCCTAG
TGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGAC
CAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCG
CGCNNNNNNCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAAC
AGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGAAGTTCCAGACGATTGAGCGTCAAAATGTA
GGTATTTCCATGAGCGTTTTTCCTGTTGCAATGGCTGGCGGTAATATTGTTCTGGATA
TTACCAGCAAGGCCGATAGTTTGAGTTCTTCTACTCAGGCAAGTGATGTTATTACTA
ATCAAAGAAGTATTGCGACAACGGTTAATTTGCGTGATGGACAGACTCTTTTACTCG
GTGGCCTCACTGATTATAAAAACACTTCTCAGGATTCTGGCGTACCGTTCCTGTCTA
AAATCCCTTTAATCGGCCTCCTGTTTAGCTCCCGCTCTGATTCTAACGAGGAAAGCA
CGTTATACGTGCTCGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGC
GCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGC
GCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTC
AAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGATTTACGGCACCTCG
ACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGA
CGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCA
AACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTG
CCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAAT
TTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTAAATATTTGCTTATACAATCTTCCTGTTTT
TGGGGCTTTTCTGATTATCAACCGGGGTACATATGATTGACATGCTAGTTTTACGATT
ACCGTTCATCGATTCTCTTGTTTGCTCCAGACTCTCAGGCAATGACCTGATAGCCTTT
GTAGAGACCTCTCAAAAATAGCTACCCTCTCCGGCATGAATTTATCAGCTAGAACGG
TTGAATATCATATTGATGGTGATTTGACTGTCTCCGGCCTTTCTCACCCGTTTGAATC
TTTACCTACACATTACTCAGGCATTGCATTTAAAATATATGAGGGTTCTAAAAATTTT
TATCCTTGCGTTGAAATAAAGGCTTCTCCCGCAAAAGTATTACAGGGTCATAATGTT
TTTGGTACAACCGATTTAGCTTTATGCTCTGAGGCTTTATTGCTTAATTTTGCTAATT
CTTTGCCTTGCCTGTATGATTTATTGGATGTTGGAAGTTCCTGATGCGGTATTTTCTC
CTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCT
CTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCT
GACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGA
GCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGC
CTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGT
CAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAAT
ACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATA
TTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTT
GCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGAT
GCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGG
TAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTT

Фиг. 22C

TTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGA
CGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGA
GTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTAT
GCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGA
TCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTC
GCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGAC
ACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACT
ACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGC
AGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGG
AGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGC
CCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGA
AATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGAC
CAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGA
TCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTC
GTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTT
TTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGT
TTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAG
AGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAA
GAACTCTGTAGCACCGCGTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGC
TGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGA
TAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGC
GAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACG
CTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAG
GAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTC
GGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGG
AGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGG
CCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTAC
CGGGTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGT
CAGTGAGCGACCAAGCGGAAGAGC

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 28335/51908/PC	**FOR FURTHER ACTION**	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US2017/027636	International filing date *(day/month/year)* 14 April 2017	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)* 15 April 2016
Applicant RESEARCH INSTITUTE AT NATIONWIDE CHILDREN'S HOSPITAL		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**

   a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

   ☒ the international application in the language in which it was filed.

   ☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

   b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

   c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ **Certain claims were found unsearchable** (see Box No. II).

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III).

4. With regard to the **title**,

   ☒ the text is approved as submitted by the applicant.

   ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

   ☒ the text is approved as submitted by the applicant.

   ☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the **drawings**,

   a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 1

   ☐ as suggested by the applicant.

   ☒ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

   ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

   b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2017/027636

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☒ forming part of the international application as filed:

      ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NOs:7 and 9 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2017/027636

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 5-23
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2017/027636

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 48/00; A61P 21/00; C07K 14/47; C12N 15/86 (2017.01)
CPC - A61K 38/1719; C07K 14/4708; C07K 14/4716; C12N 15/86; C12N 2750/14143 (2017.02)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC - 424/93.2; 435/320.1; 530/324; 536/23.5 (keyword delimited)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2010/0003218 A1 (DUAN et al) 07 January 2010 (07.01.2010) entire document	1-4
A	US 2008/0249052 A1 (DUAN et al) 09 October 2008 (09.10.2008) entire document	1-4
A	WO 2015/197232 A1 (GENETHON et al) 30 December 2015 (30.12.2015) entire document	1-4
A	US 2014/0256802 A1 (UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION, INC) 11 September 2014 (11.09.2014) entire document	1-4
A	US 2014/0234255 A1 (THE CURATORS OF THE UNIVERSITY OF MISSOURI) 21 August 2014 (21.08.2014) entire document	1-4
A	WO 2015/110449 A1 (VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL et al) 30 July 2015 (30.07.2015) entire document	1-4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 June 2017	05 JUL 2017
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774