

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202092493 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.02.17

(51) Int. Cl. C07K 14/65 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.04.30

(54) КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/664,741; 62/688,640; 62/744,068

(72) Изобретатель:
До Хун, Туске Стивен, Готшал Рассел,
Лю Цэ Фэн (US)

(32) 2018.04.30; 2018.06.22; 2018.10.10

(33) US

(86) PCT/US2019/030076

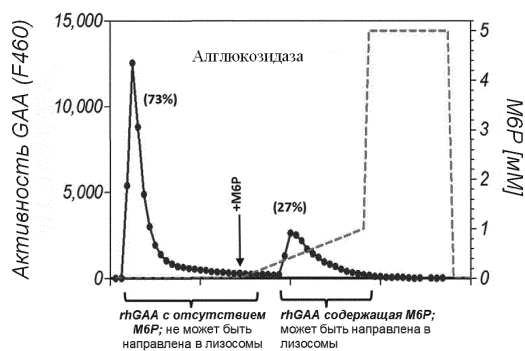
(74) Представитель:
Рыбина Н.А. (RU)

(87) WO 2019/213180 2019.11.07

(71) Заявитель:
АМИКУС ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

(57) В настоящем изобретении предложены улучшенные векторы для генной терапии и способы их применения, в некоторых вариантах осуществления, содержащие последовательности для улучшенной экспрессии и клеточного нацеливания терапевтического белка.

Хроматография с М6Р



A1

202092493

202092493

A1

КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА

[0001] В этой заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке США № 62/664 741, поданной 30 апреля 2018 г.; предварительной заявке США № 62/688 640, поданной 22 июня 2018 г.; и предварительной заявке США № 62/744 068, поданной 10 октября 2018 г., каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Генетические расстройства возникают в результате наследственных мутаций или мутаций *de novo*, происходящих в кодирующих участках гена генома. В некоторых случаях такие генетические расстройства лечат путем введения белка, кодируемого геном, мутировавшим у индивидуума, имеющего генетическое расстройство. Однако такое лечение имеет недостатки, поскольку введение белка не всегда приводит к тому, что белок достигает органов, клеток или органелл там, где он необходим. Кроме того, это лечение также часто требует инфузий раз в две недели, в которых нет необходимости при генной терапии, когда лечение однократной дозой может обеспечить длительное облегчение. Следовательно, генная терапия может предложить лучшие результаты по сравнению с доступными в настоящее время способами лечения генетических расстройств.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] В настоящем документе предлагаются композиции и способы лечения генетических расстройств с использованием генной терапии. В настоящем документе также предложены компоненты вектора для генной терапии и способы, которые будут использоваться в генной терапии для улучшения экспрессии белка и повышения клеточного поглощения или доставки, а также

внутриклеточного или субклеточного нацеливания терапевтических белков, обеспечиваемых векторами для генной терапии.

[0004] В определенных аспектах предложены векторы для генной терапии, например, векторы для генной терапии, содержащие конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую в порядке от 5' до 3': (a) последовательность инициации трансляции и (b) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую терапевтический белок. В некоторых вариантах осуществления, последовательность инициации трансляции содержит последовательность Козак. В некоторых вариантах осуществления, последовательность инициации трансляции и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая терапевтический белок, могут перекрываться, так что последние три нуклеотида последовательности инициации трансляции также являются иницирующим кодоном для терапевтического белка. В некоторых вариантах осуществления, последовательность Козак содержит последовательность AX₁X₂ATGA (SEQ ID NO: 28), где каждый из X₁ и X₂ представляет собой любой нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления X₁ содержит A. В некоторых вариантах осуществления X₂ содержит G. В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 85% идентичную AAGATGA (SEQ ID NO: 29). В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак отличается от последовательности AAGATGA (SEQ ID NO: 29) одним или двумя нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления, последовательность Козак содержит AAGATGA (SEQ ID NO: 29). В некоторых вариантах осуществления, последовательность Козак содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 85% идентичную GCAAGATG (SEQ ID NO: 44), причем последние три нуклеотида (ATG) также являются иницирующим кодоном для терапевтического белка. В некоторых вариантах осуществления, последовательность Козак отличается от последовательности GCAAGATG (SEQ ID NO: 44) одним или двумя нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак содержит GCAAGATG (SEQ ID NO: 44). В некоторых вариантах осуществления последовательность

Козак содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 85% идентичную CACCATG (SEQ ID NO: 47). В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак отличается от последовательности CACCATG (SEQ ID NO: 47) одним или двумя нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак содержит CACCATG (SEQ ID NO: 47). В некоторых вариантах осуществления, конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сигнальный пептид, способный повышать секрецию терапевтического белка по сравнению с терапевтическим белком без сигнального пептида. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид выбран из сигнального пептида, связывающего иммуноглобулин (ViP) и сигнального пептида Gaussia. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид ViP содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13-17. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид отличается от последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 13-17 на 5 или меньше, 4 или меньше, 3 или меньше, 2 или меньше или 1 аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид ViP содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13-17. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид Gaussia содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид отличается от последовательности SEQ ID NO: 32 на 5 или меньше, 4 или меньше, 3 или меньше, 2 или меньше или 1 аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид Gaussia содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления, конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность участка внутренней посадки рибосомы (IRES). В некоторых вариантах осуществления, IRES представляет собой IRES вируса паралича свертка (CrPV). В некоторых вариантах осуществления, IRES содержит

последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления, IRES содержит SEQ ID NO: 12.

[0005] В дополнительных аспектах предложены векторы для генной терапии, содержащие конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую в порядке от 5' до 3': (a) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сигнальный пептид, и (b) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую терапевтический белок, причем сигнальный пептид способен повышать секрецию терапевтического белка по сравнению с терапевтическим белком без сигнального пептида. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид выбран из сигнального пептида, связывающего иммуноглобулин (ViP) и сигнального пептида Gaussia. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид ViP содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13-17. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид отличается от последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 13-17 на 5 или меньше, 4 или меньше, 3 или меньше, 2 или меньше или 1 аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид ViP содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13-17. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид содержит сигнальный пептид Gaussia. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид Gaussia содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид отличается от последовательности SEQ ID NO: 32 на 5 или меньше, 4 или меньше, 3 или меньше, 2 или меньше или 1 аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид Gaussia содержит SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления, конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность инициации трансляции. В некоторых вариантах осуществления, последовательность инициации трансляции содержит последовательность Козак, содержащую AX₁X₂ATGA

(SEQ ID NO: 28), где каждый из X_1 и X_2 представляет собой любой нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления X_1 содержит А. В некоторых вариантах осуществления X_2 содержит G. В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 85% идентичную AAGATGA (SEQ ID NO: 29). В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак отличается от последовательности AAGATGA (SEQ ID NO: 29) одним или двумя нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления, последовательность Козак содержит AAGATGA (SEQ ID NO: 29). В некоторых вариантах осуществления, последовательность Козак содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 85% идентичную GCAAGATG (SEQ ID NO: 44). В некоторых вариантах осуществления, последовательность Козак отличается от последовательности GCAAGATG (SEQ ID NO: 44) одним или двумя нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак содержит GCAAGATG (SEQ ID NO: 44). В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 85% идентичную CACCATG (SEQ ID NO: 47). В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак отличается от последовательности CACCATG (SEQ ID NO: 47) одним или двумя нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак содержит CACCATG (SEQ ID NO: 47). В некоторых вариантах осуществления, конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность участка внутренней посадки рибосомы (IRES). В некоторых вариантах осуществления, IRES содержит IRES, выбранную из группы, состоящей из IRES вируса паралича сверчка (CrPV), IRES пикорнавируса, IRES афтоввируса, IRES вируса герпеса, связанного с саркомой Капоши, IRES гепатита А, IRES гепатита С, IRES пестивируса, IRES крипавируса, IRES вируса *Rhopalosiphum padi* и IRES вируса болезни Мерека. В некоторых вариантах осуществления, IRES содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления, IRES содержит SEQ ID NO: 12.

[0006] В дополнительных аспектах, предложены векторы для генной терапии, содержащие конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую в порядке от 5' до 3': (a) последовательность участка внутренней посадки рибосомы (IRES), и (b) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую терапевтический белок. В некоторых вариантах осуществления, IRES содержит IRES, выбранную из группы, состоящей из IRES вируса паралича сверчка (CrPV), IRES пикорнавируса, IRES афтовируса, IRES вируса герпеса, связанного с саркомой Капоши, IRES гепатита А, IRES гепатита С, IRES пестивируса, IRES крипавируса, IRES вируса *Rhopalosiphum padi* и IRES вируса болезни Мерека. В некоторых вариантах осуществления, IRES представляет собой IRES вируса паралича сверчка (CrPV). В некоторых вариантах осуществления, IRES содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления, IRES содержит SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления, конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность инициации трансляции. В некоторых вариантах осуществления, последовательность инициации трансляции содержит последовательность Козак, содержащую AX₁X₂ATGA (SEQ ID NO: 28), где каждый из X₁ и X₂ представляет собой любой нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления X₁ содержит А. В некоторых вариантах осуществления X₂ содержит G. В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 90% идентичную AAGATGA (SEQ ID NO: 29). В некоторых вариантах осуществления, последовательность Козак содержит AAGATGA (SEQ ID NO: 29). В некоторых вариантах осуществления, последовательность Козак содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 85% идентичную GCAAGATG (SEQ ID NO: 44). В некоторых вариантах осуществления, последовательность Козак отличается от последовательности GCAAGATG (SEQ ID NO: 44) одним или двумя нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак содержит GCAAGATG (SEQ ID NO: 44). В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак содержит последовательность

нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 85% идентичную CACCATG (SEQ ID NO: 47). В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак отличается от последовательности CACCATG (SEQ ID NO: 47) одним или двумя нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак содержит CACCATG (SEQ ID NO: 47). В некоторых вариантах осуществления, конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит сигнальную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сигнальный пептид, способный повышать секрецию терапевтического белка по сравнению с таковой для терапевтического белка без сигнального пептида. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид выбран из сигнального пептида, связывающего иммуноглобулин (BiP) и сигнального пептида Gaussia. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид BiP содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13-17. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид BiP содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13-17. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид Gaussia содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид Gaussia содержит SEQ ID NO: 32.

[0007] В некоторых вариантах осуществления, любая из конструкций нуклеиновой кислоты, представленных в настоящем документе, дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую пептид, который селективно связывается с CI-MPR с высокой аффинностью, причем терапевтический белок и пептид, который селективно связывается с CI-MPR, экспрессируются как слитый белок. В некоторых вариантах осуществления, конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность, кодирующую линкерный пептид между нуклеиновой кислотой, кодирующей пептид, который селективно связывается с нуклеотидной последовательностью CI-MPR, и последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей терапевтический белок. В некоторых вариантах осуществления,

последовательность линкерного пептида может перекрываться с последовательностью терапевтического пептида или последовательностью пептида, который избирательно связывается с CI-MPR, или с обоими. В некоторых вариантах осуществления, пептид, который связывается с CI-MPR с высокой аффинностью, представляет собой пептид варианта IGF2 (vIGF2). В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 способствует захвату в клетки. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-11. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-11. В некоторых вариантах осуществления, нуклеотидная последовательность vIGF2 расположена на 5' относительно последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей терапевтический белок. В некоторых вариантах осуществления, нуклеотидная последовательность vIGF2 расположена на 3' относительно последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей терапевтический белок. В некоторых вариантах осуществления, конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность, кодирующую линкерный пептид между нуклеотидной последовательностью vIGF2 и последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей терапевтический белок. В некоторых вариантах осуществления, линкерный пептид состоит из 5-20 аминокислот, 5-15 аминокислот, 5-10 аминокислот, 8-12 аминокислот или около 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 18-21, SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления, линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 18-21, SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок связан с лизосомальной болезнью накопления. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой лизосомальный фермент или его ферментативно активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления,

терапевтический белок выбран из группы, состоящей из альфа-галактозидазы (А или В), β -галактозидазы, β -гексозаминидазы (А или В), галактозилцерамидазы, арилсульфатазы (А или В), β -глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидазы, лизосомальной кислой липазы, лизосомального фермента кислой сфингомиелиназы, формилглицин-генерирующего фермента, идуронидазы (например, альфа-L), ацетил-КоА:альфа-глюкозаминид-N-ацетилтрансферазы, гликозаминогликан-альфа-L-идуроногидролазы, гепаран-N-сульфатазы, N-ацетил- α -D-глюкозаминидазы (NAGLU), идуронат-2-сульфатазы, галактозамин-6-сульфатсульфатазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, гликозаминогликан N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы, β -глюкуронидазы, гиалуронидазы, альфа-N-ацетилнейраминидазы (сиалидазы), ганглиозидсиалидазы, фосфотрансферазы, альфа-глюкозидазы, альфа-D-маннозидазы, бета-D-маннозидазы, аспартилглюкозаминидазы, альфа-L-фукозидазы, баттенина, пальмитоил-протеинтиоэстераз и других связанных с болезнью Баттена белков (например, белка 6 нейронального цероидного липофусциноза) или их ферментативно активного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой альфа-галактозидазу или ее ферментативно активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой альфа-глюкозидазу или ее ферментативно активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой пальмитоил-протеинтиоэстеразу (PPT), включая пальмитоил-протеинтиоэстеразу 1 и 2 (PPT1 и PPT2 соответственно). В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой пальмитоил-протеинтиоэстеразу 1. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой N-ацетил- α -D-глюкозаминидазу (NAGLU). В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок ассоциирован с генетическим расстройством, выбранным из группы, состоящей из расстройства дефицита CDKL5, муковисцидоза, альфа- и бета-талассемии, серповидноклеточной анемии, синдрома Марфана, синдрома Мартина — Белл, болезни Хантингтона, гемохроматоза, врожденной глухоты (несиндромной), болезни Тея — Сакса, семейной гиперхолестеринемии, мышечной дистрофии

Дюшенна, болезни Штаргардта, синдрома Ушера, хориидеремии, ахроматопсии, X-сцепленного ретиношизиса, гемофилии, синдрома Вискотта — Олдрича, X-сцепленного хронического гранулематоза, дефицита декарбоксилазы ароматических L-аминокислот, рецессивного дистрофического буллезного эпидермолиза, дефицита альфа-1-антитрипсина, синдрома прогерии Хатчинсона — Гилфорда (HGPS), синдрома Нунана, X-сцепленного тяжелого комбинированного иммунодефицита (X-SCID). В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок выбран из группы, состоящей из CDKL5, коннексина 26, гексозаминидазы А, рецептора ЛПНП, дистрофина, CFTR, бета-глобулина, HFE, Хантингтона, ABCA4, миозина VIIA (MYO7A), белка сопровождения Rab -1 (REP1), управляемого циклическими нуклеотидами канала бета 3 (CNGB3), ретиношизисина 1 (RS1), субъединицы гемоглобина бета (HBB), фактора IX, WAS, бета-цепи цитохрома В-245, допа-декарбоксилазы (DDC), коллагена VII типа цепи альфа 1 (COL7A1), члена 1 семейства серпинов А (SERPINA1), LMNA, PTPN11, SOS1, RAF1, KRAS и гена γ рецептора IL2. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок способен заменять дефектный или недостаточный белок, связанный с генетическим расстройством, у субъекта, страдающего генетическим расстройством. В некоторых вариантах осуществления, генетическое расстройство представляет собой лизосомальную болезнь накопления. В некоторых вариантах осуществления, генетическое расстройство выбрано из группы, состоящей из аспартилглюкозаминурии, болезни Баттена, цистиноза, болезни Фабри, болезни Гоше I типа, болезни Гоше II типа, болезни Гоше III типа, болезни Помпе, болезни Тея — Сакса, болезни Сандхоффа, метахроматической лейкодистрофии, муколипидоза I типа, муколипидоза II типа, муколипидоза III типа, муколипидоза IV типа, болезни Гурлера, болезни Хантера, болезни Санфилиппо типа А, болезни Санфилиппо типа В, болезни Санфилиппо типа С, болезни Санфилиппо типа D, болезни Моркио типа А, болезни Моркио типа В, болезни Марото — Лами, болезни Слая, болезни Ниманна — Пика типа А, болезни Ниманна — Пика типа В, болезни Ниманна — Пика типа С1, болезни Ниманна — Пика типа С2, болезни Шиндлера I типа и болезни Шиндлера II типа. В некоторых вариантах

осуществления, лизосомальная болезнь накопления выбрана из группы, состоящей из дефицита активатора, GM2-ганглиозидоза; GM2-ганглиозидоза, варианта АВ; альфа-маннозидоза (2 типа, средней тяжести; 3 типа, неонатальный, тяжелой формы); бета-маннозидоза; дефицита лизосомной кислой липазы; цистиноза (с поздним началом ювенильного или подросткового нефропатического типа; детского нефропатического типа); синдрома Чанарина — Дорфмана; болезни накопления нейтральных липидов с миопатией; NLSDM; болезни Данона; болезни Фабри; болезни Фабри II типа с поздним началом; болезни Фарбера; липогранулематоза Фарбера; фукозидоза; галактозиалидоза (комбинированная недостаточность нейраминидазы и бета-галактозидазы); болезни Гоше; болезни Гоше II типа; болезни Гоше III типа; болезни Гоше IIIС типа; болезни Гоше, атипичной из-за дефицита сапозина С; GM1-ганглиозидоза (позднего инфантильного/ювенильного GM1-ганглиозидоза; взрослого/хронического GM1-ганглиозидоза); глобоидно-клеточной лейкодистрофии, болезни Краббе (с поздним началом в младенческом возрасте; с началом в несовершеннолетнем периоде; с началом во взрослом возрасте); болезни Краббе, атипичной из-за дефицита сапозина А; метахроматической лейкодистрофии (ювенильной; взрослой); частичной недостаточности церебросидсульфата; недостаточности псевдоарилсульфатазы А; метахроматической лейкодистрофии из-за дефицита сапозина В; мукополисахаридоза: МПС I, синдрома Гурлера; МПС I, синдрома Гурлера — Шейе; МПС I, синдрома Шейе; МПС II, синдрома Хантера; МПС II, синдрома Хантера; синдрома Санфилиппо типа А/МПС IIIА; синдрома Санфилиппо типа В/МПС IIIВ; синдрома Санфилиппо типа С/МПС IIIС; синдрома Санфилиппо типа D/МПС IIID; синдрома Моркио, типа А/МПС IVA; синдрома Моркио, типа В/МПС IVB; дефицита гиалуронидазы МПС IX; МПС VI синдрома Марото — Лами; МПС VII синдрома Слая; муколипидоза I, сиалидоза II типа; I-клеточной болезни, болезни Лероя, муколипидоза II; псевдо-Гурлер-полидистрофии/муколипидоза III типа; муколипидоза IIIС/ML III GAMMA; муколипидоза IV типа; множественной сульфатазной недостаточности; болезни Ниманна — Пика (типа В; типа C1/хронической нейронопатической формы;

типа C2; типа D/формы Новой Шотландии); нейрональных цероидных липофусцинозов: болезни CLN6 - атипичной поздней инфантильной, варианта с поздним началом, ранним ювенильным началом; болезни Баттена — Шпильмейера — Фогта/ювенильного NCL/CLN3; финского варианта поздней инфантильной CLN5; болезни Янского — Бельшовского/поздней инфантильной болезни CLN2/TPP1; болезни Куфса/болезни NCL/CLN4 зрелого возраста (типа В); северной эпилепсии/поздний инфантильный вариант CLN8; Сантавуори — Халтия/инфантильной болезни CLN1/PPT; болезни Помпе (болезнь накопления гликогена II типа); болезни Помпе с поздним началом; пикнодизостоза; болезни Сандхоффа/ганглиозидоза GM2; болезни Шиндлера (тип III/промежуточный, вариабельный); болезни Канзаки; болезни Салла; детской болезни накопления свободной сиаловой кислоты (ISSD); спинальной мышечной атрофии с прогрессирующей миоклонической эпилепсией (SMAPME); болезни Тея — Сакса/ганглиозидоза GM2; болезни Тея — Сакса с началом в несовершеннолетнем периоде; болезни Тея-Сакса с поздним началом; синдрома Кристиансона; окулоцереброренального синдрома Лоу; болезни Шарко — Мари — Тута типа 4J, CMT4J; синдрома Юниса — Варона; двусторонней височно-затылочной полимикрогирии (ВТОР); X-сцепленного гиперкальциурического нефролитиаза, болезни Дента 1 типа; и болезни Дента 2 типа, аденозиндезаминазного тяжелого комбинированного иммунодефицита (ADA-SCID) и нейронального цероидного липофусциноза. В некоторых вариантах осуществления, генетическое расстройство представляет собой болезнь Помпе. В некоторых вариантах осуществления, генетическое расстройство представляет собой нейрональный цероидный липофусциноз. В некоторых вариантах осуществления, нейрональный цероидный липофусциноз выбран из группы, состоящей из инфантильного НЦЛ (болезнь Сантавуори — Халтия), позднего инфантильного НЦЛ (болезнь Янского — Бильшовского), болезни Баттена, взрослой формы НЦЛ (болезнь Куфса), поздней инфантильной формы НЦЛ финского типа, варианта поздней инфантильной формы НЦЛ, CLN7, CLN8, турецкого варианта поздней инфантильной формы НЦЛ, НЦЛ 9 типа и CLN10. В некоторых вариантах осуществления, вектор для геной

терапии представляет собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор представляет собой вектор аденоассоциированного вируса, вектор ретровируса, вектор лентивируса, вектор вируса оспы, вектор вируса осповакцины, вектор аденовируса или вектор вируса герпеса. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор представляет собой вектор AAV. В некоторых вариантах осуществления, вектор AAV содержит инвертированные концевые повторы (ITR). В некоторых вариантах осуществления, вектор AAV выбран из группы, состоящей из вектора AAV1, вектора AAV2, вектора AAV3, вектора AAV4, вектора AAV5, вектора AAV6, вектора AAV7, вектора AAV8, вектора AAV9, вектора AAVrhS, вектора AAVrh10, вектора AAVrh33, вектора AAVrh34, вектора AAVrh74, вектора AAV Anc80, вектора AAVPHP.B, вектора AAVhu68 и вектора AAV-DJ.

[0008] В определенных аспектах представлены векторы для генной терапии, такие как векторы для генной терапии, содержащие: (a) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую терапевтический белок, и (b) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую пептид, который связывается с CI-MPR с высокой аффинностью. В некоторых вариантах осуществления, пептид представляет собой пептида варианта IGF2 (vIGF2). В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 1 и имеющую по меньшей мере одну замену в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 6, 26, 27, 43, 48, 49, 50, 54, 55 и 65 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна замена выбрана из группы, состоящей из E6R, F26S, Y27L, V43L, F48T, R49S, S50I, A54R, L55R и K65R SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 содержит по меньшей мере две замены в двух или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 6, 26, 27, 43, 48, 49, 50, 54 и 55 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере две замены выбраны из группы, состоящей из E6R, F26S, Y27L, V43L, F48T, R49S, S50I, A54R и L55R SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 содержит N-концевую делецию. В некоторых

вариантах осуществления, пептид vIGF2 содержит N-концевую делецию в положении 1 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 содержит N-концевую делецию положений 1-2 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 содержит N-концевую делецию положений 1-3 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 содержит N-концевую делецию положений 1-4 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 содержит N-концевую делецию положений 1-4 SEQ ID NO: 1 и замены E6R, Y27L и K65R. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 содержит N-концевую делецию положений 1-4 SEQ ID NO:1 и замены E6R и Y27L. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 содержит N-концевую делецию положений 1-5 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 содержит N-концевую делецию в положениях 1-6 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 содержит N-концевую делецию в положениях 1-7 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 имеет пониженную аффинность или не имеет аффинности к рецептору инсулина, и IGF1R по сравнению с нативным пептидом IGF2. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 способен облегчать поглощение терапевтического белка клеткой. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 способен облегчать поглощение терапевтического белка лизосомой. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок способен заменять дефектный или недостаточный белок, связанный с генетическим расстройством, у субъекта, страдающего генетическим расстройством. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой лизосомальный фермент или его ферментативно активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, генетическое расстройство представляет собой лизосомальную болезнь накопления. В некоторых вариантах осуществления, генетическое расстройство выбрано из группы, состоящей из аспартилглюкозаминурии, болезни Баттена, цистиноза, болезни Фабри, болезни Гоше I типа, болезни Гоше II типа, болезни Гоше III типа, болезни Помпе, болезни Тея — Сакса, болезни Сандхоффа, метахроматической лейкодистрофии,

муколипидоза I типа, муколипидоза II типа, муколипидоза III типа, муколипидоза IV типа, болезни Гурлера, болезни Хантера, болезни Санфилиппо типа А, болезни Санфилиппо типа В, болезни Санфилиппо типа С, болезни Санфилиппо типа D, болезни Моркио типа А, болезни Моркио типа В, болезни Марото — Лами, болезни Слая, болезни Ниманна — Пика типа А, болезни Ниманна — Пика типа В, болезни Ниманна — Пика типа С1, болезни Ниманна — Пика типа С2, болезни Шиндлера I типа и болезни Шиндлера II типа. В некоторых вариантах осуществления, лизосомальная болезнь накопления выбрана из группы, состоящей из дефицита активатора, GM2-ганглиозидоза; GM2-ганглиозидоза, варианта АВ; альфа-маннозидоза (2 типа, средней тяжести; 3 типа, неонатальный, тяжелой формы); бета-маннозидоза; недостаточности лизосомальной кислой липазы; цистиноза (с поздним началом ювенильного или подросткового нефропатического типа; детского нефропатического типа); синдрома Чанарина — Дорфмана; болезни накопления нейтральных липидов с миопатией; NLSDM; болезни Данона; болезни Фабри; болезни Фабри II типа, с поздним началом; болезни Фарбера; липогранулематоза Фарбера; фукозидоза; галактозиалидоза (комбинированная недостаточность нейраминидазы и бета-галактозидазы); болезни Гоше; болезни Гоше II типа; болезни Гоше III типа; болезни Гоше IIIС типа; болезни Гоше, атипичной из-за дефицита сапозина С; GM1-ганглиозидоза (позднего инфантильного/ювенильного GM1-ганглиозидоза; взрослого/хронического GM1-ганглиозидоза); глобоидно-клеточной лейкодистрофии, болезни Краббе (с поздним началом в младенческом возрасте; с началом в несовершеннолетнем периоде; с началом во взрослом возрасте); болезни Краббе, атипичной из-за дефицита сапозина А; метахроматической лейкодистрофии (ювенильной; взрослой); частичной недостаточности церебросидсульфата; недостаточности псевдоарилсульфатазы А; метахроматической лейкодистрофии из-за дефицита сапозина В; мукополисахаридоза: МПС I, синдрома Гурлера; МПС I, синдрома Гурлера — Шейе; МПС I, синдрома Шейе; МПС II, синдрома Хантера; МПС II, синдрома Хантера; синдрома Санфилиппо типа А/МПС IIIА; синдрома Санфилиппо типа В/МПС IIIВ; синдрома Санфилиппо типа С/МПС IIIС;

синдрома Санфилиппо типа D/МПС IID; синдрома Моркио, типа A/МПС IVA; синдрома Моркио, типа B/МПС IVB; дефицита гиалуронидазы МПС IX; МПС VI синдрома Марото — Лами; МПС VII синдрома Слая; муколипидоза I, сиалидоза II типа; I-клеточной болезни, болезни Лероя, муколипидоза II; псевдо-Гурлер-полидистрофии/муколипидоза III типа; муколипидоза IIIС/ML III GAMMA; муколипидоза IV типа; множественной сульфатазной недостаточности; болезни Ниманна — Пика (типа B; типа C1/хронической нейронопатической формы; типа C2; типа D/формы Новой Шотландии); нейрональных цероидных липофусцинозов: болезни CLN6 - атипичной поздней инфантильной, варианта с поздним началом, ранним ювенильным началом; болезни Баттена — Шпильмейера — Фогта/ювенильного NCL/CLN3; финского варианта поздней инфантильной CLN5; болезни Янского-Бельшовского/поздней инфантильной болезни CLN2/TPP1; болезни Куфса/болезни NCL/CLN4 зрелого возраста (типа B); северной эпилепсии/поздний инфантильный вариант CLN8; Сантавуори — Халтиа/инфантильной болезни CLN1/PPT; болезни Помпе (болезнь накопления гликогена II типа); болезни Помпе с поздним началом; пикнодизостоза; болезни Сандхоффа/ганглиозидоза GM2; болезни Шиндлера (тип III/промежуточный, вариабельный); болезни Канзаки; болезни Салла; детской болезни накопления свободной сиаловой кислоты (ISSD); спинальной мышечной атрофии с прогрессирующей миоклонической эпилепсией (SMARPE); болезни Тея — Сакса/ганглиозидоза GM2; болезни Тея — Сакса с началом в несовершеннолетнем периоде; болезни Тея — Сакса с поздним началом; синдрома Кристиансона; окулоцереброренального синдрома Лоу; болезни Шарко — Мари — Тута типа 4J, CMT4J; синдрома Юнис-Варона; двусторонней височно-затылочной полимикрогирии (ВТОР); X-сцепленного гиперкальциурического нефролитиаза, болезни Дента 1 типа; и болезни Дента 2 типа, аденозиндезаминазного тяжелого комбинированного иммунодефицита (ADA-SCID), хронической гранулематозной болезни (CGD) и нейронального цероидного липофусциноза. В некоторых вариантах осуществления, генетическое расстройство представляет собой болезнь Помпе. В некоторых вариантах осуществления, генетическое расстройство представляет собой

нейрональный цероидный липофусциноз. В некоторых вариантах осуществления, нейрональный цероидный липофусциноз выбран из группы, состоящей из инфантильного НЦЛ (болезнь Сантавуори — Халтия), позднего инфантильного НЦЛ (болезнь Янского — Бильшовского), болезни Баттена, взрослой формы НЦЛ (болезнь Куфса), поздней инфантильной формы НЦЛ финского типа, варианта поздней инфантильной формы НЦЛ, CLN7, CLN8, турецкого варианта поздней инфантильной формы НЦЛ, НЦЛ 9 типа и CLN10. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой растворимый лизосомальный фермент. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит фермент, выбранный из группы, состоящей из альфа-галактозидазы (А или В), β -галактозидазы, β -гексозаминидазы (А или В), галактозилцерамидазы, арилсульфатазы (А или В), β -глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидазы, лизосомальной кислой липазы, лизосомального фермента кислой сфингомиелиназы, формилглицин-образующего фермента, идуронидазы (например, альфа-L), ацетил-КоА:альфа-глюкозаминид-N-ацетилтрансферазы, гликозаминогликан-альфа-L-идуроногидролазы, гепаран-N-сульфатазы, N-ацетил- α -D-глюкозаминидазы (NAGLU), идуронат-2-сульфатазы, галактозамин-6-сульфатсульфатазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, гликозаминогликан N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы, β -глюкуронидазы, гиалуронидазы, альфа-N-ацетилнейраминидазы (сиалидазы), ганглиозидсиалидазы, фосфотрансферазы, альфа-глюкозидазы, альфа-D-маннозидазы, бета-D-маннозидазы, аспартилглюкозаминидазы, альфа-L-фукозидазы, баттенина, пальмитоил-протеинтиоэстераз и других связанных с болезнью Баттена белков (например, белка 6 нейронального цероидного липофусциноза) или их ферментативно активного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой альфа-глюкозидазу или ее ферментативно активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой N-ацетил- α -D-глюкозаминидазу (NAGLU). В некоторых вариантах осуществления, пальмитоил-протеинтиоэстераза представляет собой пальмитоил-протеинтиоэстеразу 1 (PPT1) или 2 (PPT2). В некоторых вариантах осуществления, пальмитоил-протеинтиоэстераза представляет собой

пальмитоил-протеинтиоэстеразу 1. В некоторых вариантах осуществления, конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность инициации трансляции. В некоторых вариантах осуществления, последовательность инициации трансляции содержит последовательность Козак. В некоторых вариантах осуществления, последовательность Козак содержит последовательность AX₁X₂ATGA (SEQ ID NO: 28), где каждый из X₁ и X₂ представляет собой любой нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления X₁ содержит А. В некоторых вариантах осуществления X₂ содержит G. В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 90% идентичную AAGATGA (SEQ ID NO: 29). В некоторых вариантах осуществления, последовательность Козак содержит AAGATGA (SEQ ID NO: 29). В некоторых вариантах осуществления, последовательность Козак содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 85% идентичную GCAAGATG (SEQ ID NO: 44). В некоторых вариантах осуществления, последовательность Козак отличается от последовательности GCAAGATG (SEQ ID NO: 44) одним или двумя нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак содержит GCAAGATG (SEQ ID NO: 44). В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 85% идентичную CACCATG (SEQ ID NO: 47). В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак отличается от последовательности CACCATG (SEQ ID NO: 47) одним или двумя нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак содержит CACCATG (SEQ ID NO: 47). В некоторых вариантах осуществления, конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сигнальный пептид, причем сигнальный пептид способен повышать секрецию терапевтического белка по сравнению с терапевтическим белком без сигнального пептида. В некоторых вариантах осуществления, конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сигнальный пептид, причем сигнальный

пептид способен повышать секрецию терапевтического белка по сравнению с терапевтическим белком с природным сигнальным пептидом В некоторых вариантах осуществления, конструкция нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ненативный сигнальный пептид, причем ненативный сигнальный пептид способен повышать секрецию терапевтического белка по сравнению с нативным сигнальным пептидом для терапевтического белка. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид выбран из сигнального пептида, связывающего иммуноглобулин (BiP) и сигнального пептида Gaussia. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид BiP содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13-17. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид BiP содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13-17. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид Gaussia. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид Gaussia содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид Gaussia содержит SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты vIGF2 расположена на 5' относительно последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей терапевтический белок. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты vIGF2 расположена на 3' относительно последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей терапевтический белок. В некоторых вариантах осуществления, конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность, кодирующую линкерный пептид между нуклеотидной последовательностью vIGF2 и последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей терапевтический белок. В некоторых вариантах осуществления, линкер состоит из 5-20 аминокислот, 5-15 аминокислот, 5-10 аминокислот, 8-12 аминокислот или около 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 аминокислот. В некоторых вариантах

осуществления, линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 18-21 или SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления, вектор для генной терапии представляет собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор представляет собой аденовирусный вектор, вектор аденоассоциированного вируса (AAB), ретровирусный вектор, лентивирусный вектор или вектор вируса герпеса. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор представляет собой вектор AAB. В некоторых вариантах осуществления, вектор AAB содержит инвертированные концевые повторы (ITR). В некоторых вариантах осуществления, вектор AAB выбран из группы, состоящей из вектора AAB1, вектора AAB2, вектора AAB3, вектора AAB4, вектора AAB5, вектора AAB6, вектора AAB7, вектора AAB8, вектора AAB9, вектора AABrhS, вектора AABrh10, вектора AABrh33, вектора AABrh34, вектора AABrh74, вектора AAB Anc80, вектора AABPHP.B, вектора AABhu68 и вектора AAB-DJ.

[0009] Вектор для генной терапии, содержащий конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую: (a) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую терапевтический белок, и (b) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую пептид, который повышает эндоцитоз терапевтического белка. В некоторых вариантах осуществления, пептид, повышающий эндоцитоз терапевтического белка, представляет собой пептид, связывающийся с CI-MPR. В некоторых вариантах осуществления, пептид представляет собой пептид варианта IGF2 (vIGF2), HIRMaB или TfRMaB, или другой пептид или белок, нацеленный на клетку. В некоторых вариантах осуществления, пептид представляет собой vIGF2. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 1 и имеющую по меньшей мере одну замену в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 6, 26, 27, 43, 48, 49, 50, 54, 55 и 65 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна замена выбрана из группы, состоящей из E6R, F26S, Y27L, V43L, F48T, R49S, S50I, A54R, L55R и K65R SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна замена выбрана из

группы, состоящей из E6R, F26S, Y27L, V43L, F48T, R49S, S50I, A54R и L55R SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 содержит по меньшей мере две замены в двух или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 6, 26, 27, 43, 48, 49, 50, 54 и 55 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере две замены выбраны из группы, состоящей из E6R, F26S, Y27L, V43L, F48T, R49S, S50I, A54R и L55R SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 содержит N-концевую делецию. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 содержит N-концевую делецию в положении 1 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 содержит N-концевую делецию в положениях 1-6 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 содержит N-концевую делецию положений 1-2 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 содержит N-концевую делецию положений 1-3 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 содержит N-концевую делецию положений 1-4 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 содержит N-концевую делецию положений 1-4 SEQ ID NO: 1 и замену E6R, Y27L и K65R. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 содержит N-концевую делецию положений 1-4 SEQ ID NO:1 и замену E6R и Y27L. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 содержит N-концевую делецию положений 1-5 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 содержит N-концевую делецию положений 1-6 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 содержит N-концевую делецию в положениях 1-7 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 обладает повышенной специфичностью к катион-независимому рецептору M6P (CI-MPR) по сравнению с нативным пептидом IGF2. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 способен облегчить поглощение терапевтического белка лизосомой в клетке. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок способен заменять дефектный или недостаточный белок, связанный с генетическим расстройством, у субъекта, страдающего генетическим расстройством. В некоторых вариантах осуществления,

терапевтический белок представляет собой лизосомальный фермент или его ферментативно активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, генетическое расстройство представляет собой лизосомальную болезнь накопления. В некоторых вариантах осуществления, генетическое расстройство выбрано из группы, состоящей из аспартилглюкозаминурии, болезни Баттена, цистиноза, болезни Фабри, болезни Гоше I типа, болезни Гоше II типа, болезни Гоше III типа, болезни Помпе, болезни Тея — Сакса, болезни Сандхоффа, метахроматической лейкодистрофии, муколипидоза I типа, муколипидоза II типа, муколипидоза III типа, муколипидоза IV типа, болезни Гурлера, болезни Хантера, болезни Санфилиппо типа А, болезни Санфилиппо типа В, болезни Санфилиппо типа С, болезни Санфилиппо типа D, болезни Моркио типа А, болезни Моркио типа В, болезни Марото — Лами, болезни Слая, болезни Ниманна — Пика типа А, болезни Ниманна — Пика типа В, болезни Ниманна — Пика типа С1, болезни Ниманна — Пика типа С2, болезни Шиндлера I типа и болезни Шиндлера II типа. В некоторых вариантах осуществления, лизосомальная болезнь накопления выбрана из группы, состоящей из дефицита активатора, GM2-ганглиозидоза; GM2-ганглиозидоза, варианта АВ; альфа-маннозидоза (2 типа, средней тяжести; 3 типа, неонатальный, тяжелой формы); бета-маннозидоза; недостаточности лизосомальной кислой липазы; цистиноза (с поздним началом ювенильного или подросткового нефропатического типа; детского нефропатического типа); синдрома Чанарина — Дорфмана; болезни накопления нейтральных липидов с миопатией; NLSDM; болезни Данона; болезни Фабри; болезни Фабри II типа, с поздним началом; болезни Фарбера; липогранулематоза Фарбера; фукозидоза; галактозиалидоза (комбинированная недостаточность нейраминидазы и бета-галактозидазы); болезни Гоше; болезни Гоше II типа; болезни Гоше III типа; болезни Гоше IIIС типа; болезни Гоше, атипичной из-за дефицита сапозина С; GM1-ганглиозидоза (позднего инфантильного/ювенильного GM1-ганглиозидоза; взрослого/хронического GM1-ганглиозидоза); глобоидно-клеточной лейкодистрофии, болезни Краббе (с поздним началом в младенческом возрасте; с началом в несовершеннолетнем периоде; с началом во взрослом возрасте); болезни Краббе, атипичной из-за

дефицита сапозина А; метахроматической лейкодистрофии (ювенильной; взрослой); частичной недостаточности церебродисульфата; недостаточности псевдоарилсульфатазы А; метахроматической лейкодистрофии из-за дефицита сапозина В; мукополисахаридоза: МПС I, синдрома Гурлера; МПС I, синдрома Гурлера — Шейе; МПС I, синдрома Шейе; МПС II, синдрома Хантера; МПС II, синдрома Хантера; синдрома Санфилиппо типа А/МПС IIIА; синдрома Санфилиппо типа В/МПС IIIВ; синдрома Санфилиппо типа С/МПС IIIС; синдрома Санфилиппо типа D/МПС IIID; синдрома Моркио, типа А/МПС IVА; синдрома Моркио, типа В/МПС IVВ; дефицита гиалуронидазы МПС IX; МПС VI синдрома Марото — Лами; МПС VII синдрома Слая; муколипидоза I, сиалидоза II типа; I-клеточной болезни, болезни Лероя, муколипидоза II; псевдо-Гурлер-полидистрофии/муколипидоза III типа; муколипидоза IIIС/ML III GAMMA; муколипидоза IV типа; множественной сульфатазной недостаточности; болезни Ниманна — Пика (типа В; типа С1/хронической нейронопатической формы; типа С2; типа D/формы Новой Шотландии); нейрональных цероидных липофусцинозов: болезни CLN6 - атипичной поздней инфантильной, варианта с поздним началом, ранним ювенильным началом; болезни Баттена — Шпильмейера — Фогта/ювенильного NCL/CLN3; финского варианта поздней инфантильной CLN5; болезни Янского-Бельшовского/поздней инфантильной болезни CLN2/TPP1; болезни Куфса/болезни NCL/CLN4 зрелого возраста (типа В); северной эпилепсии/поздний инфантильный вариант CLN8; Сантавуори — Халтиа/инфантильной болезни CLN1/PPT; болезни Помпе (болезнь накопления гликогена II типа); болезни Помпе с поздним началом; пикнодизостоза; болезни Сандхоффа/ганглиозидоза GM2; болезни Шиндлера (тип III/промежуточный, вариабельный); болезни Канзаки; болезни Салла; детской болезни накопления свободной сиаловой кислоты (ISSD); спинальной мышечной атрофии с прогрессирующей миоклонической эпилепсией (SMARPE); болезни Тея — Сакса/ганглиозидоза GM2; болезни Тея — Сакса с началом в несовершеннолетнем периоде; болезни Тея — Сакса с поздним началом; синдрома Кристиансона; окулоцереброренального синдрома Лоу; болезни Шарко — Мари — Тута типа 4J, СМТ4J; синдрома Юнис-Варона;

двусторонней височно-затылочной полимикрогирии (ВТОР); X-сцепленного гиперкальциурического нефролитиаза, болезни Дента 1 типа; и болезни Дента 2 типа, аденозиндезаминазного тяжелого комбинированного иммунодефицита (ADA-SCID), хронической гранулематозной болезни (CGD) и нейронального цероидного липофусциноза. В некоторых вариантах осуществления, генетическое расстройство представляет собой болезнь Помпе. В некоторых вариантах осуществления, генетическое расстройство представляет собой нейрональный цероидный липофусциноз. В некоторых вариантах осуществления, нейрональный цероидный липофусциноз выбран из группы, состоящей из инфантильного НЦЛ (болезнь Сантавуори — Халтия), позднего инфантильного НЦЛ (болезнь Янского — Бильшовского), болезни Баттена, взрослой формы НЦЛ (болезнь Куфса), поздней инфантильной формы НЦЛ финского типа, варианта поздней инфантильной формы НЦЛ, CLN7, CLN8, турецкого варианта поздней инфантильной формы НЦЛ, НЦЛ 9 типа и CLN10. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой растворимый лизосомальный фермент или его ферментативно активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит фермент, выбранный из группы, состоящей из альфа-галактозидазы (А или В), β -галактозидазы, β -гексозаминидазы (А или В), галактозилцерамидазы, арилсульфатазы (А или В), β -глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидазы, лизосомальной кислой липазы, лизосомального фермента кислой сфингомиелиназы, формилглицин-образующего фермента, идуронидазы (например, альфа-L), ацетил-КоА:альфа-глюкозаминид-N-ацетилтрансферазы, гликозаминогликан-альфа-L-идуроногидролазы, гепаран-N-сульфатазы, N-ацетил- α -D-глюкозаминидазы (NAGLU), идуронат-2-сульфатазы, галактозамин-6-сульфатсульфатазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, гликозаминогликан N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы, β -глюкуронидазы, гиалуронидазы, альфа-N-ацетилнейраминидазы (сиалидазы), ганглиозидсиалидазы, фосфотрансферазы, альфа-глюкозидазы, альфа-D-маннозидазы, бета-D-маннозидазы, аспартилглюкозаминидазы, альфа-L-фукозидазы, баттенина, пальмитоил-протеинтиоэстераз и других связанных с болезнью Баттена белков (например,

белка 6 нейронального цероидного липофусциноза) или их ферментативно активного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой альфа-глюкозидазу или ее ферментативно активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой N-ацетил- α -D-глюкозаминидазу (NAGLU). В некоторых вариантах осуществления, пальмитоил-протеинтиоэстераза представляет собой пальмитоил-протеинтиоэстеразу 1 (PPT1) или 2 (PPT2). В некоторых вариантах осуществления, пальмитоил-протеинтиоэстераза представляет собой пальмитоил-протеинтиоэстеразу 1. В некоторых вариантах осуществления, конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность инициации трансляции. В некоторых вариантах осуществления, последовательность инициации трансляции содержит последовательность Козак. В некоторых вариантах осуществления, последовательность Козак содержит последовательность AX₁X₂ATGA (SEQ ID NO: 28), где каждый из X₁ и X₂ представляет собой любой нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления X₁ содержит A. В некоторых вариантах осуществления X₂ содержит G. В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 90% идентичную AAGATGA (SEQ ID NO: 29). В некоторых вариантах осуществления, последовательность Козак содержит AAGATGA (SEQ ID NO: 29). В некоторых вариантах осуществления, последовательность Козак содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 85% идентичную GCAAGATG (SEQ ID NO: 44). В некоторых вариантах осуществления, последовательность Козак отличается от последовательности GCAAGATG (SEQ ID NO: 44) одним или двумя нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак содержит GCAAGATG (SEQ ID NO: 44). В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 85% идентичную CACCATG (SEQ ID NO: 47). В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак отличается от последовательности CACCATG (SEQ ID NO: 47) одним или двумя нуклеотидами. В некоторых вариантах

осуществления последовательность Козак содержит CACCATG (SEQ ID NO: 47). В некоторых вариантах осуществления, конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит сигнальную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сигнальный пептид, причем сигнальный пептид способен повышать секрецию терапевтического белка по сравнению с таковой для терапевтического белка без сигнального пептида. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид выбран из сигнального пептида, связывающего иммуноглобулин (BiP) и сигнального пептида Gaussia. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид BiP содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13-17. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид BiP содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13-17. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид содержит сигнальный пептид Gaussia. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид Gaussia содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид Gaussia содержит SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты vIGF2 расположена на 5' относительно последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей терапевтический белок. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты vIGF2 расположена на 3' относительно последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей терапевтический белок. В некоторых вариантах осуществления, конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит линкерную последовательность, кодирующую линкерный пептид между нуклеотидной последовательностью vIGF2 и последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей терапевтический белок. В некоторых вариантах осуществления, линкер состоит из 5-20 аминокислот, 5-15 аминокислот, 5-10 аминокислот, 8-12 аминокислот или около 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 аминокислот. В некоторых вариантах

осуществления, линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 18-21 или SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления, вектор для генной терапии представляет собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор представляет собой аденовирусный вектор, вектор аденоассоциированного вируса (AAB), ретровирусный вектор, лентивирусный вектор или вектор вируса герпеса. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор представляет собой вектор AAB. В некоторых вариантах осуществления, вектор AAB содержит инвертированные концевые повторы (ITR). В некоторых вариантах осуществления, вектор AAB выбран из группы, состоящей из вектора AAB1, вектора AAB2, вектора AAB3, вектора AAB4, вектора AAB5, вектора AAB6, вектора AAB7, вектора AAB8, вектора AAB9, вектора AABrhS, вектора AABrh10, вектора AABrh33, вектора AABrh34, вектора AABrh74, вектора AAB Apc80, вектора AABPHP.B, вектора AABhu68 и вектора AAB-DJ.

[0010] В дополнительных аспектах предлагается фармацевтическая композиция, содержащая (i) терапевтически эффективное количество любого из векторов для генной терапии, описанных в настоящем документе, и (ii) фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество. В некоторых вариантах осуществления, носитель или вспомогательное вещество включает неионогенное соединение с низким осмолярным содержанием, буфер, полимер, соль или их комбинацию.

[0011] В дополнительных аспектах предложены способы лечения генетического расстройства, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, любого из векторов для генной терапии, предложенных в данном документе, или любой из фармацевтических композиций, предложенных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления, генетическое расстройство представляет собой лизосомальную болезнь накопления. В некоторых вариантах осуществления, генетическое расстройство выбрано из группы, состоящей из аспартилглюкозаминурии, болезни Баттена, цистиноза, болезни Фабри, болезни Гоше I типа, болезни Гоше II типа, болезни Гоше III типа, болезни Помпе,

болезни Тея — Сакса, болезни Сандхоффа, метахроматической лейкодистрофии, муколипидоза I типа, муколипидоза II типа, муколипидоза III типа, муколипидоза IV типа, болезни Гурлера, болезни Хантера, болезни Санфилиппо типа А, болезни Санфилиппо типа В, болезни Санфилиппо типа С, болезни Санфилиппо типа D, болезни Моркио типа А, болезни Моркио типа В, болезни Марото — Лами, болезни Слая, болезни Ниманна — Пика типа А, болезни Ниманна — Пика типа В, болезни Ниманна — Пика типа С1, болезни Ниманна — Пика типа С2, болезни Шиндлера I типа и болезни Шиндлера II типа. В некоторых вариантах осуществления, the лизосомальная болезнь накопления выбран из группы, состоящей из дефицита активатора, GM2-ганглиозидоза; GM2-ганглиозидоза, варианта АВ; альфа-маннозидоз (2 типа, средней тяжести; 3 типа, неонатальный, тяжелой формы); бета-маннозидоза; аспартилглюкозаминурии; недостаточности лизосомальной кислой липазы; цистиноза (с поздним началом ювенильного или подросткового нефропатического типа; детского нефропатического типа); синдрома Чанарина — Дорфмана; болезни накопления нейтральных липидов с миопатией; NLSDM; болезни Данона; болезни Фабри; болезни Фабри II типа с поздним началом; болезнь Фарбера; липогранулематоза Фарбера; фукозидоза; галактозиалидоза (комбинированная недостаточность нейраминидазы и бета-галактозидазы); болезни Гоше; болезни Гоше II типа; болезни Гоше III типа; болезни Гоше IIIС типа; болезни Гоше, атипичной из-за дефицита сапозина С; GM1-ганглиозидоза (позднего инфантильного/ювенильного GM1-ганглиозидоза; взрослого/хронического GM1-ганглиозидоза); глобоидно-клеточной лейкодистрофии, болезни Краббе (с поздним началом в младенческом возрасте; с началом в несовершеннолетнем периоде; с началом во взрослом возрасте); болезни Краббе, атипичной из-за дефицита сапозина А; метахроматической лейкодистрофии (ювенильной; взрослой); частичной недостаточности церебросидсульфата; недостаточности псевдоарилсульфатазы А; метахроматической лейкодистрофии из-за дефицита сапозина В; мукополисахаридоза: МПС I, синдрома Гурлера; МПС I, синдрома Гурлера — Шейе; МПС I, синдрома Шейе; МПС II, синдрома Хантера; МПС II, синдрома

Хантера; синдрома Санфилиппо типа А/МПС IIIA; синдрома Санфилиппо типа В/МПС IIIB; синдрома Санфилиппо типа С/МПС IIIC; синдрома Санфилиппо типа D/МПС IIID; синдрома Моркио, типа А/МПС IVA; синдрома Моркио, типа В/МПС IVB; дефицита гиалуронидазы МПС IX; МПС VI синдрома Марото — Лами; МПС VII синдрома Слая; муколипидоза I, сиалидоза II типа; I-клеточной болезни, болезни Лероя, муколипидоза II; псевдо-Гурлер-полидистрофии/муколипидоза III типа; муколипидоза IIIC/ML III GAMMA; муколипидоза IV типа; множественной сульфатазной недостаточности; болезни Ниманна — Пика (типа В; типа C1/хронической нейронопатической формы; типа C2; типа D/формы Новой Шотландии); нейрональных цероидных липофусцинозов: Болезни CLN6 - атипичной поздней инфантильной, варианта с поздним началом, ранним ювенильным началом; болезни Баттена — Шпильмейера — Фогта/ювенильного NCL/CLN3; финского варианта поздней инфантильной CLN5; болезни Янского — Бельшовского/поздней инфантильной болезни CLN2/TPP1; болезни Куфса/болезни NCL/CLN4 зрелого возраста (типа В); северной эпилепсии/поздний инфантильный вариант CLN8; Сантавуори — Халтиа/инфантильной болезни CLN1/PPT; болезни Помпе (болезнь накопления гликогена II типа); болезни Помпе с поздним началом; пикнодизостоза; болезни Сандхоффа/ганглиозидоза GM2; болезни Шиндлера (тип III/промежуточный, вариабельный); болезни Канзаки; болезни Салла; детской болезни накопления свободной сиаловой кислоты (ISSD); спинальной мышечной атрофии с прогрессирующей миоклонической эпилепсией (SMAPME); болезни Тея — Сакса/ганглиозидоза GM2; болезни Тея — Сакса с началом в несовершеннолетнем периоде; болезни Тея — Сакса с поздним началом; синдрома Кристиансона; окулоцереброренального синдрома Лоу; болезни Шарко — Мари — Тута типа 4J, CMT4J; синдрома Юниса — Варона; двусторонней височно-затылочной полимикрогирии (ВТОР); X-сцепленного гиперкальциурического нефролитиаза, болезни Дента 1 типа; и болезни Дента 2 типа, аденозиндезаминазного тяжелого комбинированного иммунодефицита (ADA-SCID), хронического гранулематоза (CGD), расстройства дефицита CDKL5 и нейронального цероидного липофусциноза. В некоторых вариантах

осуществления, генетическое расстройство представляет собой болезнь Помпе. В некоторых вариантах осуществления, генетическое расстройство представляет собой нейрональный цероидный липофусциноз. В некоторых вариантах осуществления, нейрональный цероидный липофусциноз выбран из группы, состоящей из инфантильного НЦЛ (болезнь Сантавуори — Халтия), позднего инфантильного НЦЛ (болезнь Янского — Бильшовского), болезни Баттена, взрослой формы НЦЛ (болезнь Куфса), поздней инфантильной формы НЦЛ финского типа, варианта поздней инфантильной формы НЦЛ, CLN7, CLN8, турецкого варианта поздней инфантильной формы НЦЛ, НЦЛ 9 типа и CLN10. В некоторых вариантах осуществления, введение осуществляется интратекально, интраокулярно, интравитреально, ретинально, внутривенно, внутримышечно, внутрижелудочково, интрацеребрально, внутримозжечково, интрацеребровентрикулярно, интраперенхимально, окулярно, подкожно или их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления, введение осуществляется интратекально. В некоторых вариантах осуществления, введение осуществляется интраокулярно, интравитреально или ретинально.

[0012] В дополнительных аспектах предложены фармацевтические композиции, содержащие любой из векторов для генной терапии, описанных в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество для применения при лечении генетического расстройства. В дополнительных аспектах предложены фармацевтические композиции, содержащие любой из векторов для генной терапии, описанных в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество для применения при получении лекарственного средства для лечения генетического расстройства. В некоторых вариантах осуществления, генетическое расстройство представляет собой лизосомальную болезнь накопления. В некоторых вариантах осуществления, генетическое расстройство выбрано из группы, состоящей из аспартилглюкозаминурии, болезни Баттена, цистиноза, болезни Фабри, болезни Гоше I типа, болезни Гоше II типа, болезни Гоше III типа, болезни Помпе, болезни Тея — Сакса, болезни Сандхоффа, метахроматической лейкодистрофии, муколипидоза I типа, муколипидоза II типа,

муколипидоза III типа, муколипидоза IV типа, болезни Гурлера, болезни Хантера, болезни Санфилиппо типа А, болезни Санфилиппо типа В, болезни Санфилиппо типа С, болезни Санфилиппо типа D, болезни Моркио типа А, болезни Моркио типа В, болезни Марото — Лами, болезни Слая, болезни Ниманна — Пика типа А, болезни Ниманна — Пика типа В, болезни Ниманна — Пика типа С1, болезни Ниманна — Пика типа С2, болезни Шиндлера I типа и болезни Шиндлера II типа. В некоторых вариантах осуществления, the лизосомальная болезнь накопления выбран из группы, состоящей из дефицита активатора, GM2-ганглиозидоза; GM2-ганглиозидоза, варианта АВ; альфа-маннозидоз (2 типа, средней тяжести; 3 типа, неонатальный, тяжелой формы); бета-маннозидоза; аспартилглюкозаминурии; недостаточности лизосомальной кислой липазы; цистиноза (с поздним началом ювенильного или подросткового нефропатического типа; детского нефропатического типа); синдрома Чанарина — Дорфмана; болезни накопления нейтральных липидов с миопатией; NLSDM; болезни Данона; болезни Фабри; болезни Фабри II типа с поздним началом; болезнь Фарбера; липогранулематоза Фарбера; фукозидоза; галактозиалидоза (комбинированная недостаточность нейраминидазы и бета-галактозидазы); болезни Гоше; болезни Гоше II типа; болезни Гоше III типа; болезни Гоше IIIС типа; болезни Гоше, атипичной из-за дефицита сапозина С; GM1-ганглиозидоза (позднего инфантильного/ювенильного GM1-ганглиозидоза; взрослого/хронического GM1-ганглиозидоза); глобоидно-клеточной лейкодистрофии, болезни Краббе (с поздним началом в младенческом возрасте; с началом в несовершеннолетнем периоде; с началом во взрослом возрасте); болезни Краббе, атипичной из-за дефицита сапозина А; метахроматической лейкодистрофии (ювенильной; взрослой); частичной недостаточности цереброзидсульфата; недостаточности псевдоарилсульфатазы А; метахроматической лейкодистрофии из-за дефицита сапозина В; мукополисахаридоза: МПС I, синдрома Гурлера; МПС I, синдрома Гурлера — Шейе; МПС I, синдрома Шейе; МПС II, синдрома Хантера; МПС II, синдрома Хантера; синдрома Санфилиппо типа А/МПС IIIА; синдрома Санфилиппо типа В/МПС IIIВ; синдрома Санфилиппо типа С/МПС IIIС; синдрома Санфилиппо

типа D/МПС IID; синдрома Моркио, типа A/МПС IVA; синдрома Моркио, типа B/МПС IVB; дефицита гиалуронидазы МПС IX; МПС VI синдрома Марото — Лами; МПС VII синдрома Слая; муколипидоза I, сиалидоза II типа; I-клеточной болезни, болезни Лероя, муколипидоза II; псевдо-Гурлер-полидистрофии/муколипидоза III типа; муколипидоза III/ML III GAMMA; муколипидоза IV типа; множественной сульфатазной недостаточности; болезни Ниманна — Пика (типа B; типа C1/хронической нейронопатической формы; типа C2; типа D/формы Новой Шотландии); нейрональных цероидных липофусцинозов: Болезни CLN6 - атипичной поздней инфантильной, варианта с поздним началом, ранним ювенильным началом; болезни Баттена — Шпильмейера — Фогта/ювенильного NCL/CLN3; финского варианта поздней инфантильной CLN5; болезни Янского — Бельшовского/поздней инфантильной болезни CLN2/TPP1; болезни Куфса/болезни NCL/CLN4 зрелого возраста (типа B); северной эпилепсии/поздний инфантильный вариант CLN8; Сантавуори — Халтиа/инфантильной болезни CLN1/PPT; болезни Помпе (болезнь накопления гликогена II типа); болезни Помпе с поздним началом; пикнодизостоза; болезни Сандхоффа/ганглиозидоза GM2; болезни Шиндлера (тип III/промежуточный, вариабельный); болезни Канзаки; болезни Салла; детской болезни накопления свободной сиаловой кислоты (ISSD); спинальной мышечной атрофии с прогрессирующей миоклонической эпилепсией (SMAPME); болезни Тея — Сакса/ганглиозидоза GM2; болезни Тея — Сакса с началом в несовершеннолетнем периоде; болезни Тея — Сакса с поздним началом; синдрома Кристиансона; окулоцереброренального синдрома Лоу; болезни Шарко — Мари — Тута типа 4J, CMT4J; синдрома Юниса — Варона; двусторонней височно-затылочной полимикрогирии (ВТОР); X-сцепленного гиперкальциурического нефролитиаза, болезни Дента 1 типа; и болезни Дента 2 типа, аденозиндезаминазного тяжелого комбинированного иммунодефицита (ADA-SCID), хронического гранулематоза (CGD), расстройства дефицита CDKL5 и нейронального цероидного липофусциноза. В некоторых вариантах осуществления, генетическое расстройство представляет собой болезнь Помпе. В некоторых вариантах осуществления, генетическое расстройство представляет

собой нейрональный цероидный липофусциноз. В некоторых вариантах осуществления, нейрональный цероидный липофусциноз выбран из группы, состоящей из инфантильного НЦЛ (болезнь Сантавуори — Халтия), позднего инфантильного НЦЛ (болезнь Янского — Бильшовского), болезни Баттена, взрослой формы НЦЛ (болезнь Куфса), поздней инфантильной формы НЦЛ финского типа, варианта поздней инфантильной формы НЦЛ, CLN7, CLN8, турецкого варианта поздней инфантильной формы НЦЛ, НЦЛ 9 типа и CLN10. В некоторых вариантах осуществления, композиция составлена для интратекального, интраокулярного, интравитреального, ретинального, внутривенного, внутримышечного, внутрижелудочкового, интрацеребрального, внутримозжечкового, окулярного или подкожного введения. В некоторых вариантах осуществления, композиция составлена для интратекального введения. В некоторых вариантах осуществления, композиция составлена для интратекального введения для лечения нейродегенеративного расстройства. В некоторых вариантах осуществления, композиция составлена для окулярного, интравитреального или ретинального введения.

[0013] В настоящем документе предложены векторы для генной терапии, содержащие конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, содержащий: (а) терапевтический белок; (b) пептид, который с высокой аффинностью связывается с катионнезависимым маннозо-6-фосфатным (M6P) рецептором (CI-MPR); и (с) линкер между терапевтическим белком и пептидом, который связывает CI-MPR. В некоторых вариантах осуществления, пептид представляет собой пептида варианта IGF2 (vIGF2). В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 1 и имеет по меньшей мере одну замену в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 6, 26, 27, 43, 48, 49, 50, 54, 55 и 65 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна замена выбрана из группы, состоящей из E6R, F26S, Y27L, V43L, F48T, R49S, S50I, A54R, L55R и K65R SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 содержит по меньшей мере две замены в двух или более положениях,

выбранных из группы, состоящей из положений 6, 26, 27, 43, 48, 49, 50, 54, 55, 65 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере две замены выбраны из группы, состоящей из E6R, F26S, Y27L, V43L, F48T, R49S, S50I, A54R, L55R, K65R SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 содержит N-концевую делецию в положениях 1-4 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 имеет пониженную аффинность к рецептору инсулина и IGF1R по сравнению с нативным пептидом IGF2. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 способен облегчать поглощение терапевтического белка клеткой. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 способен облегчать поглощение терапевтического белка лизосомой. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок способен заменять дефектный или недостаточный белок, связанный с генетическим расстройством, у субъекта, страдающего генетическим расстройством. В некоторых вариантах осуществления, генетическое расстройство представляет собой лизосомальную болезнь накопления. В некоторых вариантах осуществления, генетическое расстройство выбрано из группы, состоящей из аспартилглюкозаминурии, болезни Баттена, цистиноза, болезни Фабри, болезни Гоше I типа, болезни Гоше типа II, болезни Гоше типа III, болезни Помпе, болезни Тея — Сакса, болезни Сандхоффа, метахроматической лейкодистрофии, муколипидоза I типа, муколипидоза II типа, муколипидоза III типа, муколипидоза IV типа, болезни Гурлера, болезни Хантера, болезни Санфилиппо типа A, болезни Санфилиппо типа B, болезни Санфилиппо типа C, болезни Санфилиппо типа D, болезни Моркио типа A, болезни Моркио типа B, болезни Марото — Лами, болезни Слая, болезни Ниманна — Пика типа A, болезни Ниманна — Пика типа B, болезни Ниманна — Пика типа C1, болезни Ниманна — Пика типа C2, болезни Шиндлера типа I, болезни Шиндлера типа II, аденозиндезаминаза тяжелого комбинированного иммунодефицита (ADA-SCID), хронической гранулематозной болезни (CGD) и нейронального цероидного липофусциноза. В некоторых вариантах осуществления, генетическое расстройство представляет собой болезнь Помпе. В некоторых вариантах осуществления, генетическое расстройство представляет

собой болезнь CLN1. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит растворимый лизосомальный фермент или его ферментативно активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит лизосомальный фермент или его ферментативно активный фрагмент, причем лизосомальный фермент выбран из группы, состоящей из альфа-галактозидазы А, β -глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидазы, лизосомальной кислой липазы, гликозаминоглика альфа-L-идуриногидролазы, идуронат-2-сульфатазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, гликозаминогликан N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы, пальмитоил-протеинтиоэстераз, циклинзависимой киназы 5 и альфа-глюкозидазы. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой альфа-глюкозидазу или ее ферментативно активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой пальмитоил-протеинтиоэстеразу или ее ферментативно активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой пальмитоил-протеинтиоэстеразу-1 или ее ферментативно активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность инициации трансляции. В некоторых вариантах осуществления, последовательность инициации трансляции содержит последовательность Козак. В некоторых вариантах осуществления, конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сигнальный пептид, причем сигнальный пептид способен повышать секрецию терапевтического белка по сравнению с терапевтическим белком без сигнального пептида. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид выбран из сигнального пептида, связывающего иммуноглобулин (ViP) и сигнального пептида Gaussia. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид ViP содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13-17. В некоторых вариантах осуществления, пептид vIGF2 содержит последовательность SEQ ID NO:31. В некоторых вариантах осуществления,

конструкция содержит SEQ ID NO:36. В некоторых вариантах осуществления, полипептид содержит SEQ ID NO:23. В некоторых вариантах осуществления, конструкция содержит SEQ ID NO:38. В некоторых вариантах осуществления, vIGF2 находится на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления, vIGF2 находится на C-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления, линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 18-21 или SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления, вектор для генной терапии представляет собой вирусный вектор, выбранный из группы, состоящей из аденовирусного вектора, вектора аденоассоциированного вируса (AAB), ретровирусного вектора, лентивирусного вектора, вектора вируса оспы, вектора на основе вируса осповакцины, вектора аденовируса и вектора вируса герпеса.

[0014] В некоторых аспектах предложены слитые белки, такие как слитые белки, содержащие пептид варианта IGF2 и терапевтический белок. В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит линкер. В некоторых вариантах осуществления, линкер состоит из 5-20 аминокислот, 5-15 аминокислот, 5-10 аминокислот, 8-12 аминокислот или около 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18), GGGGS (SEQ ID NO: 19), GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 21), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37, также называемую в настоящем документе «2GS») или GGSGSGSTS (SEQ ID NO: 33). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид содержит сигнальный пептид, связывающий иммуноглобулин (BiP). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок кодируется нуклеиновой кислотой, содержащей последовательность участка внутренней посадки рибосомы вируса паралича сверчка (CrPV IRES). В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит по меньшей мере один фермент из группы, состоящей из альфа-галактозидазы (A или B), β -галактозидазы, β -гексозаминидазы (A или B), галактозилщерамидазы, арилсульфатазы (A или B), β -глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидазы, лизосомальной кислой липазы, лизосомального фермента

кислой сфингомиелиназы, формилглицин-образующего фермента, идуронидазы (например, альфа-L), ацетил-КоА:альфа-глюкозаминид-N-ацетилтрансферазы, гликозаминогликан альфа-L-идуриногидролазы, гепаран-N-сульфатазы, N-ацетил- α -D-глюкозаминидазы (NAGLU), идуронат-2-сульфатазы, галактозамин-6-сульфатсульфатазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, гликозаминогликан N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы, β -глюкуронидазы, гиалуронидазы, альфа-N-ацетилнейраминидазы (сиалидазы), ганглиозидсиалидазы, фосфотрансферазы, альфа-глюкозидазы, альфа-D-маннозидазы, бета-D-маннозидазы, аспартилглюкозаминидазы, альфа-L-фукозидазы, баттенина, пальмитоил-протеинтиоэстераз и других связанных с болезнью Баттена белков (например, белка 6 нейронального цероидного липофусциноза) или их ферментативно активного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит альфа-глюкозидазу или ее ферментативно активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой N-ацетил- α -D-глюкозаминидазу (NAGLU). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок кодируется нуклеиновой кислотой, содержащей последовательность Козак.

[0015] В дополнительных аспектах предложены слитые белки, содержащие сигнальный пептид и терапевтический белок, причем сигнальный пептид удаляется после трансляции при секреции из клетки. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид содержит сигнальный пептид, связывающий иммуноглобулин (BiP). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит линкер. В некоторых вариантах осуществления, линкер состоит из 5-20 аминокислот, 5-15 аминокислот, 5-10 аминокислот, 8-12 аминокислот или около 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит аминокислотную последовательность GGGSGGGG (SEQ ID NO: 18), GGGGS (SEQ ID NO: 19), GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20), GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 21), GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37) или GGSGSGSTS (SEQ ID NO: 33). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит пептид варианта IGF2. В некоторых вариантах осуществления, слитый белок кодируется нуклеиновой

кислотой, содержащей последовательность участка внутренней посадки рибосомы вируса паралича сверчка (CrPV IRES). В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит по меньшей мере один фермент из группы, состоящей из альфа-галактозидазы (А или В), β -галактозидазы, β -гексозаминидазы (А или В), галактозилцерамидазы, арилсульфатазы (А или В), β -глюкоцеребброзидазы, глюкоцеребброзидазы, лизосомальной кислой липазы, лизосомального фермента кислой сфингомиелиназы, формилглицин-образующего фермента, идуронидазы (например, альфа-L), ацетил-КоА:альфа-глюкозаминид-N-ацетилтрансферазы, гликозаминогликаны альфа-L-идуриногидролазы, гепаран-N-сульфатазы, N-ацетил- α -D-глюкозаминидазы (NAGLU), идуронат-2-сульфатазы, галактозамин-6-сульфатсульфатазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, гликозаминогликан N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы, β -глюкуронидазы, гиалуронидазы, альфа-N-ацетилнейраминидазы (сиалидазы), ганглиозидсиалидазы, фосфотрансферазы, альфа-глюкозидазы, альфа-D-маннозидазы, бета-D-маннозидазы, аспартилглюкозаминидазы, альфа-L-фукозидазы, баттенина, пальмитоил-протеинтиоэстераз и других связанных с болезнью Баттена белков (например, белка 6 нейронального цероидного липофусциноза) или их ферментативно активного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит альфа-глюкозидазу или ее ферментативно активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой N-ацетил- α -D-глюкозаминидазу (NAGLU). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок кодируется нуклеиновой кислотой, содержащей последовательность Козак.

[0016] В дополнительных аспектах предложены последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие слитые белки, содержащие терапевтический белок, причем слитый белок кодируется нуклеиновой кислотой, содержащей последовательность участка внутренней посадки рибосомы вируса паралича сверчка (CrPV IRES). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид содержит сигнальный пептид, связывающий

иммуноглобулин (BiP). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит пептид варианта IGF2. В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит линкер. В некоторых вариантах осуществления, линкер состоит из 5-20 аминокислот, 5-15 аминокислот, 5-10 аминокислот, 8-12 аминокислот или около 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18), GGGGS (SEQ ID NO: 19), GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 21), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37) или GGS GSGSTS (SEQ ID NO: 33). В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит по меньшей мере один фермент из группы, состоящей из альфа-галактозидазы (А или В), β -галактозидазы, β -гексозаминидазы (А или В), галактозилцерамидазы, арилсульфатазы (А или В), β -глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидазы, лизосомальной кислой липазы, лизосомального фермента кислой сфингомиелиназы, формилглицин-образующего фермента, идуронидазы (например, альфа-L), ацетил-КоА:альфа-глюкозаминид-N-ацетилтрансферазы, гликозаминогликан альфа-L-идуроногидролазы, гепаран-N-сульфатазы, N-ацетил- α -D-глюкозаминидазы (NAGLU), идуронат-2-сульфатазы, галактозамин-6-сульфатсульфатазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, гликозаминогликан N-ацетилгалактозамин 4-сульфатазы, β -глюкуронидазы, гиалуронидазы, альфа-N-ацетилнейраминидазы (сиалидазы), ганглиозидсиалидазы, фосфотрансферазы, альфа-глюкозидазы, альфа-D-маннозидазы, бета-D-маннозидазы, аспартилглюкозаминидазы, альфа-L-фукозидазы, баттенина, пальмитоил-протеинтиоэстераз и других связанных с болезнью Баттена белков (например, белка 6 нейронального цероидного липофусциноза) или их ферментативно активного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит альфа-глюкозидазу или ее ферментативно активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой N-ацетил- α -D-глюкозаминидазу (NAGLU). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок кодируется нуклеиновой кислотой, содержащей последовательность Козак.

[0017] В дополнительных аспектах предложены слитые белки, содержащие терапевтический белок, причем слитый белок кодируется нуклеиновой кислотой, содержащей последовательность Козак. В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит линкер. В некоторых вариантах осуществления, линкер состоит из 5-20 аминокислот, 5-15 аминокислот, 5-10 аминокислот, 8-12 аминокислот или около 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18), GGGGS (SEQ ID NO: 19), GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 21) или GGS GSGSTS (SEQ ID NO: 33). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид содержит сигнальный пептид, связывающий иммуноглобулин (BiP). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит пептид варианта IGF2. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит по меньшей мере один фермент из группы, состоящей из альфа-галактозидазы (А или В), β -галактозидазы, β -гексозаминидазы (А или В), галактозилцерамидазы, арилсульфатазы (А или В), β -глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидазы, лизосомальной кислой липазы, лизосомального фермента кислой сфингомиелиназы, формилглицин-образующего фермента, идуронидазы (например, альфа-L), ацетил-КоА:альфа-глюкозаминид-N-ацетилтрансферазы, гликозаминогликан альфа-L-идуроногидролазы, гепаран-N-сульфатазы, N-ацетил- α -D-глюкозаминидазы (NAGLU), идуронат-2-сульфатазы, галактозамин-6-сульфатсульфатазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, гликозаминогликан N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы, β -глюкуронидазы, гиалуронидазы, альфа-N-ацетилнейраминидазы (сиалидазы), ганглиозидсиалидазы, фосфотрансферазы, альфа-глюкозидазы, альфа-D-маннозидазы, бета-D-маннозидазы, аспартилглюкозаминидазы, альфа-L-фукозидазы, баттенина, пальмитоил-протеинтиоэстераз и других связанных с болезнью Баттена белков (например, белка 6 нейронального цероидного липофусциноза) или их ферментативно активного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический

белок содержит альфа-глюкозидазу или ее ферментативно активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой N-ацетил- α -D-глюкозаминидазу (NAGLU). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок кодируется нуклеиновой кислотой, содержащей последовательность участка внутренней посадки рибосомы вируса паралича сверчка (CrPV IRES).

[0018] В дополнительных аспектах предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие слитый белок, такие как нуклеиновые кислоты, кодирующие слитый белок, содержащий пептид варианта IGF2 и терапевтический белок. В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит линкер. В некоторых вариантах осуществления, линкер состоит из 5-20 аминокислот, 5-15 аминокислот, 5-10 аминокислот, 8-12 аминокислот или около 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18), GGGGS (SEQ ID NO: 19), GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 21), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37) или GGSGSGSTS (SEQ ID NO: 33). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид содержит сигнальный пептид, связывающий иммуноглобулин (BiP). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность участка внутренней посадки рибосомы вируса паралича сверчка (CrPV IRES). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность Козак. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит по меньшей мере один фермент из группы, состоящей из альфа-галактозидазы (A или B), β -галактозидазы, β -гексозаминидазы (A или B), галактозилцерамидазы, арилсульфатазы (A или B), β -глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидазы, лизосомальной кислой липазы, лизосомального фермента кислой сфингомиелиназы, формилглицин-образующего фермента, идуронидазы (например, альфа-L), ацетил-КоА:альфа-глюкозаминид-N-ацетилтрансферазы, гликозаминогликаны альфа-L-

идуриногидролазы, гепаран-N-сульфатазы, N-ацетил- α -D-глюкозаминидазы (NAGLU), идуронат-2-сульфатазы, галактозамин-6-сульфатсульфатазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, гликозаминогликан N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы, β -глюкуронидазы, гиалуронидазы, альфа-N-ацетилнейраминидазы (сиалидазы), ганглиозидсиалидазы, фосфотрансферазы, альфа-глюкозидазы, альфа-D-маннозидазы, бета-D-маннозидазы, аспартилглюкозаминидазы, альфа-L-фукозидазы, баттенина, пальмитоил-протеинтиоэстераз и других связанных с болезнью Баттена белков (например, белка 6 нейронального цероидного липофусциноза) или их ферментативно активного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит альфа-глюкозидазу или ее ферментативно активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой N-ацетил- α -D-глюкозаминидазу (NAGLU). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит промотор. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота содержится в вирусном векторе. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор содержит ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, лентивирус или вирус герпеса.

[0019] В дополнительных аспектах предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие слитый белок, содержащий сигнальный пептид и терапевтический белок. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид содержит сигнальный пептид, связывающий иммуноглобулин (BiP). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит линкер. В некоторых вариантах осуществления, линкер состоит из 5-20 аминокислот, 5-15 аминокислот, 5-10 аминокислот, 8-12 аминокислот или около 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18), GGGGS (SEQ ID NO: 19), GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 21), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37) или GGS GSGSTS (SEQ ID NO: 33). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит пептид варианта IGF2. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность участка внутренней

посадки рибосомы вируса паралича сверчка (CrPV IRES). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность Козак. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит по меньшей мере один фермент из группы, состоящей из альфа-галактозидазы (А или В), β -галактозидазы, β -гексозаминидазы (А или В), галактозилцерамидазы, арилсульфатазы (А или В), β -глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидазы, лизосомальной кислой липазы, лизосомального фермента кислой сфингомиелиназы, формилглицин-образующего фермента, идуронидазы (например, альфа-L), ацетил-КоА:альфа-глюкозаминид-N-ацетилтрансферазы, гликозаминогликан альфа-L-идуроногидролазы, гепаран-N-сульфатазы, N-ацетил- α -D-глюкозаминидазы (NAGLU), идуронат-2-сульфатазы, галактозамин-6-сульфатсульфатазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, гликозаминогликан N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы, β -глюкуронидазы, гиалуронидазы, альфа-N-ацетилнейраминидазы (сиалидазы), ганглиозидсиалидазы, фосфотрансферазы, альфа-глюкозидазы, альфа-D-маннозидазы, бета-D-маннозидазы, аспартилглюкозаминидазы, альфа-L-фукозидазы, баттенина, пальмитоил-протеинтиоэстераз и других связанных с болезнью Баттена белков (например, белка 6 нейронального цероидного липофусциноза) или их ферментативно активного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит альфа-глюкозидазу или ее ферментативно активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой N-ацетил- α -D-глюкозаминидазу (NAGLU). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит промотор. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота содержится в вирусном векторе. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор содержит ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, лентивирус или вирус герпеса.

[0020] В дополнительных аспектах предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие слитый белок, содержащий терапевтический белок, причем нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность участка внутренней посадки рибосомы вируса паралича сверчка (CrPV IRES). В

некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность Козак. В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит линкер. В некоторых вариантах осуществления, линкер состоит из 5-20 аминокислот, 5-15 аминокислот, 5-10 аминокислот, 8-12 аминокислот или около 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18), GGGGS (SEQ ID NO: 19), GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 21), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37) или GGSGSGSTS (SEQ ID NO: 33). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид содержит сигнальный пептид, связывающий иммуноглобулин (BiP). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит пептид варианта IGF2. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит по меньшей мере один фермент из группы, состоящей из альфа-галактозидазы (А или В), β -галактозидазы, β -гексозаминидазы (А или В), галактозилцерамидазы, арилсульфатазы (А или В), β -глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидазы, лизосомальной кислой липазы, лизосомального фермента кислой сфингомиелиназы, формилглицин-образующего фермента, идуронидазы (например, альфа-L), ацетил-КоА:альфа-глюкозаминид-N-ацетилтрансферазы, гликозаминогликан альфа-L-идуроногидролазы, гепаран-N-сульфатазы, N-ацетил- α -D-глюкозаминидазы (NAGLU), идуронат-2-сульфатазы, галактозамин-6-сульфатсульфатазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, гликозаминогликан N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы, β -глюкуронидазы, гиалуронидазы, альфа-N-ацетилнейраминидазы (сиалидазы), ганглиозидсиалидазы, фосфотрансферазы, альфа-глюкозидазы, альфа-D-маннозидазы, бета-D-маннозидазы, аспартилглюкозаминидазы, альфа-L-фукозидазы, баттенина, пальмитоил-протеинтиоэстераз и других связанных с болезнью Баттена белков (например, белка 6 нейронального цероидного липофусциноза) или их ферментативно активного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит альфа-глюкозидазу или ее ферментативно активный фрагмент. В

некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой N-ацетил- α -D-глюкозаминидазу (NAGLU). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит промотор. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота содержится в вирусном векторе. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор содержит ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, лентивирус или вирус герпеса.

[0021] В дополнительных аспектах предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие слитый белок, содержащий терапевтический белок, причем нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность Козак. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность Козак. В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит линкер. В некоторых вариантах осуществления, линкер состоит из 5-20 аминокислот, 5-15 аминокислот, 5-10 аминокислот, 8-12 аминокислот или около 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18), GGGGS (SEQ ID NO: 19), GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 21), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37) или GGSGSGSTS (SEQ ID NO: 33). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид содержит сигнальный пептид, связывающий иммуноглобулин (BiP). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит пептид варианта IGF2. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит по меньшей мере один фермент из группы, состоящей из альфа-галактозидазы (A или B), β -галактозидазы, β -гексозаминидазы (A или B), галактозилцерамидазы, арилсульфатазы (A или B), β -глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидазы, лизосомальной кислой липазы, лизосомального фермента кислой сфингомиелиназы, формилглицин-образующего фермента, идуронидазы (например, альфа-L), ацетил-КоА:альфа-глюкозаминид-N-ацетилтрансферазы, гликозаминогликан альфа-L-идуроногидролазы, гепаран-N-сульфатазы, N-

ацетил- α -D-глюкозаминидазы (NAGLU), идуронат-2-сульфатазы, галактозамин-6-сульфатсульфатазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, гликозаминогликан N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы, β -глюкуронидазы, гиалуронидазы, альфа-N-ацетилнейраминидазы (сиалидазы), ганглиозидсиалидазы, фосфотрансферазы, альфа-глюкозидазы, альфа-D-маннозидазы, бета-D-маннозидазы, аспартилглюкозаминидазы, альфа-L-фукозидазы, баттенина, пальмитоил-протеинтиоэстераз и других связанных с болезнью Баттена белков (например, белка 6 нейронального цероидного липофусциноза) или их ферментативно активного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит альфа-глюкозидазу или ее ферментативно активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой N-ацетил- α -D-глюкозаминидазу (NAGLU). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит промотор. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота содержится в вирусном векторе. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор содержит ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, лентивирус или вирус герпеса.

[0022] В дополнительных аспектах предложены композиции, содержащие (a) нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, содержащий пептид варианта IGF2 и терапевтический белок; и (b) буфер или вспомогательное вещество, подходящие для генной терапии. В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит линкер. В некоторых вариантах осуществления, линкер состоит из 5-20 аминокислот, 5-15 аминокислот, 5-10 аминокислот, 8-12 аминокислот или около 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18), GGGGS (SEQ ID NO: 19), GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 21), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37) или GGS GSGSTS (SEQ ID NO: 33). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид содержит сигнальный пептид, связывающий иммуноглобулин (BiP). В

некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность участка внутренней посадки рибосомы вируса паралича сверчка (CrPV IRES). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность Козак. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит по меньшей мере один фермент из группы, состоящей из альфа-галактозидазы (А или В), β -галактозидазы, β -гексозаминидазы (А или В), галактозилцерамидазы, арилсульфатазы (А или В), β -глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидазы, лизосомальной кислой липазы, лизосомального фермента кислой сфингомиелиназы, формилглицин-образующего фермента, идуронидазы (например, альфа-L), ацетил-КоА:альфа-глюкозаминид-N-ацетилтрансферазы, гликозаминогликан альфа-L-идуроногидролазы, гепаран-N-сульфатазы, N-ацетил- α -D-глюкозаминидазы (NAGLU), идуронат-2-сульфатазы, галактозамин-6-сульфатсульфатазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, гликозаминогликан N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы, β -глюкуронидазы, гиалуронидазы, альфа-N-ацетилнейраминидазы (сиалидазы), ганглиозидсиалидазы, фосфотрансферазы, альфа-глюкозидазы, альфа-D-маннозидазы, бета-D-маннозидазы, аспартилглюкозаминидазы, альфа-L-фукозидазы, баттенина, пальмитоил-протеинтиоэстераз и других связанных с болезнью Баттена белков (например, белка 6 нейронального цероидного липофусциноза) или их ферментативно активного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит альфа-глюкозидазу или ее ферментативно активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой N-ацетил- α -D-глюкозаминидазу (NAGLU). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит промотор. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота содержится в вирусном векторе. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор содержит ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, лентивирус или вирус герпеса. В некоторых вариантах осуществления, буфер или вспомогательное вещество, подходящие для генной терапии, содержат липосому, наночастицу или проникающий в клетки пептид. В некоторых

вариантах осуществления, буфер или вспомогательное вещество, подходящие для генной терапии содержат белок вирусной оболочки. В некоторых вариантах осуществления, белок вирусной оболочки выбран из группы, состоящей из белка оболочки вируса везикулярного стоматита, белка оболочки аденовируса, белка оболочки аденоассоциированного вируса, белка оболочки вируса лейкоза мышей, белка оболочки ВИЧ и белка оболочки вируса гриппа.

[0023] В дополнительных аспектах предложены композиции, содержащие (a) нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, содержащий сигнальный пептид и терапевтический белок; и (b) буфер или вспомогательное вещество, подходящие для генной терапии. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид содержит сигнальный пептид, связывающий иммуноглобулин (BiP). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит пептид варианта IGF2. В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит линкер. В некоторых вариантах осуществления, линкер состоит из 5-20 аминокислот, 5-15 аминокислот, 5-10 аминокислот, 8-12 аминокислот или около 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18), GGGGS (SEQ ID NO: 19), GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 21), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37) или GGS GSGSTS (SEQ ID NO: 33). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность участка внутренней посадки рибосомы вируса паралича сверчка (CrPV IRES). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность Козак. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит по меньшей мере один фермент из группы, состоящей из альфа-галактозидазы (A или B), β -галактозидазы, β -гексозаминидазы (A или B), галактозилцерамидазы, арилсульфатазы (A или B), β -глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидазы, лизосомальной кислой липазы, лизосомального фермента кислой сфингомиелиназы, формилглицин-образующего фермента, идуронидазы (например, альфа-L), ацетил-КоА:альфа-глюкозаминид-N-ацетилтрансферазы,

гликозаминогликан альфа-L-идуриногидролазы, гепаран-N-сульфатазы, N-ацетил- α -D-глюкозаминидазы (NAGLU), идуронат-2-сульфатазы, галактозамин-6-сульфатсульфатазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, гликозаминогликан N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы, β -глюкуронидазы, гиалуронидазы, альфа-N-ацетилнейраминидазы (сиалидазы), ганглиозидсиалидазы, фосфотрансферазы, альфа-глюкозидазы, альфа-D-маннозидазы, бета-D-маннозидазы, аспартилглюкозаминидазы, альфа-L-фукозидазы, баттенина, пальмитоил-протеинтиоэстераз и других связанных с болезнью Баттена белков (например, белка 6 нейронального цероидного липофусциноза) или их ферментативно активного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит альфа-глюкозидазу или ее ферментативно активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой N-ацетил- α -D-глюкозаминидазу (NAGLU). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит промотор. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота содержится в вирусном векторе. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор содержит ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, лентивирус или вирус герпеса. В некоторых вариантах осуществления, буфер или вспомогательное вещество, подходящие для генной терапии, содержат липосому, наночастицу или проникающий в клетки пептид. В некоторых вариантах осуществления, буфер или вспомогательное вещество, подходящие для генной терапии содержат белок вирусной оболочки. В некоторых вариантах осуществления, белок вирусной оболочки выбран из группы, состоящей из белка оболочки вируса везикулярного стоматита, белка оболочки аденовируса, белка оболочки аденоассоциированного вируса, белка оболочки вируса лейкоза мышей, белка оболочки ВИЧ и белка оболочки вируса гриппа.

[0024] В дополнительных аспектах предложены композиции, содержащие (a) нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, содержащий терапевтический белок; и (b) буфер или вспомогательное вещество, подходящие для генной терапии, причем нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность участка внутренней посадки рибосомы вируса паралича

сверчка (CrPV IRES). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность Козак. В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит линкер. В некоторых вариантах осуществления, линкер состоит из 5-20 аминокислот, 5-15 аминокислот, 5-10 аминокислот, 8-12 аминокислот или около 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18), GGGGS (SEQ ID NO: 19), GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 21), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37) или GGS GSGSTS (SEQ ID NO: 33). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид содержит сигнальный пептид, связывающий иммуноглобулин (BiP). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит пептид варианта IGF2. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит по меньшей мере один фермент из группы, состоящей из альфа-галактозидазы (А или В), β -галактозидазы, β -гексозаминидазы (А или В), галактозилцерамидазы, арилсульфатазы (А или В), β -глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидазы, лизосомальной кислой липазы, лизосомального фермента кислой сфингомиелиназы, формилглицин-образующего фермента, идуронидазы (например, альфа-L), ацетил-КоА:альфа-глюкозаминид-N-ацетилтрансферазы, гликозаминогликан альфа-L-идуроногидролазы, гепаран-N-сульфатазы, N-ацетил- α -D-глюкозаминидазы (NAGLU), идуронат-2-сульфатазы, галактозамин-6-сульфатсульфатазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, гликозаминогликан N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы, β -глюкуронидазы, гиалуронидазы, альфа-N-ацетилнейраминидазы (сиалидазы), ганглиозидсиалидазы, фосфотрансферазы, альфа-глюкозидазы, альфа-D-маннозидазы, бета-D-маннозидазы, аспартилглюкозаминидазы, альфа-L-фукозидазы, баттенина, пальмитоил-протеинтиоэстераз и других связанных с болезнью Баттена белков (например, белка 6 нейронального цероидного липофусциноза) или их ферментативно активного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит альфа-глюкозидазу или ее ферментативно активный фрагмент. В

некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой N-ацетил- α -D-глюкозаминидазу (NAGLU). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит промотор. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота содержится в вирусном векторе. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор содержит ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, лентивирус или вирус герпеса. В некоторых вариантах осуществления, буфер или вспомогательное вещество, подходящие для генной терапии, содержат липосому, наночастицу или проникающий в клетки пептид. В некоторых вариантах осуществления, буфер или вспомогательное вещество, подходящие для генной терапии содержат белок вирусной оболочки. В некоторых вариантах осуществления, белок вирусной оболочки выбран из группы, состоящей из белка оболочки вируса везикулярного стоматита, белка оболочки аденовируса, белка оболочки аденоассоциированного вируса, белка оболочки вируса лейкоза мышей, белка оболочки ВИЧ и белка оболочки вируса гриппа.

[0025] В дополнительных аспектах предложены композиции, содержащие (a) нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, содержащий терапевтический белок; и (b) буфер или вспомогательное вещество, подходящие для генной терапии, причем нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность Козак. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность участка внутренней посадки рибосомы вируса паралича сверчка (CrPV IRES). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит линкер. В некоторых вариантах осуществления, линкер состоит из 5-20 аминокислот, 5-15 аминокислот, 5-10 аминокислот, 8-12 аминокислот или около 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18), GGGGS (SEQ ID NO: 19), GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 21), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37) или GGSGSGSTS (SEQ ID NO: 33). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид

содержит сигнальный пептид, связывающий иммуноглобулин (BiP). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит пептид варианта IGF2. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит по меньшей мере один фермент из группы, состоящей из альфа-галактозидазы (А или В), β -галактозидазы, β -гексозаминидазы (А или В), галактозилцерамидазы, арилсульфатазы (А или В), β -глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидазы, лизосомальной кислой липазы, лизосомального фермента кислой сфингомиелиназы, формилглицин-образующего фермента, идуронидазы (например, альфа-L), ацетил-КоА:альфа-глюкозаминид-N-ацетилтрансферазы, гликозаминогликан альфа-L-идуроногидролазы, гепаран-N-сульфатазы, N-ацетил- α -D-глюкозаминидазы (NAGLU), идуронат-2-сульфатазы, галактозамин-6-сульфатсульфатазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, гликозаминогликан N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы, β -глюкуронидазы, гиалуронидазы, альфа-N-ацетилнейраминидазы (сиалидазы), ганглиозидсиалидазы, фосфотрансферазы, альфа-глюкозидазы, альфа-D-маннозидазы, бета-D-маннозидазы, аспартилглюкозаминидазы, альфа-L-фукозидазы, баттенина, пальмитоил-протеинтиоэстераз и других связанных с болезнью Баттена белков (например, белка 6 нейронального цероидного липофусциноза) или их ферментативно активного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит альфа-глюкозидазу или ее ферментативно активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой N-ацетил- α -D-глюкозаминидазу (NAGLU). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит промотор. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота содержится в вирусном векторе. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор содержит ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, лентивирус или вирус герпеса. В некоторых вариантах осуществления, буфер или вспомогательное вещество, подходящие для генной терапии, содержат липосому, наночастицу или проникающий в клетки пептид. В некоторых вариантах осуществления, буфер или вспомогательное вещество, подходящие для генной терапии содержат белок вирусной оболочки. В некоторых вариантах

осуществления, белок вирусной оболочки выбран из группы, состоящей из белка оболочки вируса везикулярного стоматита, белка оболочки аденовируса, белка оболочки аденоассоциированного вируса, белка оболочки вируса лейкоза мышей, белка оболочки ВИЧ и белка оболочки вируса гриппа.

[0026] В дополнительных аспектах предложены способы лечения генетического расстройства у индивидуума, включающие введение композиции, содержащей (a) нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, содержащий пептид варианта IGF2 и терапевтический белок; и (b) буфер или вспомогательное вещество, подходящие для генной терапии. В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит линкер. В некоторых вариантах осуществления, линкер состоит из 5-20 аминокислот, 5-15 аминокислот, 5-10 аминокислот, 8-12 аминокислот или около 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18), GGGGS (SEQ ID NO: 19), GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 21), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37) или GGS GSGSTS (SEQ ID NO: 33). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид содержит сигнальный пептид, связывающий иммуноглобулин (BiP). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность участка внутренней посадки рибосомы вируса паралича сверчка (CrPV IRES). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность Козак. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит по меньшей мере один фермент из группы, состоящей из альфа-галактозидазы (A или B), β -галактозидазы, β -гексозаминидазы (A или B), галактозилцерамидазы, арилсульфатазы (A или B), β -глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидазы, лизосомальной кислой липазы, лизосомального фермента кислой сфингомиелиназы, формилглицин-образующего фермента, идуронидазы (например, альфа-L), ацетил-КоА:альфа-глюкозаминид-N-ацетилтрансферазы, гликозаминогликан альфа-L-идуроногидролазы, гепаран-N-сульфатазы, N-

ацетил- α -D-глюкозаминидазы (NAGLU), идуронат-2-сульфатазы, галактозамин-6-сульфатсульфатазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, гликозаминогликан N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы, β -глюкуронидазы, гиалуронидазы, альфа-N-ацетилнейраминидазы (сиалидазы), ганглиозидсиалидазы, фосфотрансферазы, альфа-глюкозидазы, альфа-D-маннозидазы, бета-D-маннозидазы, аспартилглюкозаминидазы, альфа-L-фукозидазы, баттенина, пальмитоил-протеинтиоэстераз и других связанных с болезнью Баттена белков (например, белка 6 нейронального цероидного липофусциноза) или их ферментативно активного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит альфа-глюкозидазу или ее ферментативно активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой N-ацетил- α -D-глюкозаминидазу (NAGLU). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит промотор. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота содержится в вирусном векторе. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор содержит ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, лентивирус или вирус герпеса. В некоторых вариантах осуществления, буфер или вспомогательное вещество, подходящие для генной терапии, содержат липосому, наночастицу или проникающий в клетки пептид. В некоторых вариантах осуществления, буфер или вспомогательное вещество, подходящие для генной терапии содержат белок вирусной оболочки. В некоторых вариантах осуществления, белок вирусной оболочки выбран из группы, состоящей из белка оболочки вируса везикулярного стоматита, белка оболочки аденовируса, белка оболочки аденоассоциированного вируса, белка оболочки вируса лейкоза мышей, белка оболочки ВИЧ и белка оболочки вируса гриппа. В некоторых вариантах осуществления, генетическое расстройство представляет собой лизосомальную болезнь накопления. В некоторых вариантах осуществления, генетическое нарушение выбран из группы, состоящей из аспартилглюкозаминурии, болезни Баттена, цистиноза, болезни Фабри, болезни Гоше I типа, болезни Гоше II типа, болезни Гоше III типа, болезни Помпе, болезни Тея Сакса, болезни Сандхоффа, метахроматической лейкодистрофии,

муколипидоза I типа, муколипидоза II типа, муколипидоза III типа, муколипидоза типа IV, болезни Гурлера, болезни Хантера, болезни Санфилиппо типа A, болезни Санфилиппо типа B, болезни Санфилиппо типа C, болезни Санфилиппо типа D, болезни Моркио типа A, болезни Моркио типа B, болезни Марото — Лами, болезни Слая, болезни Ниманна — Пика типа A, болезни Ниманна — Пика типа B, болезни Ниманна — Пика типа C1, болезни Ниманна — Пика типа C2, болезни Шиндлера типа I, болезни Шиндлера типа II, аденозиндезаминазного тяжелого комбинированного иммунодефицита (ADA-SCID) и хронической гранулематозной болезни (CGD). В некоторых вариантах осуществления, клетки индивидуума обрабатывают *ex vivo* и вводят индивидууму после обработки *ex vivo*.

[0027] В дополнительных аспектах предложены способы лечения генетического расстройства у индивидуума, включающие введение композиции, содержащей (a) нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, содержащий сигнальный пептид и терапевтический белок; и (b) буфер или вспомогательное вещество, подходящие для генной терапии. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид содержит сигнальный пептид, связывающий иммуноглобулин (BiP). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит линкер. В некоторых вариантах осуществления, линкер состоит из 5-20 аминокислот, 5-15 аминокислот, 5-10 аминокислот, 8-12 аминокислот или около 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18), GGGGS (SEQ ID NO: 19), GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 21), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37) или GGSGSGSTS (SEQ ID NO: 33). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит пептид варианта IGF2. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность участка внутренней посадки рибосомы вируса паралича сверчка (CrPV IRES). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность Козак. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит по

меньшей мере один фермент из группы, состоящей из альфа-галактозидазы (А или В), β -галактозидазы, β -гексозаминидазы (А или В), галактозилцерамидазы, арилсульфатазы (А или В), β -глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидазы, лизосомальной кислой липазы, лизосомального фермента кислой сфингомиелиназы, формилглицин-образующего фермента, идуронидазы (например, альфа-L), ацетил-КоА:альфа-глюкозаминид-N-ацетилтрансферазы, гликозаминогликан альфа-L-идуроногидролазы, гепаран-N-сульфатазы, N-ацетил- α -D-глюкозаминидазы (NAGLU), идуронат-2-сульфатазы, галактозамин-6-сульфатсульфатазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, гликозаминогликан N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы, β -глюкуронидазы, гиалуронидазы, альфа-N-ацетилнейраминидазы (сиалидазы), ганглиозидсиалидазы, фосфотрансферазы, альфа-глюкозидазы, альфа-D-маннозидазы, бета-D-маннозидазы, аспартилглюкозаминидазы, альфа-L-фукозидазы, баттенина, пальмитоил-протеинтиоэстераз и других связанных с болезнью Баттена белков (например, белка 6 нейронального цероидного липофусциноза) или их ферментативно активного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит альфа-глюкозидазу или ее ферментативно активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой N-ацетил- α -D-глюкозаминидазу (NAGLU). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит промотор. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота содержится в вирусном векторе. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор содержит ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, лентивирус или вирус герпеса. В некоторых вариантах осуществления, буфер или вспомогательное вещество, подходящие для генной терапии, содержат липосому, наночастицу или проникающий в клетки пептид. В некоторых вариантах осуществления, буфер или вспомогательное вещество, подходящие для генной терапии содержат белок вирусной оболочки. В некоторых вариантах осуществления, белок вирусной оболочки выбран из группы, состоящей из белка оболочки вируса везикулярного стоматита, белка оболочки аденовируса, белка оболочки аденоассоциированного вируса, белка оболочки вируса лейкоза

мышей, белка оболочки ВИЧ и белка оболочки вируса гриппа. В некоторых вариантах осуществления, генетическое расстройство представляет собой лизосомальную болезнь накопления. В некоторых вариантах осуществления, генетическое нарушение выбран из группы, состоящей из аспартилглюкозаминурии, болезни Баттена, цистиноза, болезни Фабри, болезни Гоше I типа, болезни Гоше II типа, болезни Гоше III типа, болезни Помпе, болезни Тея Сакса, болезни Сандхоффа, метахроматической лейкодистрофии, муколипидоза I типа, муколипидоза II типа, муколипидоза III типа, муколипидоза типа IV, болезни Гурлера, болезни Хантера, болезни Санфилиппо типа A, болезни Санфилиппо типа B, болезни Санфилиппо типа C, болезни Санфилиппо типа D, болезни Моркио типа A, болезни Моркио типа B, болезни Марото — Лами, болезни Слая, болезни Ниманна — Пика типа A, болезни Ниманна — Пика типа B, болезни Ниманна — Пика типа C1, болезни Ниманна — Пика типа C2, болезни Шиндлера типа I, болезни Шиндлера типа II, аденозиндезаминазного тяжелого комбинированного иммунодефицита (ADA-SCID) и хронической гранулематозной болезни (CGD). В некоторых вариантах осуществления, клетки индивидуума обрабатывают *ex vivo* и вводят индивидууму после обработки *ex vivo*.

[0028] В дополнительных аспектах предложены способы лечения генетического расстройства у индивидуума, включающие введение композиции, содержащей (a) нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, содержащий терапевтический белок; и (b) буфер или вспомогательное вещество, подходящие для генной терапии, причем нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность участка внутренней посадки рибосомы вируса паралича сверчка (CrPV IRES). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность Козак. В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит линкер. В некоторых вариантах осуществления, линкер состоит из 5-20 аминокислот, 5-15 аминокислот, 5-10 аминокислот, 8-12 аминокислот или около 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18), GGGGS

(SEQ ID NO: 19), GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 21), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37) или GGS GSGSTS (SEQ ID NO: 33). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид содержит сигнальный пептид, связывающий иммуноглобулин (BiP). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит пептид варианта IGF2. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит по меньшей мере один фермент из группы, состоящей из альфа-галактозидазы (А или В), β -галактозидазы, β -гексозаминидазы (А или В), галактозилщерамидазы, арилсульфатазы (А или В), β -глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидазы, лизосомальной кислой липазы, лизосомального фермента кислой сфингомиелиназы, формилглицин-образующего фермента, идуронидазы (например, альфа-L), ацетил-КоА:альфа-глюкозаминид-N-ацетилтрансферазы, гликозаминогликан альфа-L-идуроногидролазы, гепаран-N-сульфатазы, N-ацетил- α -D-глюкозаминидазы (NAGLU), идуронат-2-сульфатазы, галактозамин-6-сульфатсульфатазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, гликозаминогликан N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы, β -глюкуронидазы, гиалуронидазы, альфа-N-ацетилнейраминидазы (сиалидазы), ганглиозидсиалидазы, фосфотрансферазы, альфа-глюкозидазы, альфа-D-маннозидазы, бета-D-маннозидазы, аспартилглюкозаминидазы, альфа-L-фукозидазы, баттенина, пальмитоил-протеинтиоэстераз и других связанных с болезнью Баттена белков (например, белка 6 нейронального цероидного липофусциноза) или их ферментативно активного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит альфа-глюкозидазу или ее ферментативно активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой N-ацетил- α -D-глюкозаминидазу (NAGLU). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит промотор. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота содержится в вирусном векторе. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор содержит ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, лентивирус или вирус герпеса. В некоторых вариантах осуществления, буфер или

вспомогательное вещество, подходящие для генной терапии, содержат липосому, наночастицу или проникающий в клетки пептид. В некоторых вариантах осуществления, буфер или вспомогательное вещество, подходящие для генной терапии содержат белок вирусной оболочки. В некоторых вариантах осуществления, белок вирусной оболочки выбран из группы, состоящей из белка оболочки вируса везикулярного стоматита, белка оболочки аденовируса, белка оболочки аденоассоциированного вируса, белка оболочки вируса лейкоза мышей, белка оболочки ВИЧ и белка оболочки вируса гриппа. В некоторых вариантах осуществления, генетическое расстройство представляет собой лизосомальную болезнь накопления. В некоторых вариантах осуществления, генетическое нарушение выбран из группы, состоящей из аспартилглюкозаминурии, болезни Баттена, цистиноза, болезни Фабри, болезни Гоше I типа, болезни Гоше II типа, болезни Гоше III типа, болезни Помпе, болезни Тея Сакса, болезни Сандхоффа, метахроматической лейкодистрофии, муколипидоза I типа, муколипидоза II типа, муколипидоза III типа, муколипидоза типа IV, болезни Гурлера, болезни Хантера, болезни Санфилиппо типа A, болезни Санфилиппо типа B, болезни Санфилиппо типа C, болезни Санфилиппо типа D, болезни Моркио типа A, болезни Моркио типа B, болезни Марото — Лами, болезни Слая, болезни Ниманна — Пика типа A, болезни Ниманна — Пика типа B, болезни Ниманна — Пика типа C1, болезни Ниманна — Пика типа C2, болезни Шиндлера типа I, болезни Шиндлера типа II, аденозиндезаминазного тяжелого комбинированного иммунодефицита (ADA-SCID) и хронической гранулематозной болезни (CGD). В некоторых вариантах осуществления, клетки индивидуума обрабатывают *ex vivo* и вводят индивидууму после обработки *ex vivo*.

[0029] В дополнительных аспектах предложены способы лечения генетического расстройства у индивидуума, включающие введение композиции, содержащей (a) нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, содержащий терапевтический белок; и (b) буфер или вспомогательное вещество, подходящие для генной терапии, причем нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность Козак. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая

кислота дополнительно содержит последовательность участка внутренней посадки рибосомы вируса паралича сверчка (CrPV IRES). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид содержит сигнальный пептид, связывающий иммуноглобулин (BiP). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит пептид варианта IGF2. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит по меньшей мере один фермент из группы, состоящей из альфа-галактозидазы (А или В), β -галактозидазы, β -гексозаминидазы (А или В), галактозилщерамидазы, арилсульфатазы (А или В), β -глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидазы, лизосомальной кислой липазы, лизосомального фермента кислой сфингомиелиназы, формилглицин-образующего фермента, идуронидазы (например, альфа-L), ацетил-КоА:альфа-глюкозаминид-N-ацетилтрансферазы, гликозаминогликан альфа-L-идуроногидролазы, гепаран-N-сульфатазы, N-ацетил- α -D-глюкозаминидазы (NAGLU), идуронат-2-сульфатазы, галактозамин-6-сульфатсульфатазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, гликозаминогликан N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы, β -глюкуронидазы, гиалуронидазы, альфа-N-ацетилнейраминидазы (сиалидазы), ганглиозидсиалидазы, фосфотрансферазы, альфа-глюкозидазы, альфа-D-маннозидазы, бета-D-маннозидазы, аспартилглюкозаминидазы, альфа-L-фукозидазы, баттенина, пальмитоил-протеинтиоэстераз и других связанных с болезнью Баттена белков (например, белка 6 нейронального цероидного липофусциноза) или их ферментативно активного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит альфа-глюкозидазу или ее ферментативно активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой N-ацетил- α -D-глюкозаминидазу (NAGLU). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит промотор. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота содержится в вирусном векторе. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор содержит ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, лентивирус или вирус герпеса. В некоторых вариантах осуществления, буфер или

вспомогательное вещество, подходящие для генной терапии, содержат липосому, наночастицу или проникающий в клетки пептид. В некоторых вариантах осуществления, буфер или вспомогательное вещество, подходящие для генной терапии содержат белок вирусной оболочки. В некоторых вариантах осуществления, белок вирусной оболочки выбран из группы, состоящей из белка оболочки вируса везикулярного стоматита, белка оболочки аденовируса, белка оболочки аденоассоциированного вируса, белка оболочки вируса лейкоза мышей, белка оболочки ВИЧ и белка оболочки вируса гриппа. В некоторых вариантах осуществления, генетическое расстройство представляет собой лизосомальную болезнь накопления. В некоторых вариантах осуществления, генетическое нарушение выбран из группы, состоящей из аспартилглюкозаминурии, болезни Баттена, цистиноза, болезни Фабри, болезни Гоше I типа, болезни Гоше II типа, болезни Гоше III типа, болезни Помпе, болезни Тея Сакса, болезни Сандхоффа, метахроматической лейкодистрофии, муколипидоза I типа, муколипидоза II типа, муколипидоза III типа, муколипидоза типа IV, болезни Гурлера, болезни Хантера, болезни Санфилиппо типа A, болезни Санфилиппо типа B, болезни Санфилиппо типа C, болезни Санфилиппо типа D, болезни Моркио типа A, болезни Моркио типа B, болезни Марото — Лами, болезни Слая, болезни Ниманна — Пика типа A, болезни Ниманна — Пика типа B, болезни Ниманна — Пика типа C1, болезни Ниманна — Пика типа C2, болезни Шиндлера типа I, болезни Шиндлера типа II, аденозиндезаминазного тяжелого комбинированного иммунодефицита (ADA-SCID) и хронической гранулематозной болезни (CGD). В некоторых вариантах осуществления, клетки индивидуума обрабатывают *ex vivo* и вводят индивидууму после обработки *ex vivo*.

[0030] В дополнительных аспектах предложены способы лечения генетического расстройства у индивидуума, включающие введение клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, содержащий пептид варианта IGF2 и терапевтический белок. В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит линкер. В некоторых вариантах осуществления, линкер состоит из 5-20 аминокислот, 5-15 аминокислот, 5-10

аминокислот, 8-12 аминокислот или около 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18), GGGGS (SEQ ID NO: 19), GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 21), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37) или GGSGSGSTS (SEQ ID NO: 33). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид содержит сигнальный пептид, связывающий иммуноглобулин (BiP). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность участка внутренней посадки рибосомы вируса паралича свертка (CtPV IRES). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность Козак. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит по меньшей мере один фермент из группы, состоящей из альфа-галактозидазы (А или В), β-галактозидазы, β-гексозаминидазы (А или В), галактозилцерамидазы, арилсульфатазы (А или В), β-глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидазы, лизосомальной кислой липазы, лизосомального фермента кислой сфингомиелиназы, формилглицин-образующего фермента, идуронидазы (например, альфа-L), ацетил-КоА:альфа-глюкозаминид-N-ацетилтрансферазы, гликозаминогликан альфа-L-идуроногидролазы, гепаран-N-сульфатазы, N-ацетил-α-D-глюкозаминидазы (NAGLU), идуронат-2-сульфатазы, галактозамин-6-сульфатсульфатазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, гликозаминогликан N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы, β-глюкуронидазы, гиалуронидазы, альфа-N-ацетилнейраминидазы (сиалидазы), ганглиозидсиалидазы, фосфотрансферазы, альфа-глюкозидазы, альфа-D-маннозидазы, бета-D-маннозидазы, аспартилглюкозаминидазы, альфа-L-фукозидазы, баттенина, пальмитоил-протеинтиоэстераз и других связанных с болезнью Баттена белков (например, белка 6 нейронального цероидного липофусциноза) или их ферментативно активного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит альфа-глюкозидазу или ее ферментативно активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой

N-ацетил- α -D-глюкозаминидазу (NAGLU). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит промотор. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота содержится в вирусном векторе. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор содержит ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, лентивирус или вирус герпеса. В некоторых вариантах осуществления, буфер или вспомогательное вещество, подходящие для генной терапии, содержат липосому, наночастицу или проникающий в клетки пептид. В некоторых вариантах осуществления, буфер или вспомогательное вещество, подходящие для генной терапии содержат белок вирусной оболочки. В некоторых вариантах осуществления, белок вирусной оболочки выбран из группы, состоящей из белка оболочки вируса везикулярного стоматита, белка оболочки аденовируса, белка оболочки аденоассоциированного вируса, белка оболочки вируса лейкоза мышей, белка оболочки ВИЧ и белка оболочки вируса гриппа. В некоторых вариантах осуществления, генетическое расстройство представляет собой лизосомальную болезнь накопления. В некоторых вариантах осуществления, генетическое нарушение выбран из группы, состоящей из аспартилглюкозаминурии, болезни Баттена, цистиноза, болезни Фабри, болезни Гоше I типа, болезни Гоше II типа, болезни Гоше III типа, болезни Помпе, болезни Тея Сакса, болезни Сандхоффа, метахроматической лейкодистрофии, муколипидоза I типа, муколипидоза II типа, муколипидоза III типа, муколипидоза типа IV, болезни Гурлера, болезни Хантера, болезни Санфилиппо типа A, болезни Санфилиппо типа B, болезни Санфилиппо типа C, болезни Санфилиппо типа D, болезни Моркио типа A, болезни Моркио типа B, болезни Марото — Лами, болезни Слая, болезни Ниманна — Пика типа A, болезни Ниманна — Пика типа B, болезни Ниманна — Пика типа C1, болезни Ниманна — Пика типа C2, болезни Шиндлера типа I, болезни Шиндлера типа II, аденозиндезаминазного тяжелого комбинированного иммунодефицита (ADA-SCID) и хронической гранулематозной болезни (CGD). В некоторых вариантах осуществления, клетки получены от индивидуума.

[0031] В дополнительных аспектах предложены способы лечения генетического расстройства у индивидуума, включающие введение клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, содержащий сигнальный пептид и терапевтический белок. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид содержит сигнальный пептид, связывающий иммуноглобулин (BiP). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит линкер. В некоторых вариантах осуществления, линкер состоит из 5-20 аминокислот, 5-15 аминокислот, 5-10 аминокислот, 8-12 аминокислот или около 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18), GGGGS (SEQ ID NO: 19), GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 21), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37) или GGS GSGSTS (SEQ ID NO: 33). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит пептид варианта IGF2. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность участка внутренней посадки рибосомы вируса паралича сверчка (CrPV IRES). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность Козак. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит по меньшей мере один фермент из группы, состоящей из альфа-галактозидазы (А или В), β -галактозидазы, β -гексозаминидазы (А или В), галактозилцерамидазы, арилсульфатазы (А или В), β -глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидазы, лизосомальной кислой липазы, лизосомального фермента кислой сфингомиелиназы, формилглицин-образующего фермента, идуронидазы (например, альфа-L), ацетил-КоА:альфа-глюкозаминид-N-ацетилтрансферазы, гликозаминогликан альфа-L-идуроногидролазы, гепаран-N-сульфатазы, N-ацетил- α -D-глюкозаминидазы (NAGLU), идуронат-2-сульфатазы, галактозамин-6-сульфатсульфатазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, гликозаминогликан N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы, β -глюкуронидазы, гиалуронидазы, альфа-N-ацетилнейраминидазы (сиалидазы), ганглиозидсиалидазы, фосфотрансферазы, альфа-глюкозидазы, альфа-D-маннозидазы, бета-D-маннозидазы,

аспартилглюкозаминидазы, альфа-L-фукозидазы, баттенина, пальмитоил-протеинтиоэстераз и других связанных с болезнью Баттена белков (например, белка 6 нейронального цероидного липофусциноза) или их ферментативно активного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит альфа-глюкозидазу или ее ферментативно активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой N-ацетил- α -D-глюкозаминидазу (NAGLU). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит промотор. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота содержится в вирусном векторе. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор содержит ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, лентивирус или вирус герпеса. В некоторых вариантах осуществления, буфер или вспомогательное вещество, подходящие для генной терапии, содержат липосому, наночастицу или проникающий в клетки пептид. В некоторых вариантах осуществления, буфер или вспомогательное вещество, подходящие для генной терапии содержат белок вирусной оболочки. В некоторых вариантах осуществления, белок вирусной оболочки выбран из группы, состоящей из белка оболочки вируса везикулярного стоматита, белка оболочки аденовируса, белка оболочки аденоассоциированного вируса, белка оболочки вируса лейкоза мышей, белка оболочки ВИЧ и белка оболочки вируса гриппа. В некоторых вариантах осуществления, генетическое расстройство представляет собой лизосомальную болезнь накопления. В некоторых вариантах осуществления, генетическое нарушение выбран из группы, состоящей из аспартилглюкозаминурии, болезни Баттена, цистиноза, болезни Фабри, болезни Гоше I типа, болезни Гоше II типа, болезни Гоше III типа, болезни Помпе, болезни Тея Сакса, болезни Сандхоффа, метахроматической лейкодистрофии, муколипидоза I типа, муколипидоза II типа, муколипидоза III типа, муколипидоза типа IV, болезни Гурлера, болезни Хантера, болезни Санфилиппо типа A, болезни Санфилиппо типа B, болезни Санфилиппо типа C, болезни Санфилиппо типа D, болезни Моркио типа A, болезни Моркио типа B, болезни Марото — Лами, болезни Слая, болезни Ниманна — Пика типа A, болезни

Ниманна — Пика типа В, болезни Ниманна — Пика типа С1, болезни Ниманна — Пика типа С2, болезни Шиндлера типа I, болезни Шиндлера типа II, аденозиндезаминазного тяжелого комбинированного иммунодефицита (ADA-SCID) и хронической гранулематозной болезни (CGD). В некоторых вариантах осуществления, клетки получены от индивидуума.

[0032] В дополнительных аспектах предложены способы лечения генетического расстройства у индивидуума, включающие введение клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, содержащий терапевтический белок, причем нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность участка внутренней посадки рибосомы вируса паралича сверчка (CtPV IRES). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность Козак. В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит линкер. В некоторых вариантах осуществления, линкер состоит из 5-20 аминокислот, 5-15 аминокислот, 5-10 аминокислот, 8-12 аминокислот или около 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18), GGGGS (SEQ ID NO: 19), GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 21), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37) или GGSGSGSTS (SEQ ID NO: 33). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид содержит сигнальный пептид, связывающий иммуноглобулин (BiP). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит пептид варианта IGF2. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит по меньшей мере один фермент из группы, состоящей из альфа-галактозидазы (А или В), β -галактозидазы, β -гексозаминидазы (А или В), галактозилщерамидазы, арилсульфатазы (А или В), β -глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидазы, лизосомальной кислой липазы, лизосомального фермента кислой сфингомиелиназы, формилглицин-образующего фермента, идуронидазы (например, альфа-L), ацетил-КоА:альфа-глюкозаминид-N-ацетилтрансферазы, гликозаминогликан альфа-L-идуроногидролазы, гепаран-N-сульфатазы, N-

ацетил- α -D-глюкозаминидазы (NAGLU), идуронат-2-сульфатазы, галактозамин-6-сульфатсульфатазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, гликозаминогликан N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы, β -глюкуронидазы, гиалуронидазы, альфа-N-ацетилнейраминидазы (сиалидазы), ганглиозидсиалидазы, фосфотрансферазы, альфа-глюкозидазы, альфа-D-маннозидазы, бета-D-маннозидазы, аспартилглюкозаминидазы, альфа-L-фукозидазы, баттенина, пальмитоил-протеинтиоэстераз и других связанных с болезнью Баттена белков (например, белка 6 нейронального цероидного липофусциноза) или их ферментативно активного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит альфа-глюкозидазу или ее ферментативно активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой N-ацетил- α -D-глюкозаминидазу (NAGLU). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит промотор. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота содержится в вирусном векторе. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор содержит ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, лентивирус или вирус герпеса. В некоторых вариантах осуществления, буфер или вспомогательное вещество, подходящие для генной терапии, содержат липосому, наночастицу или проникающий в клетки пептид. В некоторых вариантах осуществления, буфер или вспомогательное вещество, подходящие для генной терапии содержат белок вирусной оболочки. В некоторых вариантах осуществления, белок вирусной оболочки выбран из группы, состоящей из белка оболочки вируса везикулярного стоматита, белка оболочки аденовируса, белка оболочки аденоассоциированного вируса, белка оболочки вируса лейкоза мышей, белка оболочки ВИЧ и белка оболочки вируса гриппа. В некоторых вариантах осуществления, генетическое расстройство представляет собой лизосомальную болезнь накопления. В некоторых вариантах осуществления, генетическое нарушение выбран из группы, состоящей из аспартилглюкозаминурии, болезни Баттена, цистиноза, болезни Фабри, болезни Гоше I типа, болезни Гоше II типа, болезни Гоше III типа, болезни Помпе, болезни Тея Сакса, болезни Сандхоффа, метахроматической лейкодистрофии,

муколипидоза I типа, муколипидоза II типа, муколипидоза III типа, муколипидоза типа IV, болезни Гурлера, болезни Хантера, болезни Санфилиппо типа A, болезни Санфилиппо типа B, болезни Санфилиппо типа C, болезни Санфилиппо типа D, болезни Моркио типа A, болезни Моркио типа B, болезни Марото — Лами, болезни Слая, болезни Ниманна — Пика типа A, болезни Ниманна — Пика типа B, болезни Ниманна — Пика типа C1, болезни Ниманна — Пика типа C2, болезни Шиндлера типа I, болезни Шиндлера типа II, аденозиндезаминазного тяжелого комбинированного иммунодефицита (ADA-SCID) и хронической гранулематозной болезни (CGD). В некоторых вариантах осуществления, клетки получены от индивидуума.

[0033] В дополнительных аспектах предложены способы лечения генетического расстройства у индивидуума, включающие введение клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, содержащий терапевтический белок, причем нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность Козак. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность участка внутренней посадки рибосомы вируса паралича сверчка (CrPV IRES). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит линкер. В некоторых вариантах осуществления, линкер состоит из 5-20 аминокислот, 5-15 аминокислот, 5-10 аминокислот, 8-12 аминокислот или около 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18), GGGGS (SEQ ID NO: 19), GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 21), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37) или GGSGSGSTS (SEQ ID NO: 33). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид содержит сигнальный пептид, связывающий иммуноглобулин (BiP). В некоторых вариантах осуществления, слитый белок дополнительно содержит пептид варианта IGF2. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит по меньшей мере один фермент из группы, состоящей из альфа-галактозидазы (A или B), β -галактозидазы, β -гексозаминидазы (A или B),

галактозилщерамидазы, арилсульфатазы (А или В), β -глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидазы, лизосомальной кислой липазы, лизосомального фермента кислой сфингомиелиназы, формилглицин-образующего фермента, идуронидазы (например, альфа-L), ацетил-КоА:альфа-глюкозаминид-N-ацетилтрансферазы, гликозаминогликан альфа-L-идуроногидролазы, гепаран-N-сульфатазы, N-ацетил- α -D-глюкозаминидазы (NAGLU), идуронат-2-сульфатазы, галактозамин-6-сульфатсульфатазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, гликозаминогликан N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы, β -глюкуронидазы, гиалуронидазы, альфа-N-ацетилнейраминидазы (сиалидазы), ганглиозидсиалидазы, фосфотрансферазы, альфа-глюкозидазы, альфа-D-маннозидазы, бета-D-маннозидазы, аспартилглюкозаминидазы, альфа-L-фукозидазы, баттенина, пальмитоил-протеинтиоэстераз и других связанных с болезнью Баттена белков (например, белка 6 нейронального цероидного липофусциноза) или их ферментативно активного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок содержит альфа-глюкозидазу или ее ферментативно активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический белок представляет собой N-ацетил- α -D-глюкозаминидазу (NAGLU). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит промотор. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота содержится в вирусном векторе. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор содержит ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, лентивирус или вирус герпеса. В некоторых вариантах осуществления, буфер или вспомогательное вещество подходящие для генной терапии. В некоторых вариантах осуществления, буфер или вспомогательное вещество, подходящие для генной терапии содержат белок вирусной оболочки. В некоторых вариантах осуществления, белок вирусной оболочки выбран из группы, состоящей из белка оболочки вируса везикулярного стоматита, белка оболочки аденовируса, белка оболочки аденоассоциированного вируса, белка оболочки вируса лейкоза мышей, белка оболочки ВИЧ и белка оболочки вируса гриппа. В некоторых вариантах осуществления, генетическое расстройство представляет собой лизосомальную болезнь накопления. В некоторых вариантах осуществления,

генетическое нарушение выбран из группы, состоящей из аспартилглюкозаминурии, болезни Баттена, цистиноза, болезни Фабри, болезни Гоше I типа, болезни Гоше II типа, болезни Гоше III типа, болезни Помпе, болезни Тея Сакса, болезни Сандхоффа, метахроматической лейкодистрофии, муколипидоза I типа, муколипидоза II типа, муколипидоза III типа, муколипидоза типа IV, болезни Гурлера, болезни Хантера, болезни Санфилиппо типа A, болезни Санфилиппо типа B, болезни Санфилиппо типа C, болезни Санфилиппо типа D, болезни Моркио типа A, болезни Моркио типа B, болезни Марото — Лами, болезни Слая, болезни Ниманна — Пика типа A, болезни Ниманна — Пика типа B, болезни Ниманна — Пика типа C1, болезни Ниманна — Пика типа C2, болезни Шиндлера типа I, болезни Шиндлера типа II, аденозиндезаминазного тяжелого комбинированного иммунодефицита (ADA-SCID) и хронической гранулематозной болезни (CGD). В некоторых вариантах осуществления, клетки получены от индивидуума.

[0034] Кроме того, в настоящем документе предложен слитый белок, содержащий нативный сигнальный пептид, домен протеолитического расщепления ER, пептид варианта IGF2 и альфа-глюкозидазу, не имеющую своего нативного сигнального пептида, причем слитый белок кодируется нуклеиновой кислотой, содержащей последовательность Козак.

[0035] Дополнительно в настоящем документе предложен слитый белок, содержащий сигнальный пептид связывающий иммуноглобулин (ViP), пептид варианта IGF2 и альфа-глюкозидазу, причем слитый белок кодируется нуклеиновой кислотой, содержащей последовательность Козак.

[0036] Дополнительно в настоящем документе предложен слитый белок, содержащий сигнальный пептид связывающий иммуноглобулин (ViP), пептид варианта IGF2 и альфа-глюкозидазу, не имеющую своего нативного сигнального пептида, причем слитый белок кодируется нуклеиновой кислотой, содержащей последовательность участка внутренней посадки рибосомы вируса паралича сверчка (CrPV IRES).

[0037] Дополнительно в настоящем документе предложена нуклеиновая кислота, кодирующая слитый белок, содержащий нативный сигнальный пептид, домен протеолитического расщепления ER, пептид варианта IGF2 и альфа-глюкозидазу, не имеющую своего нативного сигнального пептида.

[0038] Дополнительно в настоящем документе предложена нуклеиновая кислота, кодирующая слитый белок, содержащий сигнальный пептид связывающий иммуноглобулин (BiP), пептид варианта IGF2 и альфа-глюкозидазу, не имеющую своего нативного сигнального пептида, причем нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность Козак.

[0039] Дополнительно в настоящем документе предложена нуклеиновая кислота, кодирующая слитый белок, содержащий, пептид варианта IGF2 и альфа-глюкозидазу, причем нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность участка внутренней посадки рибосомы вируса паралича сверчка (CrPV IRES).

[0040] Дополнительно в настоящем документе предложена композиция содержащая (а) нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, содержащий нативный сигнальный пептид, домен протеолитического расщепления ER, пептид варианта IGF2 и альфа-глюкозидазу, не имеющую своего нативного сигнального пептида; и (b) буфер или вспомогательное вещество подходящие для генной терапии.

[0041] Дополнительно в настоящем документе предложена композиция содержащая (а) нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, содержащий сигнальный пептид связывающий иммуноглобулин (BiP), пептид варианта IGF2 и альфа-глюкозидазу, не имеющую своего нативного сигнального пептида, причем нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность Козак; и (b) буфер или вспомогательное вещество подходящие для генной терапии.

[0042] Дополнительно в настоящем документе предложена композиция содержащая (а) нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, содержащий пептид варианта IGF2 и альфа-глюкозидазу, причем нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность участка внутренней посадки рибосомы вируса паралича сверчка (CrPV IRES); и (b) буфер или вспомогательное вещество подходящие для генной терапии.

[0043] Дополнительно в настоящем документе предложен способ лечения болезни Помпе у индивидуума, включающий введение композиции, содержащей (а) нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, содержащий нативный сигнальный пептид, домен протеолитического расщепления ER, пептид варианта IGF2 и альфа-глюкозидазу, не имеющую своего нативного сигнального пептида; и (b) буфер или вспомогательное вещество подходящие для генной терапии.

[0044] Дополнительно в настоящем документе предложен способ лечения болезни Помпе у индивидуума, включающий введение композиции, содержащей (а) нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, содержащий сигнальный пептид связывающий иммуноглобулин (BiP), пептид варианта IGF2 и альфа-глюкозидазу, не имеющую своего нативного сигнального пептида, причем нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность Козак; и (b) буфер или вспомогательное вещество подходящие для генной терапии.

[0045] Дополнительно в настоящем документе предложен способ лечения болезни Помпе у индивидуума, включающий введение композиции, содержащей (а) нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, содержащий пептид варианта IGF2 и альфа-глюкозидазу, причем нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность участка внутренней посадки рибосомы вируса паралича сверчка (CrPV IRES); и (b) буфер или вспомогательное вещество подходящие для генной терапии.

[0046] Дополнительно в настоящем документе предложен способ лечения болезни Помпе у индивидуума, включающий введение клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, содержащий нативный

сигнальный пептид, домен протеолитического расщепления ER, пептид варианта IGF2 и альфа-глюкозидазу, не имеющую своего нативного сигнального пептида.

[0047] Дополнительно в настоящем документе предложен способ лечения болезни Помпе у индивидуума, включающий введение клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, содержащий сигнальный пептид связывающий иммуноглобулин (BiP), пептид варианта IGF2 и альфа-глюкозидазу или ее энзиматически активный фрагмент, причем нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность Козак.

[0048] Дополнительно в настоящем документе предложен способ лечения болезни Помпе у индивидуума, включающий введение клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, содержащий пептид варианта IGF2 и альфа-глюкозидазу, причем нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность участка внутренней посадки рибосомы вируса паралича сверчка (CrPV IRES).

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[0049] Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящее описание посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были специально и индивидуально указаны для включения посредством ссылки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0050] Файл патентной заявки содержит как минимум одну цветную фигуру. Копии этой патентной заявки с цветной фигурой(-ами) будут предоставлены Ведомством по запросу и после уплаты необходимого сбора. Понимание особенностей и преимуществ настоящего описания будет получено путем ссылки на следующее подробное описание, в котором представлены иллюстративные варианты осуществления, в которых используются принципы раскрытия, и сопровождающие графические материалы, в которых:

[0051] Фиг. 1 демонстрирует активность GAA альглюкозидазы-альфа rhGAA с М6Р и без него. Фиг. 1 демонстрирует долю коммерческой ФЗТ, которая способна связываться с CI-MPR. Первый пик представляет собой rhGAA, в которой отсутствуют какие-либо гликаны, содержащие М6Р, и поэтому она не может быть поглощена и доставлена в лизосомы. Второй пик представляет собой фракцию, которая содержит по меньшей мере один фосфорилированный гликан и потенциально может быть поглощена клеткой и доставлена в лизосомы для гидролиза гликогена.

[0052] Фиг. 2 демонстрирует структуру CI-MPR, включая различные связывающие домены для IGF2 и для моно- и бис-фосфорилированных олигосахаридов.

[0053] Фиг. 3 демонстрирует последовательность и структуру зрелого пептида IGF2 человека. Предполагается, что сайт-специфические аминокислотные замены влияют на связывание с другими рецепторами.

[0054] Фиг. 4 демонстрирует связывание IGF2 (wtIGF2) пептида дикого типа с CI-MPR, измеренное с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

[0055] Фиг. 5 демонстрирует связывание варианта IGF2 (vIGF2) пептида с CI-MPR, измеренное с помощью поверхностного плазмонного резонанса..

[0056] Фиг. 6 демонстрирует преимущество добавления vIGF2 к алуглюцидазе альфа для усиления связывания с IGF2/CI-MPR.

[0057] Фиг. 7 демонстрирует преимущество добавления vIGF2 к рекомбинантной N-ацетил- α -D-глюкозаминидазе (rhNAGLU) человека для усиления связывания с IGF2/CI-MPR.

[0058] Фиг. 8 демонстрирует связывание IGF2 человека дикого типа с рецептором инсулина.

[0059] Фиг. 9 демонстрирует отсутствие детектируемого связывания vIGF2 с рецептором инсулина.

[0060] Фиг. 10 демонстрирует связывание IGF2 дикого типа с рецептором инсулиноподобного фактора роста 1.

[0061] Фиг. 11 демонстрирует снижение связывания пептида vIGF2 с рецептором инсулиноподобного фактора роста 1 по сравнению с IGF2 дикого типа.

[0062] Фиг. 12 демонстрирует два примера кассет экспрессии для генной терапии, кодирующих природную hGAA и сконструированную hGAA. Природная hGAA имеет слабое фосфорилирование, что приводит к плохому связыванию с CIMPR и поглощению клетками. Сконструированная hGAA содержит элемент, добавленный для улучшения связывания с CIMPR (vIGF2), линкер 2GS, который снижает стерические затруднения белка vIGF2-GAA с CIMPR, и сигнальный пептид ViP для улучшения секреции.

[0063] Фиг. 13 демонстрирует вестерн-блоттинг PPT1 из клеток, экспрессирующих рекомбинантный PPT1 (PPT1-1) человека, рекомбинантный PPT1 человека, имеющий нацеливающий домен vIGF2 (PPT1-2), и рекомбинантный PPT1 человека, имеющий нацеливающий домен vIGF2 и сигнальную последовательность ViP (PPT1-29).

[0064] Фиг. 14 демонстрирует связывание конструкций PPT1 с CI-MPR.

[0065] Фиг. 15 демонстрирует активность GAA в кондиционированной среде клеток CHO, экспрессирующих сконструированную или природную hGAA.

[0066] Фиг. 16 демонстрирует дизайн 4-недельного исследования генной терапии на мышах с нокаутом GAA.

[0067] Фиг. 17 демонстрирует GAA активность в плазме у необработанных мышей дикого типа («Нормальный») или мышей с нокаутом GAA, обработанных векторами генной терапии или носителем, как указано.

[0068] Фиг. 18 демонстрирует уровни GAA, измеренные у необработанных мышей дикого типа («Нормальный») или мышей с нокаутом GAA, обработанных векторами генной терапии или носителем, как указано.

[0069] Фиг. 19 демонстрирует связывание ghGAA с рецептором клеточной поверхности из образцов плазмы, полученных от обработанных мышей, как указано.

[0070] Фиг. 20 демонстрирует активность GAA и четырехкратную гистопатологическую оценку гликогена в передней большеберцовой мышце необработанных мышей дикого типа («Нормальный») или мышей с нокаутом GAA, обработанных векторами генной терапии или носителем, как указано.

[0071] Фиг. 21 демонстрирует ШИК-реакцию гликогена в передней большеберцовой мышце необработанных мышей дикого типа («Нормальный») или мышей с нокаутом GAA, обработанных векторами генной терапии или носителем, как указано.

[0072] Фиг. 22 демонстрирует иммуногистохимический анализ hGAA в передней большеберцовой мышце необработанных мышей дикого типа («Нормальный») или мышей с нокаутом GAA, обработанных векторами генной терапии или носителем, как указано.

[0073] Фиг. 23 демонстрирует гистопатологическую оценку активности GAA головного мозга, уровня гликогена в головном мозге и уровня гликогена в спинном мозге для головного и спинного мозга необработанных мышей дикого типа («Нормальный») или мышей с нокаутом GAA, обработанных векторами генной терапии или носителем, как указано.

[0074] Фиг. 24 демонстрирует ШИК-реакцию гликогена в головном мозге необработанных мышей дикого типа («Нормальный») или мышей с нокаутом GAA, обработанных векторами генной терапии или носителем, как указано.

[0075] Фиг. 25 демонстрирует иммуногистохимический анализ hGAA в стволе головного мозга и сосудистого сплетения от необработанных мышей дикого типа («Нормальный») или мышей с нокаутом GAA, обработанных векторами генной терапии или носителем, как указано.

[0076] Фиг. 26 демонстрирует ШИК-реакцию гликогена в спинном мозге необработанных мышей дикого типа или мышей с нокаутом GAA, обработанных векторами генной терапии или носителем, как указано.

[0077] Фиг. 27 демонстрирует иммуногистохимический анализ hGAA в спинном мозге необработанных мышей дикого типа или мышей с нокаутом GAA, обработанных векторами генной терапии или носителем, как указано.

[0078] Фиг. 28 демонстрирует активность GAA квадрицепсов и гистопатологическую оценку гликогена у необработанных мышей дикого типа («Нормальный») или мышей с нокаутом GAA, обработанных векторами генной терапии или носителем, как указано.

[0079] Фиг. 29 демонстрирует реакцию при окрашивании luxol/ШИК-реакцию гликогена в квадрицепсах необработанных мышей дикого типа или мышей с нокаутом GAA, обработанных векторами генной терапии или носителем, как указано.

[0080] Фиг. 30 демонстрирует иммуногистохимический анализ hGAA в квадрицепсах необработанных мышей дикого типа или мышей с нокаутом GAA, обработанных векторами генной терапии или носителем, как указано.

[0081] Фиг. 31 демонстрирует активность GAA трицепсов и гистопатологическую оценку у необработанных мышей дикого типа («Нормальный») или мышей с нокаутом GAA, обработанных векторами генной терапии или носителем, как указано.

[0082] Фиг. 32 демонстрирует реакцию при окрашивании luxol/ШИК-реакцию гликогена в трицепсах необработанных мышей дикого типа или мышей с

нокаутом GAA, обработанных векторами генной терапии или носителем, как указано.

[0083] Фиг. 33 демонстрирует иммуногистохимический анализ hGAA в трицепсах необработанных мышей дикого типа или мышей с нокаутом GAA, обработанных векторами генной терапии или носителем, как указано.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0084] Генная терапия одногенных генетических расстройств представляет собой потенциальное однократное лечение заболеваний и расстройств, некоторые из которых имеют изнуряющие симптомы, которые могут появиться в раннем возрасте и иногда приводят к пожизненной инвалидности. Неврологические генетические расстройства, такие как лизосомные расстройства накопления, часто лечат с помощью ферментозаместительной терапии ферментами, при которой пациенту вводят терапевтический белок, который представляет собой активную форму белка, который является дефектным или дефицитным при заболевании или расстройстве. Однако существуют проблемы для современных способов лечения, включая частое лечение, развитие иммунного ответа на терапевтический белок и трудности нацеливания терапевтического белка на пораженную ткань, клетку или субклеточный компартмент. Генная терапия предлагает преимущества, включая меньшее количество процедур и длительную эффективность.

[0085] В настоящем документе представлены компоненты для векторов для генной терапии, которые предлагают улучшения для генной терапии, такие как предоставление большего количества терапевтического белка там, где это необходимо, таким образом улучшая эффективность лечения. Такие проблемы решаются в настоящем изобретении путем улучшения экспрессии и клеточного поглощения или доставки, а также внутриклеточного или субклеточного нацеливания терапевтических белков. Конкретные инструменты или компоненты, представленные в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, сигнальные пептиды (например, пептид связывающийся с

иммуноглобулином (BiP) и сигнальные пептиды Gaussia) для повышения секреции и пептиды, которые повышают эндоцитоз терапевтического белка (например, пептиды, которые связываются с CI-MPR с высокой аффинностью для повышения клеточного поглощения и доставки в лизосомы). Такие пептиды являются слитыми с терапевтическими белками, кодируемыми векторами генной терапии. В некоторых вариантах осуществления пептиды представляют собой пептиды IGF2 (инсулиноподобного фактора роста 2) или их варианты. Предполагается, что векторы для генной терапии, представленные в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую терапевтический белок, слитый с пептидом, который связывается с CI-MPR с высокой аффинностью для оптимизации эффективности генной терапии.

[0086] Созданы конструкции для генной терапии для заместительной ферментной генной терапии. Последовательность инициации трансляции, включая, помимо прочего, последовательность Козак или последовательность IRES, такую как CrPV IRES, расположена на 5'-конце конструкции, за которой следует нуклеиновая кислота, кодирующая сигнальный пептид, выбранный из одного или более сигнального пептида GAA, нуклеиновая кислота, кодирующая ингибитор трипсина, и нуклеиновая кислота, кодирующая последовательность BiP. За ними следует нуклеиновая кислота, кодирующая домен нацеливания на клетку, который может быть vIGF-2, HIR Mab, или TfR Mab, или другим пептидом или белком, нацеленным на клетку. Конструкция для генной терапии дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую линкер, и нуклеиновую кислоту, содержащую корректирующий фермент или его ферментативно активный фрагмент, причем линкер соединяет нацеливающий на клетку домен с корректирующим ферментом или его ферментативно активным фрагментом. Подходящие корректирующие ферменты включают, но не ограничиваются ими, альфа-глюкозидазу (GAA), альфа-галактозидазу (GLA), идуронидазу (IDUA), идурониат-2-сульфатазу (IDS), PPT1 или их ферментативно активные фрагменты, а также другие ферменты с недостаточностью у индивидуума.

Внутриклеточное нацеливание терапевтических белков

[0087] N-связанные углеводы большинства лизосомальных белков модифицированы, чтобы они содержали специализированную углеводную структуру, называемую маннозо-6-фосфатом (M6P). M6P представляет собой биологический сигнал, который позволяет транспортировать лизосомальные белки в лизосомы через мембраносвязанные рецепторы M6P. В заместительной ферментной терапии лизосомных расстройств накопления используются рецепторы M6P для захвата и доставки терапевтических белков в лизосомы. Некоторые терапевтические средства не используют рецепторы M6P, включая Cerezyme® и другие версии рекомбинантной человеческой GСазы, не используют рецептор маннозы, который способен связывать терминальную маннозу с белковыми гликанами и доставлять их в лизосомы. Проблема, с которой сталкиваются некоторые терапевтические средства, замещающие ферменты, заключается в том, что в терапевтическом ферменте присутствуют низкие количества M6P, что требует более высоких доз для достижения терапевтической эффективности. Это приводит к значительно более длительному времени инфузии, более высокой вероятности развития иммунного ответа на терапевтическое средство и более высокой потребности в лекарственных средствах, что требует увеличения производства белка, что приводит к увеличению затрат.

[0088] CI-MPR захватывает M6P-содержащие лизосомальные ферменты из кровотока. Рецептор имеет отдельные связывающие домены для M6P и инсулиноподобного фактора роста (домены 1-3 и 7-9, см. Фиг. 2) и поэтому также известен как рецептор IGF2/манноза-6-фосфат или IGF2/CI-MPR. Этот рецептор можно использовать для нацеливания на M6P- или IGF2- или вариант IGF2-, содержащую ферментозамещающую терапию. Аффинность связывания этого рецептора с этими лигандами, включая инсулиноподобный фактор роста, представлена в Таблице 1. Примечательно, что пептид IGF2 имеет более высокую аффинность связывания с CI-MPR, чем моно- или бис-фосфорилированные олигосахариды.

| Таблица 1: Лиганды для CI-MPR | |
|--------------------------------------|---|
| Лиганд | Аффинность связывания (кажущаяся Kd; нМ) |
| IGF2 | 0,03-0,2 |
| [Leu27]IGF2 | 0,05 |
| Бис-М6Р | 2 |
| Бета-галактозидаза | 20 |
| Пентаманноза-М6Р | 6000 |
| Свободный М6Р | 7000 |

Терапевтические слитые белки для генной терапии

[0089] В данном документе предложены терапевтические слитые белки, полученные из векторов генной терапии. В некоторых вариантах осуществления слитый белок секретируется клетками, трансдуцированными вектором для генной терапии, кодирующим слитый белок. В некоторых вариантах осуществления трансдуцированные клетки находятся в ткани или органе (например, в печени). После выделения из клетки слитый белок транспортируется по сосудистой системе пациента и достигает интересующей ткани. В некоторых вариантах осуществления терапевтический слитый белок сконструирован для улучшения секреции. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит сигнальный пептид для повышения уровня секреции по сравнению с соответствующим терапевтическим белком или слитым белком, содержащим терапевтический белок, но не имеющим сигнального пептида.

[0090] Предложенные векторы для генной терапии, в некоторых вариантах осуществления, созданы для решения проблем генной терапии в отношении доставки терапевтического белка. Например, в некоторых случаях генная терапия может не достичь намеченного лечения простым генерированием достаточного количества терапевтического белка в организме пациента, если

недостаточное количество терапевтического белка доставляется в клетки, нуждающиеся в терапевтическом белке, из-за, например, физических и/или биологических барьеров, которые препятствуют распределению терапевтического белка в нужное место. Таким образом, даже если генная терапия способна заполнить кровь или ткань до точки насыщения высокой концентрацией терапевтического белка, генная терапия может оказаться недостаточно терапевтической. Кроме того, непродуктивные пути выведения могут удалить подавляющее большинство терапевтического белка. Даже если терапевтический белок транспортируется из сосудистой сети в интерстициальное пространство внутри ткани (например, мышечные волокна), адекватные терапевтические эффекты не гарантируются. Для эффективного лечения лизосомальных болезней накопления терапевтически эффективное количество терапевтического белка должно подвергаться клеточному эндоцитозу и лизосомной доставке, чтобы обеспечить значительную эффективность. Настоящее описание направлено на решение этих проблем предлагая векторы для генной терапии, кодирующие слитые белки, содержащие пептид, который обеспечивает эндоцитоз терапевтического белка в клетку-мишень для лечения, приводящего к эффективному лечению. В некоторых вариантах осуществления пептид, обеспечивающий эндоцитоз, представляет собой пептид, связывающий CI-MPR. В некоторых вариантах осуществления пептид, связывающий CI-MPR, представляет собой пептид vIGF2.

[0091] В настоящем документе предложены векторы для генной терапии, кодирующие слитые белки, содержащие пептид, который обеспечивает эндоцитоз терапевтического белка в клетку-мишень для лечения. В некоторых вариантах осуществления векторы для генной терапии кодируют слитые белки, содержащие терапевтический белок и пептид, связывающий CI-MPR. Такие слитые белки при экспрессии из вектора генной терапии нацелены на терапевтические белки, такие как ферментозамещающие терапевтические средства, в клетки, где они необходимы, повышают доставку в такие клетки или клеточное поглощение ими и нацеливают терапевтический белок на субклеточную локализацию (например, лизосому). В некоторых вариантах

осуществления пептид представляет собой пептид IGF2 или его вариант, который может нацеливать терапевтический белок на лизосому. Слитые белки в данном документе также, в некоторых вариантах осуществления, дополнительно содержат сигнальный пептид, который повышает секрецию, такой как сигнальный пептид BiP или сигнальный пептид Gaussia. В некоторых вариантах осуществления слитые белки содержат линкерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие слитые белки в настоящем документе, содержат последовательности участка внутренней посадки рибосомы.

[0092] В настоящем описании представлены терапевтические белки для генной терапии, содержащие пептид vIGF2. Примеры белков представлены в Таблице 2 ниже.

| Таблица 2: Аминокислотные последовательности | | SEQ ID NO |
|---|---|------------------|
| Естественная hGAA | MGVRHPPCSHRLLAVCALVSLATAALLGHILLHDFLLV PRELSGSSPVLEETHPAHQQGASRPGPRDAQAHPGRPR AVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQEQCEARGCCYIPAK QGLQGAQMGPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTAT LTRTTPFFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRR YEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGVIVRRQLDGR VLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLM LSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGS AHGVFLNNSNAMDVVLQPSPALSWRSTGGILDVYIFLG PEPKSVVQQYLDVVGYPFMPYWGLGFHLCRWGYSSST AITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFN KDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGS YRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPFTN PTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRG SEDGCPNNELENPPYVPGVVGGLQAATICASSHQFLS THYNLHNLVGLTEAIAASHRALVKARGTRPFVISRSTFA | 22 |

| | | |
|---|--|-----------|
| | <p>GHGRYAGHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPL VGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLL SLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQA HVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITP VLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALGSLPPPPA APREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLOQPG LTTTESRQQPMALAVALKGGGEARGELFWDDGESLEV LERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGLQLQKVT VLG VATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLM GEQFLVSWC</p> | |
| <p>Сконстру ирована я hGAA (BiP- vIGF2- GAA)</p> | <p>MKLSLVAAMLLLLSAARASRTLCCGGELVDTLQFVCGD RGFLFSRPASRVSRRSRGIVECCFRSCDLALLETYCAT PARSEGGGGSGGGGSRPGPRDAQAHPGRPRAVPTQCD VPPNSRFDCAPDKAITQEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQ MGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSEMGYTATLTRTTPTF FPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLET PHVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNNTTV APLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRI TLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGS AHGVFLL NSNAMDVVLQPSALS WRSTGGILDVYIFLGPEPKSVV QQYLDVVGYPFMPYWG LGFHL CRWGYSS TAITRQVV ENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDF PAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPYDEG LRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDTNPTALAWW EDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNN ELENPPYVPGVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNL YGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGH WTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGF LGNTSEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSF SEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVA RPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAE</p> | <p>23</p> |

| | | |
|---------------|--|----|
| | VTGYFPLGTWYDLQTVPVEALGSLPPPPAAPREPAIHSE GQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQP MALAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVI FLARNNTIVNELVRVTSEGAGLQKVTVLGVATAPQ QVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC | |
| hGAA Δ1-60 | SRPGPRDAQAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAI TQEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPS YKLENLSSEMGYTATLTRTTPFFPKDILTLRLDVMM ETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYVE FSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTS LPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGA NLYGSHPFYLALEDGGS AHGVFLLNSNAMDVVLQPSP ALSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMP PYWGLGFHLCRWGYSSAITRQVVENMTRAHFPLDVQ WNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGRR YMMIVDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPL IGKVWPGSTAFPFTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFD GMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVG TLQAATICASSHQFLSTHYNLHNL YGLTEAIASHRALV KARGTRPFVISRSTFAGHG RYAGHWTGDVWSSWEQLA SSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQ LGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTL RYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWT VDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQ TVPVEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTIN VHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMALAVALTKGGEA RGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVR VTSEGAGLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTY SPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC | 46 |
| wt-PPT1 | MASPGCLWLLAVALLPWTCASRALQHLDPPAPLPLVI WHGMGDSCCNPLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKT | 24 |

| | | |
|---|---|-----------|
| | <p>LMEDVENSFFLNVNSQVTTVCQALAKDPKLQQGYNA MGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLISVGGQHQG VFGL PRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVVQERLVQAEYWH DPIKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKKF VMVKFLNDSIVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETSL YTQDRLGLKEMDNAGQLVFLATEGDHLQLSEWFYA HIIPFLG</p> | |
| <p>PPT1-2 (vIGF2- PPT1)</p> | <p>MASPGCLWLLAVALLPWTCASRALQHLSRTLCCGGELV DTLQFVCGDRGFLFSRPASRVSRRSRGIVEECCFRSCDL ALLETYCATPARSEGGGGSGGGGSRPRAVPTQDPPAPL PLVIWHGMGDSCCNPLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLE IGKTLMEDVENSFFLNVNSQVTTVCQALAKDPKLQQG YNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLISVGGQHQG VFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVVQERLVQA EYWHDPIKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMA LKKFVMVKFLNDSIVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQ ETSLYTQDRLGLKEMDNAGQLVFLATEGDHLQLSEEW FYAHIIPFLG</p> | <p>25</p> |
| <p>PPT1-29 (BiP2aa- vIGF2- PPT1)</p> | <p>MKLSLVAAMLLLLWVALLLSAARAAASRTLCCGGELV DTLQFVCGDRGFLFSRPASRVSRRSRGIVEECCFRSCDL ALLETYCATPARSEGGGGSGGGGSRPRAVPTQDPPAPL PLVIWHGMGDSCCNPLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLE IGKTLMEDVENSFFLNVNSQVTTVCQALAKDPKLQQG YNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLISVGGQHQG VFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVVQERLVQA EYWHDPIKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMA LKKFVMVKFLNDSIVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQ ETSLYTQDRLGLKEMDNAGQLVFLATEGDHLQLSEEW FYAHIIPFLG</p> | <p>26</p> |

[0093] Компоненты слитых белков, представленных в настоящем документе, дополнительно описаны ниже.

Пептиды, связывающие CI-MPR (например, пептиды vIGF2)

[0094] В настоящем документе предложены пептиды, связывающие CI-MPR. Слитые белки, содержащие такие пептиды и терапевтический белок, при экспрессии из вектора генной терапии, направляют терапевтический белок в клетки, где это необходимо, повышают клеточное поглощение такими клетками и нацеливают терапевтический белок в субклеточную локализацию (например, лизосому). В некоторых вариантах осуществления пептид слит с N-концом терапевтического пептида. В некоторых вариантах осуществления пептид слит с C-концом терапевтического белка. В некоторых вариантах осуществления пептид представляет собой пептид vIGF2. Некоторые пептиды vIGF2 сохраняют высокую аффинность связывания с CI-MPR, в то время как их аффинность к рецептору IGF1, рецептору инсулина и белкам, связывающим IGF (IGFBP), снижена или устранена. Таким образом, некоторые варианты пептидов IGF2 значительно более селективны и имеют меньшие риски безопасности по сравнению с IGF2 дикого типа. Пептиды vIGF2 в настоящем описании включают пептиды, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31. Варианты пептидов IGF2 дополнительно включают пептиды с вариантами аминокислот в положениях 6, 26, 27, 43, 48, 49, 50, 54, 55 или 65 по сравнению с IGF2 дикого типа (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления пептид vIGF2 имеет последовательность, содержащую одну или более замен из группы, состоящей из E6R, F26S, Y27L, V43L, F48T, R49S, S50I, A54R, L55R и K65R. В некоторых вариантах осуществления пептид vIGF2 имеет последовательность, содержащую замену E6R. В некоторых вариантах осуществления пептид vIGF2 имеет последовательность, содержащую замену F26S. В некоторых вариантах осуществления пептид vIGF2 имеет последовательность, содержащую замену Y27L. В некоторых вариантах осуществления пептид vIGF2 имеет последовательность, содержащую замену V43L. В некоторых вариантах осуществления пептид vIGF2 имеет последовательность, содержащую замену

F48T. В некоторых вариантах осуществления пептид vIGF2 имеет последовательность, содержащую замену R49S. В некоторых вариантах осуществления пептид vIGF2 имеет последовательность, содержащую замену S50I. В некоторых вариантах осуществления пептид vIGF2 имеет последовательность, содержащую замену A54R. В некоторых вариантах осуществления пептид vIGF2 имеет последовательность, содержащую замену L55R. В некоторых вариантах осуществления пептид vIGF2 имеет последовательность, содержащую замену K65R. В некоторых вариантах осуществления пептид vIGF2 имеет последовательность, содержащую замену E6R, F26S, Y27L, V43L, F48T, R49S, S50I, A54R и L55R. В некоторых вариантах осуществления пептид vIGF2 имеет N-концевую делецию. В некоторых вариантах осуществления пептид vIGF2 имеет N-концевую делецию одной аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления пептид vIGF2 имеет N-концевую делецию двух аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептид vIGF2 имеет N-концевую делецию трех аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептид vIGF2 имеет N-концевую делецию четырех аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептид vIGF2 имеет N-концевую делецию четырех аминокислот и замену E6R, Y27L и K65R. В некоторых вариантах осуществления пептид vIGF2 имеет N-концевую делецию четырех аминокислот и замену E6R и Y27L. В некоторых вариантах осуществления пептид vIGF2 имеет N-концевую делецию пяти аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептид vIGF2 имеет N-концевую делецию шести аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептид vIGF2 имеет N-концевую делецию семи аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептид vIGF2 имеет N-концевую делецию семи аминокислот и замену Y27L и K65R.

| Таблица 3: Аминокислотные последовательности IGF2 (вариантные остатки подчеркнуты) | | |
|---|---------------------------|----------------------|
| Пептид | Последовательность | SEQ ID NO |
| | | |

| | | | |
|---------------------------------------|--|--|----|
| Дикий тип | A Y R P S E T L C G G E L V D T L Q F V C G D R G F Y F S R P A S R V S R R S R G I V E E C C F R S C D L A L L E T Y C A T P A K S E | 1 | |
| F26S | A Y R P S E T L C G G E L V D T L Q F V C G D R G <u>S</u> Y F S R P A S R V S R R S R G I V E E C C F R S C D L A L L E T Y C A T P A K S E | 2 | |
| Y27L | A Y R P S E T L C G G E L V D T L Q F V C G D R G F L <u>F</u> S R P A S R V S R R S R G I V E E C C F R S C D L A L L E T Y C A T P A K S E | 3 | |
| V43L | A Y R P S E T L C G G E L V D T L Q F V C G D R G F Y F S R P A S R V S R R S R G I L <u>E</u> E C C F R S C D L A L L E T Y C A T P A K S E | 4 | |
| F48T | A Y R P S E T L C G G E L V D T L Q F V C G D R G F Y F S R P A S R V S R R S R G I V E E C C T <u>R</u> S C D L A L L E T Y C A T P A K S E | 5 | |
| R49S | A Y R P S E T L C G G E L V D T L Q F V C G D R G F Y F S R P A S R V S R R S R G I V E E C C F <u>S</u> S C D L A L L E T Y C A T P A K S E | 6 | |
| S50I | A Y R P S E T L C G G E L V D T L Q F V C G D R G F Y F S R P A S R V S R R S R G I V E E C C F R I <u>C</u> D L A L L E T Y C A T P A K S E | 7 | |
| A54R | A Y R P S E T L C G G E L V D T L Q F V C G D R G F Y F S R P A S R V S R R S R G I V E E C C F R S C D L R <u>L</u> L E T Y C A T P A K S E | 8 | |
| L55R | A Y R P S E T L C G G E L V D T L Q F V C G D R G F Y F S R P A S R V S R R S R G I V E E C C F R S C D L A R <u>L</u> E T Y C A T P A K S E | 9 | |
| F26S, V43L, R49S, A54R, L55R | Y27L, F48T, S50I, C A T P A K S E | A Y R P S E T L C G G E L V D T L Q F V C G D R G S L <u>F</u> S R P A S R V S R R S R G I L <u>E</u> E C C T S I C D L R R <u>L</u> E T Y C A T P A K S E | 10 |

| | | | |
|-----------------------------|-------|--|----|
| Δ 1-6, K65R | Y27L, | TLCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRV SRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPAR SE | 11 |
| Δ 1-7, K65R | Y27L, | LCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRV RRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPAR SE | 30 |
| Δ 1-4, Y27L, K65R | E6R, | SRTLCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPAS RVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATP ARSE | 31 |
| Δ 1-4, E6R, Y27L | | SRTLCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPAS RVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATP AKSE | 34 |
| E6R | | AYRPSRTLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFS RPASRVSRGIVEECCFRSCDLALLETY CATPAKSE | 35 |

Таблица 4: Последовательности, кодирующие ДНК IGF2

| Пептид | Последовательность ДНК | SEQ ID NO | |
|-----------------------|--|--|----|
| Зрелая ДТ IGF2 | GCTTACCGCCCCAGTGAGACCCTGTGCG GCGGGGAGCTGGTGGACACCCTCCAGTT CGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTC AGCAGGCCCGCAAGCCGTGTGAGCCGT CGCAGCCGTGGCATCGTTGAGGAGTGCT GTTCCGCAGCTGTGACCTGGCCCTCCT GGAGACGTACTGTGCTACCCCCGCCAAG TCCGAG | 48 | |
| vIGF2 E6R, K65R | Δ 1-4, Y27L, | TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTT GTAGACACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAG ATCGCGGGTTCCTCTTCTCTCGCCCCGCT | 36 |

| | | |
|--|---|--|
| | TCCAGAGTTTCACGGAGGTCTAGGGGTA TAGTAGAGGAGTGTTGTTTCAGGTCCTG TGA CT TGGCGCTCCTCGAGACCTATTGC GCGACGCCAGCCAGGTCCGAA | |
|--|---|--|

Последовательности участка внутренней посадки рибосомы

[0095] В настоящем документе предложены конструкции для генной терапии, полезные для лечения нарушения, дополнительно содержащие последовательность участка внутренней посадки рибосомы (IRES) для повышения экспрессии гена путем обхода ограничивающего фактора инициации трансляции. Подходящие последовательности участка внутренней посадки рибосомы для оптимизации экспрессии для генной терапии включают, но не ограничиваются ими, IRES вируса паралича сверчка (CrPV), IRES пикорнавируса, IRES афтовируса, IRES вируса герпеса, связанного с саркомой Капоши, IRES гепатита А, IRES гепатита С, IRES пестивируса, IRES крипавируса, IRES вируса *Rhopalosiphum padi*, IRES вируса болезни Мерека и другие подходящие последовательности IRES. В некоторых вариантах осуществления конструкция для генной терапии содержит IRES CrPV. В некоторых вариантах осуществления CrPV IRES имеет последовательность нуклеиновой кислоты

AAAATGTGATCTTGCTTGTA AATACAATTTTGAGAGGTTAATAAATTACA
AGTAGTGCTATTTTTGTATTTAGGTTAGCTATTTAGCTTTACGTTCCAGGAT
GCCTAGTGGCAGCCCCACAATATCCAGGAAGCCCTCTCTGCGGTTTTTCAG
ATTAGGTAGTCGAAAAACCTAAGAAATTTACCTGCT (SEQ ID NO: 12). В некоторых вариантах осуществления последовательность CrPV IRES по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 12.

Сигнальные пептиды

[0096]Предусмотренные в настоящем описании конструкции для генной терапии в некоторых вариантах осуществления дополнительно содержат сигнальный пептид, который улучшает секрецию терапевтического белка из клетки, трансдуцированной конструкцией для генной терапии. Сигнальный пептид в некоторых вариантах осуществления улучшает процессинг терапевтических белков и облегчает транслокацию растущего комплекса полипептид-рибосома в ER и обеспечивает правильные ко-трансляционные и посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид расположен (i) в положении выше последовательности инициации трансляции сигнала, (ii) между последовательностью инициации трансляции и последовательностью терапевтического белка или (iii) в положении ниже последовательности терапевтического белка. Сигнальные пептиды, используемые в конструкциях для генной терапии, включают, но не ограничиваются ими, сигнальный пептид связывающий иммуноглобулин (BiP) из семейства белков HSP70 (например, HSPA5, член 5 семейства белков теплового шока) и сигнальные пептиды Gaussia и их варианты. Эти сигнальные пептиды обладают сверхвысокой аффинностью к частице распознавания сигнала. Примеры аминокислотных последовательностей BiP и Gaussia представлены в Таблице 5 ниже. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13-17. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид отличается от последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 13-17 на 5 или меньше, 4 или меньше, 3 или меньше, 2 или меньше или 1 аминокислоту.

| Таблица 5: Последовательности сигнальных пептидов | | |
|--|--|-------------------|
| Сигнальный пептид | Аминокислотная последовательность | SEQ ID NO: |
| | | |

| | | | |
|---------------------------|-----|--|----|
| Нативный человека | BiP | MKLSLVAAML L L L L L S A A R A | 13 |
| Модифицированный BiP-1 | | MKLSLVAAML L L L L L S L V A A M L L L L S A A R A | 14 |
| Модифицированный BiP-2 | | MKLSLVAAML L L L L L W V A L L L L S A A R A | 15 |
| Модифицированный BiP-3 | | MKLSLVAAML L L L L L S L V A L L L L S A A R A | 16 |
| Модифицированный BiP-4 | | MKLSLVAAML L L L L L A L V A L L L L S A A R A | 17 |
| Gaussia | | M G V K V L F A L I C I A V A E A | 32 |

[0097] Взаимодействие сигнального пептида BiP с частицей распознавания сигнала (SRP) облегчает транслокацию в ER. Это взаимодействие продемонстрировано на **Фиг.20**.

[0098] Сигнальный пептид Gaussia получен из люциферазы *Gaussia princeps* и направляет усиленный синтез белка и секрецию терапевтических белков, слитых с этим сигнальным пептидом. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид Gaussia имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид отличается от SEQ ID NO: 32 на 5 или меньше, 4 или меньше, 3 или меньше, 2 или меньше или 1 аминокислоту.

Линкер

[0099] Предложенные в настоящем описании конструкции для генной терапии в некоторых вариантах осуществления содержат линкер между целевым пептидом и терапевтическим белком. Такие линкеры в некоторых вариантах осуществления поддерживают правильное расположение и смягчают стерическое взаимодействие между пептидом vIGF2 и терапевтическим белком. В некоторых вариантах осуществления линкеры содержат повторяющиеся

остатки глицина, повторяющиеся остатки глицин-серин и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления линкер состоит из 5-20 аминокислот, 5-15 аминокислот, 5-10 аминокислот, 8-12 аминокислот или около 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 аминокислот. Подходящие линкеры для конструкций для генной терапии в настоящем описании включают, но не ограничиваются ими, линкеры, представленные в Таблице 6 ниже.

| Таблица 6: Линкерные последовательности | |
|--|------------|
| Последовательность | SEQ ID NO: |
| GGGGSGGGG | 18 |
| GGGGS | 19 |
| GGGSGGGGS | 20 |
| GGGGSGGGS | 21 |
| GGSGSGSTS | 33 |
| GGGGSGGGGS | 37 |

Последовательность инициации трансляции

[00100] Предусмотренные в настоящем описании конструкции для генной терапии содержат нуклеиновую кислоту, имеющую последовательность инициации трансляции, такую как последовательность Козак, которая способствует инициации трансляции мРНК. Рассматриваемые в настоящем описании последовательности Козак имеют консенсусную последовательность (gcc)RccATGG (SEQ ID NO: 27), где строчная буква обозначает наиболее распространенное основание в этом положении, и основания варьируются, прописные буквы указывают на высококонсервативные основания, которые редко варьируются. R указывает, что пурин (аденин или гуанин) всегда присутствует в этом положении. Последовательность в скобках (gcc) имеет неопределенное значение. В некоторых вариантах осуществления, последовательность Козак содержит последовательность AX₁X₂ATGA (SEQ ID NO: 28), где каждый из X₁ и X₂ представляет собой любой нуклеотид. В

некоторых вариантах осуществления X_1 содержит А. В некоторых вариантах осуществления X_2 содержит G. В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 85% идентичную AAGATGA (SEQ ID NO: 29). В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак отличается от последовательности AAGATGA (SEQ ID NO: 29) одним или двумя нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления последовательности Козак, предложенные в настоящем документе, имеют последовательность AAGATGA (SEQ ID NO: 29). В некоторых вариантах осуществления, последовательность Козак содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 85% идентичную GCAAGATG (SEQ ID NO: 44). В некоторых вариантах осуществления, последовательность Козак отличается от последовательности GCAAGATG (SEQ ID NO: 44) одним или двумя нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак содержит GCAAGATG (SEQ ID NO: 44). В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 85% идентичную CACCATG (SEQ ID NO: 47). В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак отличается от последовательности CACCATG (SEQ ID NO: 47) одним или двумя нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак содержит CACCATG (SEQ ID NO: 47).

Терапевтический белок

[00101] Предложенные в настоящем описании конструкции для генной терапии содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую терапевтический белок, для лечения генетического расстройства, вызванного генетическим дефектом у индивидуума, приводящим к отсутствию или дефектному белку. Терапевтический белок, экспрессируемый конструкцией генной терапии, заменяет отсутствующий или дефектный белок. Следовательно, терапевтические белки выбираются на основе генетического дефекта, нуждающегося в лечении у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок

представляет собой структурный белок. В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок представляет собой фермент. В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок представляет собой регуляторный белок. В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок представляет собой рецептор. В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок представляет собой пептидный гормон. В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок представляет собой цитокин или хемокин.

[00102] В некоторых вариантах осуществления генные терапевтические конструкции в настоящем описании кодируют фермент, такой как фермент, имеющий генетический дефект у индивидуума с лизосомальной болезнью накопления. В некоторых вариантах осуществления конструкции для генной терапии кодируют лизосомальный фермент, такой как гликозидаза, протеаза или сульфатаза. В некоторых вариантах осуществления ферменты, кодируемые конструкциями для генной терапии, представленными в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, α -D-маннозидазу; N-аспартил- β -глюкозаминидазу; β -галактозидазу; церамидазу; фукозидазу; галактоцереброзидазу; арилсульфатазу A; N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазу; идуронатсульфатазу; N-ацетилглюкозаминидазу; ацетил-КоА: α -глюкозаминидацетилтрансферазу; N-ацетилглюкозамин-6-сульфатазу; β -глюкуронидазу; гиалуронидазу; сиалидазу; сульфатазу; сфингомиелиназу; кислую β -маннозидазу; катепсин K; 3-гексозаминидазу A; β -гексозаминидазу B; α -N-ацетилгалактозаминидазу; сиалин; гексозаминидазу A; бета-глюкозидазу; α -идуронидазу; α -галактозидазу A; β -глюкоцереброзидазу; липазу лизосомальной кислоты; гликозаминогликан-альфа-L-идуроногидролазу; идуронат-2-сульфатазу; N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазу; гликозаминогликан N – ацетилгалактозамин 4-сульфатазу; альфа-глюкозидазу; гепарансульфамидазу; субъединицу gp-91 НАДФН-оксидазы; аденозиндезаминазу; циклинзависимую киназу 5; и пальмитоил-протеинтиоэстеразу 1. В некоторых вариантах осуществления ферменты, кодируемые конструкциями для генной терапии, представленными в настоящем документе, содержат альфа-глюкозидазу. В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок ассоциирован с

генетическим расстройством, выбранным из группы, состоящей из расстройства дефицита CDKL5, муковисцидоза, альфа- и бета-талассемии, серповидноклеточной анемии, синдрома Марфана, синдрома Мартина — Белл, болезни Хантингтона, гемохроматоза, врожденной глухоты (несиндромной), болезни Тея — Сакса, семейной гиперхолестеринемии, мышечной дистрофии Дюшенна, болезни Штаргардта, синдрома Ушера, хориидеремии, ахроматопсии, X-сцепленного ретиношизиса, гемофилии, синдрома Вискотта — Олдрича, X-сцепленного хронического гранулематоза, дефицита декарбоксилазы ароматических L-аминокислот, рецессивного дистрофического буллезного эпидермолиза, дефицита альфа-1-антитрипсина, синдрома прогерии Хатчинсона — Гилфорда (HGPS), синдрома Нунана, X-сцепленного тяжелого комбинированного иммунодефицита (X-SCID). В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок выбран из группы, состоящей из CDKL5, коннексина 26, гексозаминидазы А, рецептора ЛПНП, дистрофина, CFTR, бета-глобулина, HFE, Хантингтона, ABCA4, миозина VIIA (MYO7A), белка сопровождения Rab -1 (REP1), управляемого циклическими нуклеотидами канала бета 3 (CNGB3), ретиношизина 1 (RS1), субъединицы гемоглобина бета (HBB), фактора IX, WAS, бета-цепи цитохрома В-245, допа-декарбоксилазы (DDC), коллагена VII типа цепи альфа 1 (COL7A1), члена 1 семейства серпинов А (SERPINA1), LMNA, PTPN11, SOS1, RAF1, KRAS и гена γ рецептора IL2.

[00103] *Примеры векторов для генной терапии*

Векторы и композиции для генной терапии

[00104] В настоящем документе предложены векторы для генной терапии, в которых нуклеиновая кислота, такая как ДНК, кодирует терапевтический слитый белок, такой как слитый vIGF2, необязательно содержащий сигнальный пептид. Вектор для генной терапии необязательно содержит последовательность участка внутренней посадки рибосомы. Векторы, полученные из ретровирусов, таких как лентивирус, являются подходящими инструментами для достижения долговременного переноса гена, поскольку они обеспечивают долгосрочную

стабильную интеграцию трансгена и его размножение в дочерних клетках. Lentивирусные и аденоассоциированные вирусные векторы имеют дополнительное преимущество перед векторами, полученными из онко-ретровирусов, таких как вирусы лейкемии мышей, в том, что они способны трансдуцировать непролиферирующие клетки, такие как гепатоциты и нейроны. У них также есть дополнительное преимущество в виде низкой иммуногенности.

[00105] Примеры векторов для генной терапии в данном документе кодируют терапевтические белки и терапевтические гибридные белки, содержащие пептид vIGF2. Нуклеиновые кислоты, кодирующие примерные аминокислотные последовательности слитого белка, представлены в Таблице 7 ниже.

| Таблица 7: Последовательности ДНК | | |
|--|--|------------------|
| Конструкция | Последовательность ДНК | SEQ ID NO |
| Козак- hGAA (Нативная GAA) | GCAAGATGGGAGTGAGGCACCCGCCCTGCTCCCACC GGCTCCTGGCCGTCTGCGCCCTCGTGTCCCTGGCAAC CGCTGCACTCCTGGGGCACATCCTACTCCATGATTTTC CTGCTGGTTCCCCGAGAGCTGAGTGGCTCCTCCCCA GTCCTGGAGGAGACTCACCCAGCTCACCAGCAGGGA GCCAGTAGACCAGGGCCCCGGGATGCCCAGGCACAC CCCGGCCGTCCCAGAGCAGTGCCCACACAGTGCGAC GTCCCCCCCCAACAGCCGCTTCGATTGCGCCCCTGAC AAGGCCATCACCCAGGAACAGTGCGAGGCCCGCGG CTGTTGCTACATCCCTGCAAAGCAGGGGCTGCAGGG AGCCCAGATGGGGCAGCCCTGGTGCTTCTTCCCACC CAGCTACCCCAGCTACAAGCTGGAGAACCTGAGCTC CTCTGAAATGGGCTACACGGCCACCCTGACCCGTAC CACCCCCACCTTCTTCCCCAAGGACATCCTGACCCTG CGGCTGGACGTGATGATGGAGACTGAGAACCGCCTC CACTTACGATCAAAGATCCAGCTAACAGGGCGCTAC | 44 |

GAGGTGCCCTTGGAGACCCCGCATGTCCACAGCCGG
GCACCGTCCCCACTCTACAGCGTGGAGTTCTCCGAG
GAGCCCTTCGGGGTGATCGTGCGCCGGCAGCTGGAC
GGCCGCGTGCTGCTGAACACGACGGTGGCGCCCCTG
TTCTTTGCGGACCAGTTCCTTCAGCTGTCCACCTCGC
TGCCCTCGCAGTATATCACAGGCCTCGCCGAGCACC
TCAGTCCCCTGATGCTCAGCACCAGCTGGACCAGGA
TCACCCTGTGGAACCGGGACCTTGCGCCCACGCCCG
GTGCGAACCTCTACGGGTCTCACCCTTTCTACCTGGC
GCTGGAGGACGGCGGGTCGGCACACGGGGTGTTCT
GCTAAACAGCAATGCCATGGATGTGGTCCTGCAGCC
GAGCCCTGCCCTTAGCTGGAGGTCGACAGGTGGGAT
CCTGGATGTCTACATCTTCCTGGGCCAGAGCCCAA
GAGCGTGGTGCAGCAGTACCTGGACGTTGTGGGATA
CCCGTTCATGCCGCCATACTGGGGCCTGGGCTTCCAC
CTGTGCCGCTGGGGCTACTCCTCCACCGCTATCACCC
GCCAGGTGGTGGAGAACATGACCAGGGCCCACTTCC
CCCTGGACGTCCAGTGGAACGACCTGGACTACATGG
ACTCCCGGAGGGACTTCACGTTCAACAAGGATGGCT
TCCGGGACTTCCCGGCCATGGTGCAGGAGCTGCACC
AGGGCGGCCGGCGCTACATGATGATCGTGGATCCTG
CCATCAGCAGCTCGGGCCCTGCCGGGAGCTACAGGC
CCTACGACGAGGGTCTGCGGAGGGGGGTTTTTCATCA
CCAACGAGACCGGCCAGCCGCTGATTGGGAAGGTAT
GGCCCGGGTCCACTGCCTTCCCCGACTTCACCAACCC
CACAGCCCTGGCCTGGTGGGAGGACATGGTGGCTGA
GTTCCATGACCAGGTGCCCTTCGACGGCATGTGGATT
GACATGAACGAGCCTTCCAACCTTCATCAGGGGCTCT
GAGGACGGCTGCCCCAACAATGAGCTGGAGAACCC
ACCCTACGTGCCTGGGGTGGTTGGGGGGACCCTCCA
GGCGGCCACCATCTGTGCCTCCAGCCACCAGTTTCTC

TCCACACACTACAACCTGCACAACCTCTACGGCCTG
ACCGAAGCCATCGCCTCCCACAGGGCGCTGGTGAAG
GCTCGGGGGACACGCCCATTTGTGATCTCCCGCTCG
ACCTTTGCTGGCCACGGCCGATACGCCGGCCACTGG
ACGGGGGACGTGTGGAGCTCCTGGGAGCAGCTCGCC
TCCTCCGTGCCAGAAATCCTGCAGTTTAACTGCTGG
GGGTGCCTCTGGTCGGGGCCGACGTCTGCGGCTTCC
TGGGCAACACCTCAGAGGAGCTGTGTGTGCGCTGGA
CCCAGCTGGGGGCCTTCTACCCCTTCATGCGGAACC
ACAACAGCCTGCTCAGTCTGCCCCAGGAGCCGTACA
GCTTCAGCGAGCCGGCCCAGCAGGCCATGAGGAAG
GCCCTCACCTGCGCTACGCACTCCTCCCCACCTCT
ACACACTGTTCCACCAGGCCACGTTCGCGGGGGAGA
CCGTGGCCCGGCCCTTCTCCTGGAGTTCCCCAAGG
ACTCTAGCACCTGGACTGTGGACCACCAGCTCCTGT
GGGGGGAGGCCCTGCTCATCACCCAGTGCTCCAGG
CCGGGAAGGCCGAAGTGACTGGCTACTTCCCCTTGG
GCACATGGTACGACCTGCAGACGGTGCCAGTAGAGG
CCCTTGGCAGCCTCCCACCCCCACCTGCAGCTCCCCG
TGAGCCAGCCATCCACAGCGAGGGGCAGTGGGTGAC
GCTGCCGGCCCCCTGGACACCATCAACGTCCACCT
CCGGGCTGGGTACATCATCCCCCTGCAGGGCCCTGG
CCTCACAACCACAGAGTCCCGCCAGCAGCCCATGGC
CCTGGCTGTGGCCCTGACCAAGGGTGGGGAGGCCCG
AGGGGAGCTTTTCTGGGACGATGGAGAGAGCCTGGA
AGTGCTGGAGCGAGGGGCCTACACACAGGTCATCTT
CCTGGCCAGGAATAACACGATCGTGAATGAGCTGGT
ACGTGTGACCAGTGAGGGAGCTGGCCTGCAGCTGCA
GAAGGTGACTGTCCTGGGCGTGGCCACGGCGCCCCA
GCAGGTCTCTCCAACGGTGTCCCTGTCTCCAACCTC
ACCTACAGCCCCGACACCAAGGTCTGGACATCTGT

| | | |
|---|---|----|
| | GTCTCGCTGTTGATGGGAGAGCAGTTTCTCGTCAGCT GGTGTAG | |
| Козак ВiP- vIGF2- ГАА («Сконструированная hГАА») | GCAAGATGAAGCTCTCCCTGGTGGCCGCGATGCTGC TGCTGCTCAGCGCGGGCGGGCCTCTAGAACACTGT GCGGAGGGGAGCTTGTAGACACTCTTCAGTTCGTGT GTGGAGATCGCGGGTTCCTCTTCTCTCGCCCCGCTTC CAGAGTTTCACGGAGGTCTAGGGGTATAGTAGAGGA GTGTTGTTTCAGGTCCTGTGACTTGGCGCTCCTCGAG ACCTATTGCGCGACGCCAGCCAGGTCCGAAGGGGGC GGTGGCTCAGGTGGTGGAGGTAGCAGACCAGGGCCC CGGGATGCCAGGCACACCCCGGCCGTCCCAGAGCA GTGCCACACAGTGCGACGTCCCCCAACAGCCGC TTCGATTGCGCCCCTGACAAGGCCATCACCCAGGAA CAGTGCGAGGCCCGCGGCTGTTGCTACATCCCTGCA AAGCAGGGGCTGCAGGGAGCCAGATGGGGCAGCC CTGGTGCTTCTTCCCACCCAGCTACCCAGCTACAAG CTGGAGAACCTGAGCTCCTCTGAAATGGGCTACACG GCCACCCTGACCCGTACCACCCCACTTCTTCCCCA AGGACATCCTGACCCTGCGGCTGGACGTGATGATGG AGACTGAGAACCGCCTCCACTTCACGATCAAAGATC CAGCTAACAGGCGCTACGAGGTGCCCTTGGAGACCC CGCATGTCCACAGCCGGGCACCGTCCCCACTCTACA GCGTGGAGTTCTCCGAGGAGCCCTTCGGGGTGATCG TGCGCCGGCAGCTGGACGGCCGCGTGCTGCTGAACA CGACGGTGGCGCCCCTGTTCTTTGCGGACCAGTTCCT TCAGCTGTCCACCTCGCTGCCCTCGCAGTATATCACN GGCCTCGCCGAGCACCTCAGTCCCCTGATGCTCAGC ACCAGCTGGACCAGGATCACCTGTGGAACCGGGAC CTTGCGCCCACGCCCGGTGCGAACCTCTACGGGTCT CACCTTTCTACCTGGCGCTGGAGGACGGCGGGTCCG GCACACGGGGTGTTCCTGCTAAACAGCAATGCCATG | 38 |

GATGTGGTCCTGCAGCCGAGCCCTGCCCTTAGCTGG
AGGTCGACAGGTGGGATCCTGGATGTCTACATCTTC
CTGGGCCCAGAGCCCAAGAGCGTGGTGCAGCAGTAC
CTGGACGTTGTGGGATAACCGTTCATGCCGCCATACT
GGGGCCTGGGCTTCCACCTGTGCCGCTGGGGCTACT
CCTCCACCGCTATCACCCGCCAGGTGGTGGAGAACA
TGACCAGGGCCCACTTCCCCCTGGACGTCCAGTGGA
ACGACCTGGACTACATGGACTCCCGGAGGGACTTCA
CGTTCAACAAGGATGGCTTCCGGGACTTCCCGGCCA
TGGTGCAGGAGCTGCACCAGGGCGGCCGGCGCTACA
TGATGATCGTGGATCCTGCCATCAGCAGCTCGGGCC
CTGCCGGGAGCTACAGGCCCTACGACGAGGGTCTGC
GGAGGGGGGTTTTTCATCACCAACGAGACCGGCCAGC
CGCTGATTGGGAAGGTATGGCCCGGGTCCACTGCCT
TCCCGACTTCACCAACCCACAGCCCTGGCCTGGT
GGGAGGACATGGTGGCTGAGTTCATGACCAGGTGC
CCTTCGACGGCATGTGGATTGACATGAACGAGCCTT
CCA ACTTCATCAGGGGCTCTGAGGACGGCTGCCCA
ACAATGAGCTGGAGAACCACCCTACGTGCCTGGGG
TGGTTGGGGGGACCCTCCAGGCGGCCACCATCTGTG
CCTCCAGCCACCAGTTTCTCTCCACACTACAACCT
GCACAACCTCTACGGCCTGACCGAAGCCATCGCCTC
CCACAGGGCGCTGGTGAAGGCTCGGGGGACACGCC
ATTTGTGATCTCCCGCTCGACCTTTGCTGGCCACGGC
CGATACGCCGGCCACTGGACGGGGGACGTGTGGAGC
TCCTGGGAGCAGCTCGCCTCCTCCGTGCCAGAAATC
CTGCAGTTTAACCTGCTGGGGGTGCCTCTGGTCGGG
GCCGACGTCTGCGGCTTCCCTGGGCAACACCTCAGAG
GAGCTGTGTGTGCGCTGGACCCAGCTGGGGGCCTTC
TACCCCTTCATGCGGAACCACAACAGCCTGCTCAGT
CTGCCCCAGGAGCCGTACAGCTTCAGCGAGCCGGCC

| | | |
|---|--|-----------|
| | <p>CAGCAGGCCATGAGGAAGGCCCTCACCCCTGCGCTAC GCACTCCTCCCCACCTCTACACACTGTTCCACCAGG CCCACGTCGCGGGGGAGACCGTGGCCCGGCCCTCT TCCTGGAGTTCCCCAAGGACTCTAGCACCTGGACTG TGGACCACCAGCTCCTGTGGGGGGAGGCCCTGCTCA TCACCCAGTGCTCCAGGCCGGGAAGGCCGAAGTGA CTGGCTACTTCCCCTTGGGCACATGGTACGACCTGCA GACGGTGCCAGTAGAGGCCCTTGGCAGCCTCCCACC CCCACCTGCAGCTCCCCGTGAGCCAGCCATCCACAG CGAGGGGCAGTGGGTGACGCTGCCGGCCCCCTGGA CACCATCAACGTCCACCTCCGGGCTGGGTACATCAT CCCCTGCAGGGCCCTGGCCTCACAACCACAGAGTC CCGCCAGCAGCCCATGGCCCTGGCTGTGGCCCTGAC CAAGGGTGGGGAGGCCCGAGGGGAGCTGTTCTGGG ACGATGGAGAGAGCCTGGAAGTGCTGGAGCGAGGG GCCTACACACAGGTCATCTTCTGGCCAGGAATAAC ACGATCGTGAATGAGCTGGTACGTGTGACCAGTGAG GGAGCTGGCCTGCAGCTGCAGAAGGTGACTGTCCTG GGCCTGGCCACGGCGCCCCAGCAGGTCCTCTCCAAC GGTGTCCCTGTCTCCAACCTCACCTACAGCCCCGACA CCAAGGTCCTGGACATCTGTGTCTCGCTGTTGATGGG AGAGCAGTTTCTCGTCAGCTGGTGTTAG</p> | |
| <p>Вирус паралича сверчка IRES (подчеркн ут)-BiP- vIGF2- ГАА</p> | <p><u>AAAAATGTGATCTTGCTTGAAATACAATTTTGAGAGGTT</u> <u>AATAAATTACAAGTAGTGCTATTTTTGTATTTAGGTTAGCT</u> <u>ATTAGCTTTACGTTCCAGGATGCCTAGTGGCAGCCCCA</u> <u>CAATATCCAGGAAGCCCTCTCTGCGGTTTTTCAGATTAG</u> <u>GTAGTCGAAAAACCTAAGAAATTTACCTGCTATGAAGCT</u> CTCCCTGGTGGCCGCGATGCTGCTGCTGCTCAGCGC GGC GCGGGCCTCTAGA A CACTGTGCGGAGGGGAGCT TGTAGACACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATCGCGG GTTCCTCTTCTCTCGCCCCGCTTCCAGAGTTTCACGG</p> | <p>39</p> |

AGGTCTAGGGGTATAGTAGAGGAGTGTTGTTTCAGG
TCCTGTGACTTGGCGCTCCTCGAGACCTATTGCGCGA
CGCCAGCCAGGTCCGAAGGGGGCGGTGGCTCAGGTG
GTGGAGGTAGCAGACCAGGGCCCCGGGATGCCAG
GCACACCCCGGCCGTCCCAGAGCAGTGCCCACACAG
TGCGACGTCCCCCCAACAGCCGCTTCGATTGCGCC
CCTGACAAGGCCATCACCCAGGAACAGTGCGAGGCC
CGCGGCTGTTGCTACATCCCTGCAAAGCAGGGGCTG
CAGGGAGCCCAGATGGGGCAGCCCTGGTGCTTCTTC
CCACCCAGCTACCCAGCTACAAGCTGGAGAACCTG
AGCTCCTCTGAAATGGGCTACACGGCCACCCTGACC
CGTACCACCCCACTTCTTCCCAAGGACATCCTGA
CCCTGCGGCTGGACGTGATGATGGAGACTGAGAACC
GCCTCCACTTCACGATCAAAGATCCAGCTAACAGGC
GCTACGAGGTGCCCTTGGAGACCCCGCATGTCCACA
GCCGGGCACCGTCCCCACTCTACAGCGTGGAGTTCT
CCGAGGAGCCCTTCGGGGTGATCGTGCGCCGGCAGC
TGGACGGCCGCGTGCTGCTGAACACGACGGTGGCGC
CCCTGTTCTTTGCGGACCAGTTCCTTCAGCTGTCCAC
CTCGCTGCCCTCGCAGTATATCACAGGCCTCGCCGA
GCACCTCAGTCCCCTGATGCTCAGCACCAGCTGGAC
CAGGATCACCTGTGGAACCGGGACCTTGCGCCCAC
GCCCGGTGCGAACCTCTACGGGTCTCACCTTTCTAC
CTGGCGCTGGAGGACGGCGGGTCGGCACACGGGGTG
TTCTGCTAAACAGCAATGCCATGGATGTGGTCCTGC
AGCCGAGCCCTGCCCTTAGCTGGAGGTCGACAGGTG
GGATCCTGGATGTCTACATCTTCCTGGGCCCAGAGC
CCAAGAGCGTGGTGCAGCAGTACCTGGACGTTGTGG
GATACCCGTTTCATGCCGCCATACTGGGGCCTGGGCT
TCCACCTGTGCCGCTGGGGCTACTCCTCCACCGCTAT
CACCCGCCAGGTGGTGGAGAACATGACCAGGGCCCA

CTTCCCCCTGGACGTCCAGTGGAACGACCTGGACTA
CATGGACTCCCGGAGGGACTTCACGTTCAACAAGGA
TGGCTTCCGGGACTTCCCGGCCATGGTGCAGGAGCT
GCACCAGGGCGGCCGGCGCTACATGATGATCGTGGA
TCCTGCCATCAGCAGCTCGGGCCCTGCCGGGAGCTA
CAGGCCCTACGACGAGGGTCTGCGGAGGGGGGTTTT
CATCACCAACGAGACCGGCCAGCCGCTGATTGGGAA
GGTATGGCCCGGGTCCACTGCCTTCCCCGACTTCACC
AACCCACAGCCCTGGCCTGGTGGGAGGACATGGTG
GCTGAGTTCATGACCAGGTGCCCTTCGACGGCATG
TGGATTGACATGAACGAGCCTTCCAACCTCATCAGG
GGCTCTGAGGACGGCTGCCCAACAATGAGCTGGAG
AACCCACCCTACGTGCCTGGGGTGGTTGGGGGGACC
CTCCAGGCGGCCACCATCTGTGCCTCCAGCCACCAG
TTTCTCTCCACACACTACAACCTGCACAACCTCTACG
GCCTGACCGAAGCCATCGCCTCCACAGGGCGCTGG
TGAAGGCTCGGGGGACACGCCCATTTGTGATCTCCC
GCTCGACCTTTGCTGGCCACGGCCGATACGCCGGCC
ACTGGACGGGGGACGTGTGGAGCTCCTGGGAGCAGC
TCGCCTCCTCCGTGCCAGAAATCCTGCAGTTTAACCT
GCTGGGGGTGCCTCTGGTTCGGGGCCGACGTCTGCGG
CTTCCTGGGCAACACCTCAGAGGAGCTGTGTGTGCG
CTGGACCCAGCTGGGGGCCTTCTACCCCTTCATGCG
GAACCACAACAGCCTGCTCAGTCTGCCCCAGGAGCC
GTACAGCTTCAGCGAGCCGGCCCAGCAGGCCATGAG
GAAGGCCCTCACCTGCGCTACGCACTCCTCCCCA
CCTCTACACACTGTTCCACCAGGCCACGTCGCGGG
GGAGACCGTGGCCCGGCCCTCTTCCTGGAGTTCCC
CAAGGACTCTAGCACCTGGACTGTGGACCACCAGCT
CCTGTGGGGGGAGGCCCTGCTCATCACCCAGTGCT
CCAGGCCGGGAAGGCCGAAGTGACTGGCTACTTCCC

| | | |
|---|---|-----------|
| | <p>CTTGGGCACATGGTACGACCTGCAGACGGTGCCAGT AGAGGCCCTTGGCAGCCTCCCACCCCCACCTGCAGC TCCCCGTGAGCCAGCCATCCACAGCGAGGGGCAGTG GGTGACGCTGCCGGCCCCCTGGACACCATCAACGT CCACCTCCGGGCTGGGTACATCATCCCCCTGCAGGG CCCTGGCCTCACACCACAGAGTCCCGCCAGCAGCC CATGGCCCTGGCTGTGGCCCTGACCAAGGGTGGGGA GGCCCGAGGGGAGCTGTTCTGGGACGATGGAGAGA GCCTGGAAGTGCTGGAGCGAGGGGCCTACACACAGG TCATCTTCCTGGCCAGGAATAACACGATCGTGAATG AGCTGGTACGTGTGACCAGTGAGGGAGCTGGCCTGC AGCTGCAGAAGGTGACTGTCCTGGGCGTGGCCACGG CGCCCCAGCAGGTCCTCTCCAACGGTGTCCCTGTCTC CAACTCACCTACAGCCCCGACACCAAGGTCCTGGA CATCTGTGTCTCGCTGTTGATGGGAGAGCAGTTTCTC GTCAGCTGGTGTTAG</p> | |
| <p>wt-PPT1 Кодон- оптимизир ованная IDT</p> | <p>ATGGCATCACCGGGTTGCCTCTGGTTGTTGGCCGTTG CGTTGCTTCCGTGGACATGTGCATCAAGAGCTCTTCA ACATCTGGATCCCCCAGCTCCCCTGCCGCTCGTAATC TGGCACGGGATGGGGGATTCATGTTGTAACCCGTTG TCAATGGGCGCGATAAAAAAGATGGTTGAAAAGAA GATTCCAGGCATCTACGTTCTGTCCCTGGAAATCGGT AAGACACTGATGGAAGACGTGGAGAACTCCTTCTTT CTCAACGTCAATAGTCAGGTCACCTACCGTCTGTCAA GCATTGGCAAAGGACCCTAAACTTCAGCAGGGGTAC AATGCGATGGGGTTTAGCCAGGGCGGACAGTTTCTT AGAGCCGTCGCACAGCGCTGTCCATCTCCCCGATG ATTAACCTTATATCTGTCTGGGGGACAACACCAGGGT GTTTTTGGTCTTCCCTCGCTGTCCTGGTGAAAGCTCCC ACATCTGTGATTTTCATACGCAAACGTTGAACGCAG</p> | <p>40</p> |

| | | |
|---|--|----|
| | <p>GAGCTTATAGTAAAGTCGTCCAAGAACGGCTTGTTCAAGCGGAGTATTGGCATGACCCAATAAAAGAAGACGTTTATAGGAATCACTCTATCTTCTTGGCCGATATCAACCAAGAACGCGGAATCAACGAAAGCTACAAAAAGAATCTTATGGCTCTCAAGAAATTTGTTATGGTGAAATTCCTTAATGACTCTATAGTAGATCCTGTTCGATTCAGATGGTTCGGGTTCTACAGGTCTGGCCAGGCGAAGGAGACTATCCCCTCCAAGAAACGTCTCTCTATACACAAAGACAGACTCGGACTGAAAGAGATGGATAATGCGGGCCAGTTGGTCTTCTTGGCTACGGAAGGCGATCATCTCCAACTCTCCGAAGAGTGGTTCTATGCCCATATAATCCCGTTCCTGGGCTAA</p> | |
| <p>PPT1-2 (wt-vIGF2- PPT1; кодон- оптимизир ованная инструмен том оптимизац ии кодонов IDT)</p> | <p>ATGGCATCCCCCGGATGTTTGTGGCTGCTGGCGGTTGCGCTTCTGCCATGGACGTGCGCCTCCCGAGCCCTCCAACACCTGTCCAGGACACTTTGCGGCGGAGAGTTGGTCGATACGCTTCAATTCGTGTGTGGGGATAGAGGCTTCCTTTTTTCTCGGCCCGCTAGCCGCGTGTCCCGAAGGTCCCGGGGTATCGTTGAGGAATGCTGTTTCCGGTCCTGCGATCTTGCACTGTTGGAGACATACTGTGCTACGCCGCGAGAAAGCGAGGGTGGAGGGGGTTCTGGAGGTGGAGGGAGCCGGCCTCGGGCGGTTCCACCCAGGATCCTCCAGCTCCTCTGCCTCTGGTCATCTGGCATGGGATGGGGGACTCATGTTGTAACCCGCTGAGTATGGGGGCAATTAATAAAAATGGTTGAAAAGAAAATTCCAGGTATTTATGTCCTCTCTTGAATCGGTAAGACACTTATGGAGGATGTGGAAACTCCTTTTTCCTTAATGTCAATTCTCAGGTCACAACAGTTTGTGTCAGGCTCTGGCGAAGGATCCTAAGCTGCAGCAAGGCTACAACGCCATGGGTTTTCAGGGAGGCCAATTTCTCAGAGCGGTAGCTCAGCGATGTCCATCACCACCGATGATAAATCTGATCAGTGTCGGCGGACAACACCAGGGAGTTTTTCGGGCTGC</p> | 41 |

| | | |
|--|---|-----------|
| | <p>CCAGGTGTCCGGGGGAATCTAGTCACATATGTGACT TCATTCGCAAGACCCTTAACGCCGGCGCTTACTCAA AGGTGGTTCAAGAACGGCTTGTGCAGGCTGAATACT GGCACGATCCCATCAAGGAAGATGTATATAGGAACC ACAGTATCTTTCTGGCAGACATAAATCAGGAAAGGG GTATTAACGAAAGCTACAAGAAAAATCTCATGGCCC TGAAGAAATTTGTAATGGTTAAGTTTTTGAACGATTC TATAGTAGATCCTGTTGACTCCGAGTGGTTCGGGTTT TATCGATCTGGTCAAGCCAAGGAGACGATTCCGCTT CAGGAAACTTCACTGTACACACAGGATCGGCTGGGA CTCAAGGAGATGGACAATGCGGGCCAGTTGGTGTTT CTGGCTACAGAGGGAGACCATCTCCAGTTGAGTGAA GAATGGTTCTATGCACATATTATCCCATTCTCGGCT AA</p> | |
| <p>PPT1-29 (BiP2aa- vIGF2- PPT1; нативная последова тельность человека)</p> | <p>ATGAAGCTCTCCCTGGTGGCCGCGATGCTGCTGCTG CTCTGGGTGGCACTGCTGCTGCTCAGCGCGGCGAGG GCCGCCGCGAGTCGCACGTTGTGTGGAGGTGAACTC GTCGACACCCTTCAGTTCGTATGTGGAGATCGCGGTT TCCTCTTCTCACGCCAGCTTCCAGAGTTTCCCGAAG ATCACGAGGAATAGTTGAGGAGTGCTGTTTTCCGGTC TTGTGATCTGGCTCTCCTCGAGACTTATTGTGCTACG CCGGCCCGCTCTGAAGGAGGTGGTGGCAGTGGAGGA GGAGGGAGTCGGCCTAGGGCAGTCCCAACCCAGGA CCCGCCGGCGCCGCTGCCGTTGGTGATCTGGCATGG GATGGGAGACAGCTGTTGCAATCCCTTAAGCATGGG TGCTATTAATAAATGGTGGAGAAGAAAATACCTGG AATTTACGTCTTATCTTTAGAGATTGGGAAGACCCTG ATGGAGGACGTGGAGAACAGCTTCTTCTTGAATGTC AATTCCCAAGTAACAACAGTGTGTCAGGCACTTGCT AAGGATCCTAAATTGCAGCAAGGCTACAATGCTATG</p> | <p>42</p> |

| | | |
|--|--|--|
| | GGATTCTCCCAGGGAGGCCAATTTCTGAGGGGCAGTG GCTCAGAGATGCCCTTCACCTCCCATGATCAATCTGA TCTCGGTTGGGGGACAACATCAAGGTGTTTTTGGACT CCCTCGATGCCCAGGAGAGAGCTCTCACATCTGTGA CTTCATCCGAAAAACACTGAATGCTGGGGCGTACTC CAAAGTTGTTCAGGAACGCCTCGTGCAAGCCGAATA CTGGCATGACCCCATAAAGGAGGATGTGTATCGCAA CCACAGCATCTTCTTGGCAGATATAAATCAGGAGCG GGGTATCAATGAGTCCTACAAGAAAAACCTGATGGC CCTGAAGAAGTTTGTGATGGTGAAATTCCTCAATGA TTCCATTGTGGACCCTGTAGATTCGGAGTGGTTTGGAA TTTTACAGAAGTGGCCAAGCCAAGGAAACCATTTCCC TTACAGGAGACCTCCCTGTACACACAGGACCGCCTG GGGCTAAAGGAAATGGACAATGCAGGACAGCTAGT GTTTCTGGCTACAGAAGGGGACCATCTTCAGTTGTCT GAAGAATGGTTTTATGCCACATCATAACCATTCCTTG GATGA | |
|--|--|--|

[00106] В некоторых вариантах осуществления вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую желаемый терапевтический слитый белок, такой как слитый vIGF2 или слитый сигнальный пептид, необязательно имеющий последовательность участка внутренней посадки рибосомы, представленный в настоящем документе, представляет собой аденоассоциированный вирусный вектор (A5/35).

[00107] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая терапевтический слитый белок, такой как слитый vIGF2, необязательно имеющий последовательность участка внутренней посадки рибосомы, клонируется в несколько типов векторов. Например, в некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота клонируется в вектор, включая, но не ограничиваясь этим, плазмиду, фагмиду, производное фага, вирус

животного и космиду. Векторы, представляющие особый интерес, включают векторы экспрессии, векторы репликации, векторы генерации зондов и векторы секвенирования.

[00108] Кроме того, экспрессионный вектор, кодирующий терапевтический слитый белок, такой как слитый vIGF2 или слитый сигнальный пептид, необязательно имеющий последовательность участка внутренней посадки рибосомы, в некоторых вариантах осуществления, вводится в клетку в форме вирусного вектора. Технология вирусных векторов описана, например, в Sambrook et al., 2012, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY), и в других пособиях по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, которые можно использовать в качестве векторов, включают, но не ограничиваются ими, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса и лентивирусы. В общем, подходящий вектор содержит источник репликации, функционирующий по меньшей мере в одном организме, последовательность промотора, удобные сайты для рестрикционных эндонуклеаз и один или более селективируемых маркеров (например, WO 01/96584; WO 01/29058; и патенты США № 6326193).

[00109] В настоящем документе также представлены композиции и системы для переноса генов. Для переноса генов в клетки млекопитающих был разработан ряд вирусных систем. Например, ретровирусы обеспечивают удобную платформу для систем доставки генов. В некоторых вариантах осуществления выбранный ген вставляют в вектор и упаковывают в ретровирусные частицы с использованием подходящих методик. Затем рекомбинантный вирус выделяют и доставляют в клетки субъекта *in vivo* или *ex vivo*. Ряд ретровирусных систем подходит для генной терапии. В некоторых вариантах осуществления используются аденовирусные векторы. Ряд аденовирусных векторов подходит для генной терапии. В некоторых вариантах осуществления используются аденоассоциированные вирусные векторы. Ряд аденоассоциированных вирусов подходит для генной терапии. В одном варианте осуществления используются лентивирусные векторы.

[00110] Предусмотренные в настоящем описании конструкции для генной терапии содержат вектор (или вектор экспрессии для генной терапии), в который клонирован представляющий интерес ген, или иным образом, который включает представляющий интерес ген таким образом, что нуклеотидные последовательности вектора допускают экспрессию (конститутивную или регулируемую иным образом) представляющий интерес ген. Предлагаемые в настоящем описании векторные конструкции включают любой подходящий вектор экспрессии гена, который может быть доставлен в представляющую интерес ткань и который будет обеспечивать экспрессию представляющего интерес гена в выбранной представляющей интерес ткани.

[00111] В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор аденоассоциированного вируса (ААВ) из-за способности векторов ААВ преодолевать гематоэнцефалический барьер и трансдуцировать нейрональную ткань. В способах, предложенных в настоящем документе, предполагается использование ААВ любого серотипа. Серотип вирусного вектора, используемого в некоторых вариантах осуществления, выбран из группы, состоящей из вектора ААВ1, вектора ААВ2, вектора ААВ3, вектора ААВ4, вектора ААВ5, вектора ААВ6, вектора ААВ7, вектора ААВ8, вектора ААВ9, вектора ААВrhS, вектора ААВrh10, вектора ААВrh33, вектора ААВrh34, вектора ААВrh74, вектора ААВ Anc80, вектора ААВРНР.В, вектора ААВhu68, вектора ААВ-DJ и других, подходящих для генной терапии.

[00112] Векторы ААВ представляют собой ДНК-парвовирусы, непатогенные для млекопитающих. Вкратце, в векторах на основе ААВ были удалены вирусные гены гер и сар, которые составляют 96% вирусного генома, оставляя два фланкирующих инвертированных концевых повтора (ITR) из 145 пар оснований, которые используются для инициации репликации, упаковки и интеграции вирусной ДНК.

[00113] Дополнительные варианты осуществления включают использование капсидов других серотипов для создания вектора ААВ1, вектора

AAB2, вектора AAB3, вектора AAB4, вектора AAB5, вектора AAB6, вектора AAB7, вектора AAB8, вектора AAB9, вектора AABrhS, вектора AABrh10, вектора AABrh33, вектора AABrh34, вектора AABrh74, вектора AAB Anc80, вектора AABPHP.B, вектора AAB-DJ и других, подходящих для генной терапии. Необязательно, вирусный капсид AAB представляет собой AAB2/9, AAB9, AABrhS, AABrh10, AABAnc80 или AAB PHP.B.

[00114] Дополнительные элементы промотора, например энхансеры, регулируют частоту инициации транскрипции. Обычно они расположены в области 30-110 п.о. выше стартового сайта, хотя было показано, что ряд промоторов также содержат функциональные элементы ниже стартового сайта. Интервал между элементами промотора часто бывает гибким, так что функция промотора сохраняется, когда элементы инвертируются или перемещаются относительно друг друга. В промоторе тимидинкиназы (tk) расстояние между элементами промотора часто увеличивается до 50 п.о., прежде чем активность начинает снижаться. В зависимости от промотора оказывается, что отдельные элементы действуют совместно или независимо, активируя транскрипцию.

[00115] Примером промотора, который способен экспрессировать терапевтический слитый белок, такой как слитый vIGF2 или слитый сигнальный пептид, необязательно имеющий последовательность участка внутренней посадки рибосомы, трансген в Т-клетке млекопитающего представляет собой промотор EF1a. Нативный промотор EF1a управляет экспрессией альфа-субъединицы комплекса фактора элонгации-1, который отвечает за ферментативную доставку аминоксил тРНК к рибосоме. Промотор EF1a широко используется в плаزمидях экспрессии млекопитающих, и было показано, что он эффективен в управлении экспрессией трансгенов, клонированных в лентивирусный вектор (см., например, Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009)). Другой пример промотора представляет собой промоторную последовательность гена немедленного раннего ответа цитомегаловируса (CMV). Эта промоторная последовательность представляет собой сильную конститутивную промоторную последовательность, способную управлять

высокими уровнями экспрессии любой полинуклеотидной последовательности, функционально связанной с ней. Однако иногда также используются другие конститутивные промоторные последовательности, включая, помимо прочего, промотор β -актина курицы, промотор P546, ранний промотор вируса обезьяны 40 (SV40), вирус опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотор длинного концевого повтора (LTR) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), промотор MoMuLV, промотор вируса лейкоза птиц, предранний промотор вируса Эпштейна-Барра, промотор вируса саркомы Рауса, а также промоторы гена человека, такие как, помимо прочего, промотор актина, промотор миозина, промотор фактора элонгации-1 α , промотор гемоглобина и промотор креатинкиназы. Кроме того, не предполагается, что векторы для генной терапии ограничиваются использованием конститутивных промоторов. В настоящем описании также рассматриваются индуцируемые промоторы. Использование индуцируемого промотора обеспечивает молекулярный переключатель, способный включать экспрессию полинуклеотидной последовательности, с которой она функционально связана, когда такая экспрессия желательна, или выключать экспрессию, когда экспрессия нежелательна. Примеры индуцируемых промоторов включают, но не ограничиваются ими, промотор металлотионина, промотор глюкокортикоида, промотор прогестерона и промотор, регулируемый тетрациклином.

[00116] Чтобы оценить экспрессию терапевтического слитого белка, такого как слитый vIGF или слитый сигнальный пептид, необязательно имеющего последовательность участка внутренней посадки рибосомы или ее части, вектор экспрессии, который должен быть введен в клетку, часто содержит либо селективный маркерный ген, либо репортерный ген, или и то, и другое, для облегчения идентификации и отбора экспрессирующих клеток из популяции клеток, которые должны быть трансфицированы или инфицированы вирусными векторами. В других аспектах селективируемый маркер часто находится на отдельном участке ДНК и используется в процедуре котрансфекции. Как селективируемые маркеры, так и репортерные гены иногда фланкируются соответствующими регуляторными последовательностями для обеспечения

экспрессии в клетках-хозяевах. Подходящие селективируемые маркеры включают, например, гены устойчивости к антибиотикам, такие как *neo* и т.п.

[00117] Способы и композиции для введения и экспрессии генов в клетке подходят для описанных в настоящем описании способов. В контексте вектора экспрессии вектор легко вводится в клетку-хозяин, например, в клетку млекопитающего, бактерии, дрожжей или насекомого, любым способом известным в данной области техники. Например, вектор экспрессии переносится в клетку-хозяин физическими, химическими или биологическими способами.

[00118] Физические способы и композиции для введения полинуклеотида в клетку-хозяин включают осаждение фосфатом кальция, липофекцию, бомбардировку частицами, микроинъекцию, генную пушку, электропорацию и тому подобное. Способы получения клеток, содержащих векторы и/или экзогенные нуклеиновые кислоты, подходят для описанных в настоящем описании способов (см., например, Sambrook et al., 2012, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY). Одним из способов введения полинуклеотида в клетку-хозяин является трансфекция фосфатом кальция.

[00119] Химические средства и композиции для введения полинуклеотида в клетку-хозяин включают коллоидные дисперсионные системы, такие как комплексы макромолекул, нанокапсулы, микросферы, шарики и системы на основе липидов, включая эмульсии масло-в-воде, мицеллы, смешанные мицеллы, частицы липид-нуклеиновая кислота и липосомы. Типичной коллоидной системой для использования в качестве средства доставки *in vitro* и *in vivo* является липосома (например, искусственная мембранная везикула). Доступны и другие современные способы направленной доставки нуклеиновых кислот, такие как доставка полинуклеотидов с целевыми наночастицами или другая подходящая система доставки субмикронного размера.

[00120] В случае, когда используется невирусная система доставки, типичное средство доставки представляет собой липосому. Предполагается

использование липидных составов для введения нуклеиновых кислот в клетку-хозяин (*in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*). В другом аспекте нуклеиновая кислота связана с липидом. Нуклеиновая кислота, связанная с липидом, в некоторых вариантах осуществления, инкапсулирована во внутреннюю водную среду липосомы, вкраплена в липидный бислой липосомы, присоединена к липосоме через связывающую молекулу, которая связана как с липосомой, так и с олигонуклеотидом, заключенным в липосоме, в комплексе с липосомой, диспергированной в растворе, содержащем липид, смешанный с липидом, в сочетании с липидом, содержащимся в виде суспензии в липиде, содержащимся в комплексе или в комплексе с мицеллой или иным образом связанная с липидом. Композиции, связанные с липидом, липидом/ДНК или липидом/вектором экспрессии, не ограничиваются какой-либо конкретной структурой в растворе. Например, в некоторых вариантах осуществления они присутствуют в двухслойной структуре, в виде мицелл или «сжатой» структуры. В качестве альтернативы, их просто смешивают с раствором, что может привести к образованию агрегатов неоднородного размера или формы. Липиды представляют собой жирные вещества, которые в некоторых вариантах осуществления представляют собой природные или синтетические липиды. Например, липиды включают жирные капли, которые естественным образом встречаются в цитоплазме, а также класс соединений, содержащих длинноцепочечные алифатические углеводороды и их производные, такие как жирные кислоты, спирты, амины, аминспирты и альдегиды.

[00121] Подходящие для использования липиды получают из коммерческих источников. Например, в некоторых вариантах осуществления димиристилфосфатидилхолин («DMPC») получают от Sigma, Сент-Луис, Миссури; в некоторых вариантах осуществления дицетилфосфат («DCP») получают от K&K Laboratories (Плэйнвью, Нью Йорк); холестерин («Choi»), в некоторых вариантах осуществления, получают от Calbiochem-Behring; димиристилфосфатидилглицерин («DMPG») и другие липиды часто получают от Avanti Polar Lipids, Inc. (Бирмингем, Алабама). Исходные растворы липидов в хлороформе или хлороформе/метаноле часто хранят при температуре около -20

°C. Хлороформ используется как единственный растворитель, так как он испаряется легче, чем метанол. Термин «липосома» в контексте настоящего описания представляет собой общий термин, охватывающий множество одно- и многослойных липидных носителей, образованных путем образования замкнутых липидных бислоев или агрегатов. Липосомы часто характеризуются наличием везикулярных структур с двухслойной фосфолипидной мембраной и внутренней водной средой. Многослойные липосомы содержат несколько липидных слоев, разделенных водной средой. Они образуются спонтанно, когда фосфолипиды суспендируют в избытке водного раствора. Липидные компоненты подвергаются самоорганизации перед образованием замкнутых структур и захватывают воду и растворенные вещества между липидными бислоями (Ghosh et al., 1991 *Glycobiology* 5: 505 -10). Однако также охватываются композиции, которые имеют структуру в растворе, отличную от нормальной везикулярной структуры. Например, в некоторых вариантах осуществления липиды имеют мицеллярную структуру или просто существуют в виде неоднородных агрегатов липидных молекул. Также рассматриваются комплексы липофектамин-нуклеиновая кислота.

[00122] Независимо от способа, используемого для введения экзогенных нуклеиновых кислот в клетку-хозяина или иного воздействия на клетку терапевтического слитого белка, такого как слитый vIGF2 или слитый сигнальный пептид, необязательно имеющий последовательность участка внутренней посадки рибосомы, представленную в настоящем документе, для того, чтобы подтвердить присутствие последовательности рекомбинантной ДНК в клетке-хозяине предполагается проведение различных анализов. Такие анализы включают, например, «молекулярно-биологические» анализы, подходящие для описанных в настоящем описании способов, такие как Саузерн- и Нозерн-блоттинг, РВ-ПЦР и ПЦР; «биохимические» анализы, такие как обнаружение присутствия или отсутствия конкретного пептида, например, иммунологическими способами (ИФА и вестерн-блоттинг) или анализами, описанными в настоящем документе, для идентификации агентов, попадающих в объем настоящего описания.

[00123] В настоящем описании также предлагается вектор, содержащий терапевтический слитый белок, такой как слитый vIGF2 или слитый сигнальный пептид, необязательно имеющий последовательность участка внутренней посадки рибосомы, кодирующий молекулу нуклеиновой кислоты. В одном аспекте терапевтический вектор слитого белка может быть напрямую трансдуцирован в клетку. В одном аспекте вектор представляет собой вектор клонирования или экспрессии, например вектор, включающий, но не ограничивающийся, одной или более плазмидами (например, плазмидами экспрессии, векторами клонирования, мини-кольцами, минивекторами, двойными микрохромосомами), ретровирусной и лентивирусной векторной конструкцией. В одном аспекте вектор способен экспрессировать конструкцию слитого терапевтического белка vIGF2 в клетках млекопитающих. В одном аспекте клетка млекопитающего представляет собой клетку человека.

Использования и способы лечения

[00124] В настоящем документе также представлены способы лечения генетических расстройств с использованием генной терапии, включающие введение индивидууму нуклеиновой кислоты, кодирующей терапевтический слитый белок (такой как слитый vIGF2, или слитый сигнальный пептид, или слитый сигнальный пептид-vIGF2), необязательно имеющий последовательность участка внутренней посадки рибосомы, описанной в настоящем документе. Генетические расстройства, подходящие для лечения с использованием способов, описанных в настоящем документе, включают расстройства у индивидуума, вызванные одной или более мутациями в геноме, вызывающими отсутствие экспрессии или экспрессию дисфункционального белка мутантным геном.

[00125] Кроме того, в настоящем документе предложены фармацевтические композиции, содержащие вектор для генной терапии, такой как вектор для генной терапии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую терапевтический слитый белок (такой как слитый vIGF2, или слитый

сигнальный пептид, или слитый сигнальный пептид-v(IGF2), необязательно имеющий последовательность участка внутренней посадки рибосомы, раскрытую в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество для использования при приготовлении лекарственного средства для лечения генетического расстройства.

[00126] Генетические расстройства, подходящие для лечения описанными в настоящем описании способами, включают, но не ограничиваются ими, ахондроплазию, дефицит альфа-1-антитрипсина, антифосфолипидный синдром, аутосомно-доминантную поликистозную болезнь почек, Шарко — Мари — Тута, рак толстой кишки, синдром кошачьего крика, болезнь Крона, муковисцидоз, болезнь Деркума, синдром Дуэйна, мышечную дистрофию Дюшенна, тромбофилию, вызванную мутацией фактора V Лейден, семейную гиперхолестеринемию, семейную средиземноморскую лихорадку, синдром Мартина-Белл, болезнь Гоше, гемохроматоз, гемофилию, голопрозенцефалию, болезнь Хантингтона, синдром Клайнфельтера, синдром Марфана, миотоническую дистрофию, нейрофиброматоз, синдром Нунана, несовершенный остеогенез, болезнь Паркинсона, фенилкетонурию, польскую аномалию, порфирию, прогерия, пигментный ретинит, тяжелый комбинированный иммунодефицит (ТКИД), серповидно-клеточную анемию, спинальную мышечную атрофию, синдром Тея-Сакса, талассемию, триметиламинурию, синдром Тернера, вело-кардио-фациальный синдром, синдром WAGR или болезнь Вильсона. В некоторых вариантах осуществления генетическое заболевание, выбрано из группы, состоящей из расстройства дефицита CDKL5, муковисцидоза, альфа- и бета-талассемии, серповидноклеточной анемии, синдрома Марфана, синдрома Мартина — Белл, болезни Хантингтона, гемохроматоза, врожденной глухоты (несиндромной), болезни Тея — Сакса, семейной гиперхолестеринемии, мышечной дистрофии Дюшенна, болезни Штаргардта, синдрома Ушера, хориидеремии, ахроматопсии, X-сцепленного ретиношизиса, гемофилии, синдрома Вискотта — Олдрича, X-сцепленного хронического гранулематоза, дефицита декарбоксилазы ароматических L-аминокислот, рецессивного дистрофического буллезного

эпидермолиза, дефицита альфа-1-антитрипсина, синдрома прогерии Хатчинсона — Гилфорда (HGPS), синдрома Нунана, X-сцепленного тяжелого комбинированного иммунодефицита (X-SCID).

[00127] В некоторых вариантах осуществления генетические расстройства, подходящие для лечения с использованием представленных в настоящем описании способов, представляют собой лизосомальную болезнь накопления. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения лизосомальные болезни накопления лечат с помощью генной терапии для доставки отсутствующих или дефектных ферментов пациенту. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем описании, доставляют фермент, слитый с vIGF2 или слитый с сигнальным пептидом, пациенту, чтобы доставить фермент в клетку, где он необходим. В некоторых вариантах осуществления лизосомные расстройства накопления выбраны из группы, состоящей из аспартилглюкозаминурии, болезни Баттена, цистиноза, болезни Фабри, болезни Гоше I типа, болезни Гоше II типа, болезни Гоше III типа, болезни Помпе, болезни Тея — Сакса, болезни Сандхоффа, метахроматической лейкодистрофии, муколипидоза I типа, муколипидоза II типа, муколипидоза III типа, муколипидоза IV типа, болезни Гурлера, болезни Хантера, болезни Санфилиппо типа A, болезни Санфилиппо типа B, болезни Санфилиппо типа C, болезни Санфилиппо типа D, болезни Моркио типа A, болезни Моркио типа B, болезни Марото — Лами, болезни Слая, болезни Ниманна — Пика типа A, болезни Ниманна — Пика типа B, болезни Ниманна — Пика типа C1, болезни Ниманна — Пика типа C2, болезни Шиндлера I типа и болезни Шиндлера II типа. В некоторых вариантах осуществления лизосомное расстройство накопления выбрано из группы, состоящей из дефицита активатора, GM2-ганглиозидоза; GM2-ганглиозидоза, варианта AB; альфа-маннозидоза (тип 2, средняя форма; тип 3, неонатальный, тяжелый); бета-маннозидоза; аспартилглюкозаминурии; недостаточности лизосомальной кислой липазы; цистиноза (с поздним началом ювенильного или подросткового нефропатического типа; детского нефропатического типа); синдрома Чанарина — Дорфмана; болезни накопления нейтральных липидов с миопатией;

NLSDM; болезни Данона; болезни Фабри; болезни Фабри, типа II, с поздним началом; болезни Фарбера; липогранулематоза Фарбера; фукозидоза; галактозиалидоза (комбинированная недостаточность нейраминидазы и бета-галактозидазы); болезни Гоше; болезни Гоше II типа; болезни Гоше III типа; болезни Гоше IIIС типа; болезни Гоше, атипичной из-за дефицита сапозина С; GM1-ганглиозидоза (позднего инфантильного/ювенильного GM1-ганглиозидоза; взрослого/хронического GM1-ганглиозидоза); глобоидноклеточной лейкодистрофии, болезни Краббе (с поздним началом в младенческом возрасте; с началом в ювенильном возрасте; с началом во взрослом возрасте); болезни Краббе, атипичной из-за дефицита сапозина А; метахроматической лейкодистрофии (ювенильной; взрослой); частичной недостаточности цереброзидсульфата; недостаточности псевдоарилсульфатазы А; метахроматической лейкодистрофии из-за дефицита сапозина В; нарушений мукополисахаридоза: МПС I, синдрома Гурлера; МПС I, синдрома Херлера — Шейе; МПС I, синдрома Шейе; МПС II, синдрома Хантера; МПС II, синдрома Хантера; синдрома Санфилиппо А/МПС IIIА типа; синдрома Санфилиппо В/МПС IIIВ типа; синдрома Санфилиппо С/МПС IIIС типа; синдрома Санфилиппо D/МПС IIID типа; синдрома Моркио, А/МПС IVА типа; синдрома Моркио, В/МПС IVВ типа; дефицита гиалуронидазы МПС IX; МПС VI синдрома Марото — Лами; МПС VII синдрома Слая; муколипидоза I, сиалидоза типа II; I-клеточной болезни, болезни Лероя, муколипидоза II типа; псевдо-Гурлер-полидистрофии/муколипидоза III типа; муколипидоза IIIС/ML III GAMMA; муколипидоза IV типа; множественной сульфатазной недостаточности; болезни Ниманна — Пика (типа В; типа C1/хронической нейронопатической формы; типа C2; типа D/типа Новой Шотландии); нейрональных цероидных липофусцинозов: болезни CLN6 - атипичной поздней инфантильной, варианта с поздним началом, ранним ювенильным началом; болезни Баттена — Шпильмейера — Фогта/ювенильного NCL/CLN3; финского варианта поздней инфантильной CLN5; болезни Янского — Бельшовского/поздней инфантильной болезни CLN2/TPP1; болезни Куфса/NCL/CLN4 с началом у взрослых (тип В); северной эпилепсии/варианта с

началом в позднем младенчестве CLN8; Сантавуори — Халтия/инфантильной болезни CLN1/PPT; болезни Помпе (болезнь накопления гликогена типа II); болезни Помпе с поздним началом; пикнодизостоза; болезни Сандхоффа/ганглиозидоза GM2; болезни Шиндлера (тип III/промежуточный, переменный); болезни Канзаки; болезни Салла; детской болезни накопления свободной сиаловой кислоты (ISSD); спинальной мышечной атрофии с прогрессирующей миоклонической эпилепсией (SMAPME); болезни Тея — Сакса/ганглиозидоза GM2; болезни Тея — Сакса с ювенильным началом; болезни Тея — Сакса с поздним началом; синдрома Кристиансона; окулоцереброренального синдрома Лоу; болезни Шарко — Мари — Тута типа 4J, CMT4J; синдрома Юниса — Варона; двусторонней височно-затылочной полимикрогирии (ВТОР); X-сцепленного гиперкальциурического нефролитиаза, болезни Дента 1 типа; и болезни Дента 2 типа. В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок связан с лизосомным расстройством накопления, и терапевтический белок выбран из группы, состоящей из белка-активатора GM2; α -маннозидазы; MAN2B1; лизосомальной β -маннозидазы; гликозиласпарагиназы; липазы лизосомальной кислоты; цистинозина; CTNS; PNPLA2; лизосомно-ассоциированного мембранного белка-2; α -галактозидазы A; GLA; кислой церамидазы; α -L-фукозидазы; защитного белка/катепсина A; кислой β -глюкозидазы; GBA; PSAP; β -галактозидазы-1; GLB1; галактозилцерамид- β -галактозидазы; GALC; PSAP; арилсульфатазы A; ARSA; α -L-идуронидазы; идуронат-2-сульфатазы; гепаран-N-сульфатазы; N α -ацетилглюкозаминидазы; гепаранацетил-КоА: α -глюкозаминидацетилтрансферазы; N-ацетилглюкозамин-6-сульфатазы; галактозамин-6-сульфатсульфатазы; β -галактозидазы; гиалуронидазы; арилсульфатазы B; β -глюкуронидазы; нейраминидазы; NEU1; гамма-субъединицы N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазы; муколипина-1; фактора, модифицирующего сульфатазу-1; кислой сфингомиелиназы; SMPD1; NPC1; и NPC2.

[00128] В некоторых вариантах осуществления лечение способами, описанными в настоящем описании, доставляет ген, кодирующий терапевтический белок, в клетку, нуждающуюся в терапевтическом белке. В некоторых вариантах осуществления лечение доставляет ген ко всем соматическим клеткам индивидуума. В некоторых вариантах осуществления лечение заменяет дефектный ген в клетках-мишенях. В некоторых вариантах осуществления клетки, обработанные *ex vivo* для экспрессии терапевтического белка, доставляют индивиду.

[00129] Генная терапия расстройств, описанных в данном документе, обеспечивает лучшие результаты лечения по сравнению с традиционными способами лечения, включая заместительную ферментную терапию, поскольку она не требует длительного лечения инфузией. Кроме того, это снижает риск развития у человека иммунного ответа на терапевтический белок, что часто наблюдается у людей, получающих заместительную ферментную терапию.

Определения

[00130] Используемый в настоящем описании термин «генная терапия *ex vivo*» относится к способам, при которых клетки пациента генетически модифицированы вне субъекта, например, для экспрессии терапевтического гена. Затем клетки с новой генетической информацией возвращаются субъекту, от которого они были получены.

[00131] Используемый в настоящем описании термин «генная терапия *in vivo*» относится к способам, в которых вектор, несущий терапевтический ген(ы), непосредственно вводят субъекту.

[00132] Используемые в настоящем описании термины «слитый белок» и «терапевтический слитый белок» используются в настоящем описании взаимозаменяемо и относятся к терапевтическому белку, имеющему по меньшей мере один дополнительный белок, пептид или полипептид, связанный с ним. В некоторых случаях слитые белки представляют собой единую белковую

молекулу, содержащую два или более белков или их фрагментов, ковалентно связанных пептидной связью в своих соответствующих пептидных цепях, без химических линкеров. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит терапевтический белок и сигнальный пептид, пептид, повышающий эндоцитоз слитого белка, или и то, и другое. В некоторых вариантах осуществления пептид, повышающий эндоцитоз, представляет собой пептид, связывающий CI-MPR.

[00133] Используемый в настоящем описании термин «вектор» или «вектор для генной терапии», используемый в настоящем описании взаимозаменяемо, относится к средствам доставки для генной терапии или носителям, которые доставляют терапевтические гены в клетки. Вектор для генной терапии представляет собой любой вектор, подходящий для использования в генной терапии, например, любой вектор, подходящий для терапевтической доставки полимеров нуклеиновых кислот (кодирующих полипептид или его вариант) в клетки-мишени (например, сенсорные нейроны) пациента. В некоторых вариантах осуществления вектор для генной терапии доставляет нуклеиновую кислоту, кодирующую терапевтический белок или терапевтический слитый белок, в клетку, где терапевтический белок или слитый белок экспрессируется и секретируется из клетки. Вектор может быть любого типа, например, он может представлять собой плазмидный вектор или миникольцевую ДНК. Обычно вектор представляет собой вирусный вектор. К ним относятся как генетически поврежденные вирусы, такие как аденовирус, так и невирусные векторы, такие как липосомы. Вирусный вектор может, например, происходить из аденоассоциированного вируса (ААВ), ретровируса, лентивируса, вируса простого герпеса или аденовируса. Векторы, производные ААВ. Вектор может содержать геном ААВ или его производного.

[00134] Используемый в настоящем описании термин «конструкция» относится к молекуле или последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует терапевтический белок или слитый белок и необязательно содержит

дополнительные последовательности, такие как последовательность инициации трансляции или последовательность IRES.

[00135] Используемый в настоящем описании термин «плазида» относится к кольцевой, двухцепочечной единице ДНК, которая реплицируется внутри клетки независимо от хромосомной ДНК.

[00136] Используемый в настоящем описании термин «промотор» относится к сайту на ДНК, с которым связывается фермент РНК-полимераза и инициирует транскрипцию ДНК в РНК.

[00137] Используемый в настоящем описании термин «соматическая терапия» относится к способам, в которых манипуляции с экспрессией генов в клетках корректируют состояние пациента, но не наследуются следующим поколением. Соматические клетки включают в себя все не репродуктивные клетки тела человека.

[00138] Используемый в настоящем описании термин «соматические клетки» относится ко всем клеткам организма, кроме репродуктивных клеток.

[00139] Используемый в настоящем описании термин «тропизм» относится к предпочтению вектора, такого как вирус, по отношению к определенному типу клетки или ткани. Различные факторы определяют способность вектора инфицировать конкретную клетку. Вирусы, например, должны связываться со специфическими рецепторами клеточной поверхности, чтобы проникнуть в клетку. Вирусы обычно неспособны заразить клетку, если она не экспрессирует необходимые рецепторы.

[00140] Используемый в настоящем описании термин «трансдукция» используется для обозначения введения/доставки нуклеиновой кислоты, кодирующей терапевтический белок, в клетку-мишень либо *in vivo*, либо *in vitro*, через дефицитный по репликации гААВ настоящего описания, что приводит к экспрессии функционального полипептида клеткой-получателем. Трансдукция клеток вектором для генной терапии, таким как гААВ согласно настоящему

описанию, приводит к устойчивой экспрессии полипептида или РНК, кодируемой гААВ. Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает способы введения/доставки субъекту вектора генной терапии, такого как гААВ, кодирующего терапевтический белок, интратекальным, интравитреальным, интрацеребровентрикулярным, внутриглазным, интравитреальным, интрацеребровентрикулярным, интрапарехимальным или внутривенным путем или любой их комбинацией. Используемый в настоящем описании термин «интратекальная» доставка относится к доставке в пространство под паутинной оболочкой головного или спинного мозга. В некоторых вариантах осуществления интратекальное введение осуществляется интрацестернальным введением.

[00141] Используемые в настоящем описании термины «реципиент», «индивидуум», «субъект», «хозяин» и «пациент» используются в настоящем описании взаимозаменяемо и в некоторых случаях относятся к любому субъекту-млекопитающему, для которого желателен диагноз, лечение или терапия, особенно к человеку. Используемый в настоящем описании термин «млекопитающее» в целях лечения относится к любому животному, классифицируемому как млекопитающее, включая людей, домашних и сельскохозяйственных животных, а также лабораторных, зоопарковых, спортивных или домашних животных, таких как собаки, лошади, кошки, коровы, овцы, козы, свиньи, мыши, крысы, кролики, морские свинки, обезьяны и т. д. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее представляет собой человека.

[00142] Используемые в настоящем описании термины «лечение», «лечение», «облегчение симптома» и т.п. в некоторых случаях относятся к введению агента или проведению процедуры с целью получения терапевтического эффекта, включая ингибирование, ослабление, уменьшение, предотвращение или изменение по меньшей мере одного аспекта или маркера нарушения статистически значимым образом или клинически значимым образом. Термин «облегчить» или «лечить» не указывает на и не подразумевает излечение от основного состояния. Используемые в настоящем описании

термины «лечение» или «улучшение» (и т.п.) в контексте настоящего описания могут включать лечение млекопитающего, в частности человека, и включают: (a) предотвращение возникновения расстройства или симптома расстройства у субъекта, который может быть предрасположен к расстройству, но еще не диагностирован как имеющий его (например, включая расстройства, которые могут быть связаны с первичным расстройством или вызваны им); (b) подавление расстройства, то есть остановку его развития; (c) облегчение расстройства, то есть вызывая регресс расстройства, и (d) улучшение по меньшей мере одного симптома расстройства. Лечение может относиться к любым признакам успеха в лечении, облегчении или предупреждении расстройства, включая любой объективный или субъективный параметр, такой как уменьшение; ремиссия; уменьшение симптомов или повышение переносимости состояния расстройства для пациента; замедление скорости дегенерации или упадка; или превращение конечной точки вырождения в менее изнурительную. Лечение или облегчение симптомов основано на одном или более объективных или субъективных параметрах; включая результаты осмотра врачом. Соответственно, термин «лечение» включает введение соединений или агентов по настоящему изобретению для предотвращения или задержки, облегчения или остановки, или ингибирования развития симптомов или состояний, связанных с нарушением. Термин «терапевтический эффект» относится к уменьшению, устранению или предотвращению расстройства, симптомов расстройства или побочных эффектов расстройства у субъекта.

[00143] Термин «аффинность» относится к силе связывания между молекулой и ее партнером по связыванию или рецептором.

[00144] Как использовано в настоящем описании, фраза «высокая аффинность» относится, например, к терапевтическому слиянию, содержащему такой пептид, который связывается с CI-MPR, который имеет аффинность к CI-MPR, которая составляет в от около 100 до 1000 раз или от 500 до 1000 раз выше, чем у терапевтического белка без пептида. В некоторых вариантах осуществления аффинность по меньшей мере в 100, по меньшей мере 500 или по

меньшей мере в 1000 раз выше, чем без пептида. Например, когда терапевтический белок и CI-MPR объединены в относительно равных концентрациях, пептид с высокой аффинностью будет связываться с доступным CI-MPR, чтобы сместить равновесие в сторону высокой концентрации полученного комплекса.

[00145] Используемый в настоящем описании термин «секреция» относится к высвобождению белка из клетки, например, в кровотоки для доставки в интересующую ткань или в место действия терапевтического белка. Когда продукт генной терапии секретируется в интерстициальное пространство органа, секреция может позволить перекрестную коррекцию соседних клеток.

[00146] Используемый в настоящем описании термин «доставка» в контексте настоящего описания означает доставку лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления процесс доставки означает транспортировку лекарственного средства (например, терапевтического белка или слитого белка, полученного из вектора для генной терапии) из-за пределов клетки (например, крови, ткани или интерстициального пространства) в клетку-мишень для терапевтической активности лекарственного средства.

[00147] Используемые в настоящем описании термины «инженерия» или «белковая инженерия» относятся к манипулированию структурами белка путем предоставления соответствующей последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, для получения желаемых свойств или синтеза белка с конкретными структурами.

[00148] Используемый в настоящем описании термин «терапевтически эффективное количество» в некоторых случаях означает количество, которое при введении субъекту для лечения расстройства является достаточным для эффективного лечения этого расстройства.

[00149] Используемый в настоящем описании термин «около» рядом с числом, относится к диапазону, охватывающему от 10% меньше этого числа до

10% больше этого числа, и включает значения в пределах диапазона, такие как само число.

[00150] Используемый в настоящем описании термин «содержащий» элемент или элементы формулы относится к этим элементам, но не препятствует включению дополнительного элемента или элементов.

ПРИМЕРЫ

[00151] Следующие ниже примеры предоставлены с целью иллюстрации различных вариантов осуществления изобретения и не предназначены для ограничения настоящего изобретения каким-либо образом. Настоящие примеры, наряду со способами, описанными в данном документе, в настоящее время представляют предпочтительные варианты осуществления, являются иллюстративными и не предназначены для ограничения объема изобретения. Изменения в них и других применениях, которые охватываются духом изобретения, как определено объемом формулы изобретения, будут очевидны специалистам в данной области техники.

Пример 1: Связывание варианта пептида IGF2 с рецептором CI-MPR

[00152] Эксперименты по поверхностному плазмонному резонансу (ППР) проводили с использованием Biacore для измерения связывания дикого типа и варианта IGF2 (vIGF2) с рецептором CI-MPR. Зрелый пептид IGF2 человека дикого типа (IGF2 дикого типа) имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1. Последовательность vIGF2 отличается от IGF2 дикого типа тем, что в ней отсутствуют остатки 1-4 и содержатся следующие мутации: E6R, Y27L и K65R. Она имеет аминокислотную последовательность: SRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPARSVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLET YCATPARSE (SEQ ID NO: 31). vIGF2 также имеет N-концевой линкер с последовательностью GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18). Комбинированная последовательность представляет собой GGGGSGGGGSRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPARSVSRRSRGIVEECCF

RSCDLALLETYCATPARSE SEQ ID NO: 43). **Фиг. 4** демонстрирует, что, как и ожидалось, пептид IGF2 дикого типа связывается с рецептором CI-MPR с высокой аффинностью (0,2 нМ). **Фиг. 5** демонстрирует, что пептид варианта IGF2 (vIGF2) также связывается с рецептором CI-MPR с высокой аффинностью (0,5 нМ). Эти данные демонстрируют, что пептид vIGF2 имеет высокое сродство к намеченному рецептору CI-MPR для нацеливания терапевтических средств на лизосомы.

[00153] ППР использовали для измерения связывания пептида с рецептором инсулина для оценки потенциальных побочных эффектов. Инсулин связывает рецептор инсулина с высоким сродством (~ 8 нМ; данные не представлены). Были протестированы IGF2 дикого типа и vIGF2, где vIGF2 имел последовательность

SRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPARSVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSE (SEQ ID NO: 31), имеющую N-концевой линкер с последовательностью GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18). **Фиг. 8** демонстрирует, что IGF2 дикого типа также связывает рецептор инсулина с относительно высокой аффинностью (~ 100 нМ). Пептид IGF2 из гибридного белка Biomarin/Zystor IGF2-GAA (BMN-701) также связывает рецептор инсулина с высокой аффинностью и, как было продемонстрировано в клинических испытаниях, вызывает гипогликемию. **Фиг. 9** демонстрирует отсутствие измеримого связывания пептида vIGF2 с рецептором инсулина. Эти данные показывают, что пептид vIGF2 обеспечивает более высокий профиль безопасности по сравнению с гибридными пептидами IGF2 дикого типа.

[00154] Тот же самый анализ связывания ППР использовали для характеристики взаимодействия пептида vIGF2 с рецептором IGF1. **Фиг. 10** демонстрирует, что пептид IGF2 дикого типа связывает рецептор IGF1 с относительно высокой аффинностью (~ 100 нМ). **Фиг. 11** демонстрирует отсутствие измеримого связывания пептида vIGF2 с рецептором IGF1, показывая улучшенный профиль безопасности по сравнению с IGF2 дикого типа.

| Таблица 8: Результаты аффинности по ППР | | | |
|---|-----------------|--------------------------|----|
| Рецептор | дт IGF2 Kd (нМ) | vIGF2 Kd (нМ) | |
| CI-MPR | 0,2 | 0,5 | |
| Рецептор инсулина | 100 | Связывание обнаружено | не |
| Рецептор IGF1 | 100 | Связывание обнаружено | не |

Пример 2: vIGF2 конвертирует низкоаффинный лиганд в высокоаффинный по отношению к CI-MPR для ФЗТ

[00155] Пептид vIGF2 (SEQ ID NO: 31) с N-концевым линкером (SEQ ID NO: 18) был химически связан с альглюкозидазой-альфа, обозначенный в настоящем описании как vIGF2-альглюкозидаза-альфа, чтобы определить, может ли пептид vIGF2 улучшить аффинность к CI-MPR. Как представлено на Фиг.6, аффинности связывания альглюкозидазы-альфа и vIGF2-альглюкозидазы-альфа напрямую сравнивали с использованием анализов связывания на планшете CI-MPR в 96-луночных планшетах ИФА, покрытых CI-MPR. Несвязанный фермент смывали перед измерением активности связанного фермента. Были использованы различные концентрации обоих ферментных препаратов со свободным пептидом IGF2 дикого типа или без него. vIGF2 существенно улучшил аффинность к CI-MPR. Кроме того, связывание vIGF2-альглюкозидазы-альфа блокировалось свободным IGF2 дикого типа, что указывает на то, что связывание было IGF2-зависимым. (Данные не представлены.) Связывание пептида vIGF2 не ухудшало активности фермента GAA.

[00156] vIGF2 был связан с рекомбинантной человеческой N-ацетил- α -D-глюкозаминидазой (rhNAGLU). RrhNAGLU, лизосомальный фермент, лишенный M6P, для определения того, может ли пептид преобразовывать нелиганд в лиганд с высокой аффинностью для CI-MPR. В этом эксперименте rhNAGLU и vIGF2-rhNAGLU сравнивали напрямую с использованием анализов

связывания с планшетами CI-MPR с использованием планшетов, покрытых CI-MPR. Несвязанный фермент смывали перед измерением активности связанного фермента. Были использованы различные концентрации обоих ферментных препаратов со свободным пептидом vIGF2 или без него. Как представлено на **Фиг.7**, vIGF2-rhNAGLU имеет значительно более высокую аффинность к CI-MPR, чем лишенный rhNAGLU vIGF2. Кроме того, связывание vIGF2-rhNAGLU блокировалось свободным пептидом vIGF2, что указывает на то, что связывание рецептора было специфическим для пептида IGF2. Эти результаты показывают, что пептид vIGF2 можно использовать для улучшения нацеливания лекарственного средства на лизосомы.

Пример 3: Поглощение слитых белков vIGF2-GAA миобластами

[00157] Слитые белки vIGF2-GAA (те же последовательности, что и в Примерах 1-2) вводили и измеряли поглощение фермента миобластами L6. **Фиг. 6** демонстрирует превосходное поглощение vIGF2-rhGAA по сравнению с rhGAA и M6P-GAA. Следовательно, vIGF2 эффективен для нацеливания GAA на клетки.

Пример 4: Конструкции для ФЗТ, полученные с помощью генной терапии

[00158] Две разные конструкции представлены на **Фиг. 12**. На верхней панели представлена конструкция, которая содержит последовательность Козак и нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантную GAA человека с нативным сигнальным пептидом (SEQ ID NO: 45), кодирующим «нативную hGAA» (SEQ ID NO: 45). На средней панели представлена конструкция Козак-BiP-vIGF2-2GS-GAA, кодирующая «сконструированную hGAA» (SEQ ID NO: 23). Эта конструкция характеризуется последовательностью Козак, нуклеиновой кислотой, кодирующей сигнальный пептид BiP, нуклеиновой кислотой, кодирующей пептид vIGF2, имеющий последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31, и нуклеиновой кислотой, кодирующей линкер 2GS (SEQ ID NO: 18), за которой следует нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантную GAA

человека с удаленными N-концевыми 60 аминокислотами (SEQ ID NO: 46) для предотвращения преждевременного процессинга и удаления vIGF2.

Пример 5: Повышенная секреция конструкций для генной терапии

[00159] *Сконструированная hGAA имеет большую секрецию и способна взаимодействовать с рецептором клеточной поверхности, подходящим для клеточного поглощения и нацеливания на лизосомы*

СНО, экспрессирующие сконструированную hGAA, более подробно описанную ниже, или нативную hGAA культивировали и собирали кондиционированную среду для измерения активности GAA. Фиг. 15 демонстрирует относительную активность сконструированной и нативной hGAA, показывая, что сконструированная hGAA имеет повышенную активность по сравнению с нативной hGAA, что свидетельствует о более эффективной секреции сконструированной hGAA.

Пример 6: Анализ PPT1 в кондиционированных средах

[00160] *Клонирование конструкций PPT1*

Конструкции PPT1 клонировали в вектор экспрессии pcDNA3.1 (ThermoFisher № в кат. V79020), который содержит промотор CMV. Тестируемые конструкции включали PPT1-1 (WT-PPT1) (SEQ ID NO: 24); PPT1-2 (WT-vIGF2-PPT1) (SEQ ID NO: 25); PPT1-29 (BiP2aa-vIGF2-PPT1) (SEQ ID NO: 26).

Секреция и связывание PPT1

[00161] Конструкции PPT1 временно экспрессировались в клетках НЕК293Т в течение 3 дней, и PPT1 секретировался в среду. Секретированный PPT1 количественно определяли с помощью вестерн-блоттинга и анализировали на связывание CI-MPR с использованием установленных способов. Секретированный PPT1 представлен на Фиг. 13. Связывание CI-MPR представлено на Фиг. 14.

[00162] Пример 7: Тестирование векторов генной терапии на животной модели болезни Помпе

[00163] *Генная терапия болезни Помпе: Дизайн доклинического исследования по экспериментальной проверке концепции*

[00164] Доклиническое исследование было проведено на мышах с нокаутом GAA (GAA KO) с использованием высокой дозы для первоначального сравнения конструкций. Конструкции представлены на Фиг. 12. Мышей обрабатывали носителем или одной из двух конструкций: нативная - hGAA или сконструированная - hGAA. Мышам вводили 5×10^{11} гк/мышь (около $2,5 \times 10^{13}$ гк/кг). Использовали мышей с нокаутом GAA в возрасте 2 месяцев. Нормальных мышей (дикого типа) использовали в качестве контроля. Дизайн исследования представлен на Фиг. 16.

[00165] *Генная терапия болезни Помпе: Плазма*

[00166] Плазму собирали у мышей дикого типа (нормальных) или мышей GAA KO, обработанных носителем или вектором генной терапии, как указано, и измеряли активность GAA и связывание с клеточной поверхностью. Данные представлены на Фиг. 17, Фиг. 27 и Фиг. 19. Аналогичные высокие уровни GAA наблюдались у мышей, получавших векторы для генной терапии (Фиг. 17, Фиг. 18). Однако более сильное связывание с целевым рецептором клеток наблюдалось с сконструированной конструкцией (Фиг. 19).

[00167] *Генная терапия болезни Помпе: Квадрицепс*

[00168] Активность GAA и накопление гликогена/вакуолизацию цитоплазмы оценивали у нормальных мышей (дикого типа) и мышей, получавших GAA KO (Фиг. 28). Активность GAA в квадрицепсе была около в 20 раз выше, чем у дикого типа. ШИК-реакция гликогена (Фиг. 29) и иммуногистохимический анализ (Фиг. 30) были также оценены. Иммуногистохимический анализ показал, что сконструированная hGAA лучше нацеливается на лизосомы по сравнению с диким типом. Снижение гликогена

было более устойчивым для сконструированной hGAA согласно ШИК-окрашиванию.

[00169] *Генная терапия болезни Помпе: Трицепс*

[00170] Активность GAA и накопление гликогена/вакуолизацию цитоплазмы оценивали у нормальных мышей (дикого типа) и у мышей, получавших GAA КО (Фиг. 31). Активность GAA была около в 10-15 раз выше, чем у дикого типа. Также проводили оценку иммуногистохимического анализа и ШИК-реакции гликогена (Фиг. 32 и Фиг. 33). Иммуногистохимический анализ показал, что сконструированная hGAA лучше нацеливается на лизосомы по сравнению с диким типом. Снижение гликогена было более устойчивым для сконструированной hGAA согласно измерению ШИК-окрашивания.

[00171] *Генная терапия болезни Помпе: Передняя большеберцовая мышца (ТА)*

[00172] Активность GAA и накопление гликогена/вакуолизацию цитоплазмы оценивали у нормальных (дикого типа) и мышей, получавших GAA КО (Фиг. 20). Активность GAA в ТА была около в 15-20 раз выше, чем у дикого типа. Также проводили оценку иммуногистохимического анализа и ШИК-реакции гликогена (Фиг. 21 и Фиг. 22). Иммуногистохимический анализ показал, что сконструированная hGAA лучше нацеливается на лизосомы по сравнению с диким типом. Уровни гликогена были близки к уровням дикого типа. Снижение гликогена было более устойчивым для сконструированной hGAA согласно ШИК-окрашиванию.

[00173] *Генная терапия болезни Помпе: Головной и спинной мозг*

[00174] Активность GAA, содержание гликогена и накопление гликогена/вакуолизацию цитоплазмы оценивали у нормальных мышей (дикого типа) и мышей, GAA КО получавших лечение (Фиг. 23). Активность GAA в головном мозге была около в 5 раз ниже, чем у дикого типа. Также проводили оценку иммуногистохимического анализа и ШИК-реакции гликогена (Фиг. 24,

Фиг. 25, Фиг. 26, Фиг. 27). Иммуногистохимия показала, что может иметь место прямая трансдукция некоторых клеток. Однако с нативной конструкцией не было получено клиренса гликогена. Уровни гликогена были близки к уровням дикого типа для сконструированной конструкции, хотя активность составляла только 20% от активности дикого типа. ШИК-окрашивание в спинном мозге показывает незначительный клиренс гликогена с нативной конструкцией или его отсутствие. Уровни гликогена, близкие к дикому типу для сконструированной конструкции, наблюдались в вентральном роге, включая двигательные нейроны. Иммуногистохимический анализ продемонстрировал прямую трансдукцию в нейронах спинного мозга. Сконструированная hGAA, продуцируемая сосудистым сплетением и нейрональными клетками, была способна снижать уровень гликогена путем перекрестной коррекции в спинном мозге, в то время как для естественной hGAA наблюдалось небольшое снижение уровней гликогена.

[00175] *Выводы*

[00176] В целом данные в этом примере продемонстрировали, что сконструированные конструкции для генной терапии значительно лучше поглощаются тканями и снижают уровень гликогена, по сравнению с GAA дикого типа, применяемых при традиционных способах лечения, включая эффекты в головном и спинном мозге.

ПРИМЕР 8: Протоколы исследований на животных

[00177] Векторы AAVhu68 получали и титровали с помощью Penn Vector Core, как описано. (Lock, Alvira et al. 2010, "Rapid, simple, and versatile manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors at scale." Hum Gene Ther 21(10): 1259-1271).

[00178] Mus musculus, мыши Помпе, нокаутированные по Gaa, на фоне C57BL/6/129 были приобретены у Jackson Labs (кат. № 004154, также известные как мыши бпео).

[00179] Мышам вводили 5×10^{11} гк (приблизительно $2,5 \times 10^{13}$ гк/кг) AABhu68.CAG.hGAA (содержащей либо нативную hGAA (SEQ ID NO: 45), либо сконструированную hGAA (SEQ ID NO: 38) в 0,1 мл через боковую хвостовую вену, у них брали кровь на 7-й и 21-й день после введения дозы вектора для выделения сыворотки, окончательно отбирали кровь (для выделения плазмы) и умерщвляли путем обескровливания через 28 дней после инъекции. Ткани были немедленно собраны, начиная с головного мозга.

Активность GAA

[00180] Плазму смешивали с 5,6 мМ 4-MU- α -глюкопиранозида, рН 4,0, и инкубировали в течение трех часов при 37 °С. Реакцию останавливали 0,4 М карбонатом натрия, рН 11,5. Относительные единицы флуоресценции, ОЕФ измеряли с использованием флуориметра Victor3, возбуждение при 355 нм и эмиссия при 460 нм. Активность в единицах нмоль/мл/час рассчитывали путем интерполяции стандартной кривой 4-ME. Активность в отдельных образцах ткани дополнительно нормализовали на основании общего содержания белка в гомогенате.

Сигнатурный пептид GAA по ЖХ/МС

[00181] Плазму осаждали в 100% метаноле и центрифугировали. Супернатанты отбрасывали. В осадок добавляли стабильный меченый изотопом пептид, уникальный для hGAA, в качестве внутреннего стандарта, ресуспендировали с трипсином и инкубировали при 37 °С в течение одного часа. Переваривание было остановлено 10%-ной муравьиной кислотой. Триптические пептиды разделяли обращенно-фазовой хроматографией C-18 и идентифицировали и количественно определяли с помощью ЭСИ-масс-спектрологии. Общую концентрацию GAA в плазме рассчитывали по концентрации сигнатурного пептида.

Анализ связывания рецептора клеточной поверхности

[00182] 96-луночный планшет покрывали рецептором, промывали и блокировали BSA. 28-дневную плазму мышей, обработанных AAV, серийно разводили для получения серии уменьшающихся концентраций и инкубировали со связанным рецептором. После инкубации планшет промывали для удаления любой несвязанной hGAA и добавляли 4-MU- α -глюкопиранозид, и выдерживали в течение одного часа при 37 °C. Реакцию останавливали 1,0 М глицином, pH 10,5, и ОЕФ считывали флуориметром Spectramax; возбуждение при 370, эмиссия при 460. ОЕФ для каждого образца были преобразованы в активность (нмоль/мл/час) путем интерполяции стандартной кривой 4-MU. Нелинейная регрессия была выполнена с помощью GraphPad Prism.

Гистология

[00183] Ткани фиксировали формалином и покрывали парафином. Мышечные слайды окрашивали ШИК; слайды ЦНС с помощью Luxol Fast Blue/реактива Шиффа-иодная кислота (ШИК). Сертифицированный ветеринарный патолог (JH) вслепую просмотрел гистологические препараты. Полуколичественная оценка общего процента клеток с накоплением гликогена и вакуолизацией цитоплазмы была сделана на отсканированных слайдах. Присваивался балл от 0 до 4, как описано в таблице ниже.

| Таблица 9: Оценка гистологии | |
|-------------------------------------|------------------------------|
| | Хранение/Вакуолизация |
| 0 | 0 |
| 1 | От 1 до 9% |
| 2 | От 10 до 49% |
| 3 | От 50 до 74% |
| 4 | От 75 до 100% |

Иммуногистохимический анализ (ИГХ)

Мы изучали экспрессию трансгена и клеточную локализацию на слайдах, иммуноокрашенных с использованием антитела к GAA человека (Sigma HPA029126).

[00184] ПРИМЕР 9: Гистология - обработка тканей - протоколы и результаты на животной модели болезни Помпе

[00185] Все ткани фиксировали в 10% NBF (нейтральный забуференный формалин). Анализы (ШИК и ИГХ) обычно используются в данной области техники.

[00186] Окрашивание квадрицепса и трицепса ШИК (Фиг. 29 и Фиг. 32) -
Ткани фиксировали в 10% NBF и покрывали парафином. Срезы фиксировали 1%-ной периодной кислотой и окрашивали реагентом Шиффа. После этого срезы контрастировали гематоксилином. Гликоген выглядит как агрегаты пурпурного цвета (связанный с лизосомой) или диффузно-розового цвета (цитозольный); ядра имеют синий цвет. Основываясь на изображениях и предполагая, что каждое из них является представителем группы, порядок ранжирования с точки зрения клиренса гликогена следующий: Сконструированная hGAA > нативная hGAA. Сконструированная конструкция hGAA вызвала большее окрашивание на всем изображении по сравнению с остальными, показывая улучшенный эндоцитоз белка GAA, опосредованный связыванием vIGF2 с CI-MPR.

[00187] Окрашивание спинного мозга ШИК (Фиг. 26) - Ткани фиксировали в 10% NBF. Постфиксация в 1%-ной периодной кислоте могла быть проведена до или после покрытия парафином. Срезы окрашивали реактивом Шиффа и контрастировали, вероятно, метиленовым синим. Гликоген выглядит как агрегаты пурпурного цвета (связанный с лизосомой); нервные волокна имеют синий цвет. Изображения были сосредоточены на вентральном роге спинного мозга и накоплении гликогена в мотонейронах. Сконструированная hGAA оказалась наиболее эффективной в снижении уровня гликогена среди конструкций.

[00188] GAA ИГХ (Фиг. 22, Фиг. 25, Фиг. 27, Фиг. 30 и Фиг. 35) - Ткани фиксировали в 10% NBF и покрывали парафином. Срезы инкубировали с первичным антителом к GAA, а затем с вторичным антителом, которое распознает первичное антитело и несет ферментную метку - HRP. Впоследствии была проведена ферментативная реакция, и образовался осаждающийся продукт коричневого цвета. Затем срезы контрастировали гематоксилином. Конструкции показали захват GAA мышечными волокнами (Фиг. 31). Сконструированная hGAA > нативная hGAA. Конструкция ViP-vIGF2 имела более диффузное окрашивание по всему изображению по сравнению с остальными.

[00189] По сравнению с другими векторами сконструированная hGAA продуцировала больше сигналов GAA ИГХ с внешним видом в виде точки внутри мышечных волокон, показывая гораздо более эффективное нацеливание на лизосомы (Фиг. 22).

[00190] В целом сконструированная hGAA последовательно демонстрировала превосходство в захвате тканями, нацеливании на лизосомы и снижении уровня гликогена в различных тканях среди конструкций.

[00191] Хотя в настоящем описании были показаны и описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, для специалистов в данной области техники будет очевидно, что такие варианты осуществления представлены только в качестве примера. Многочисленные вариации, изменения и замены теперь будут очевидны специалистам в данной области без отхода от сущности изобретения. Следует понимать, что могут быть использованы различные альтернативы описанным в настоящем описании вариантам осуществления. Предполагается, что нижеследующая формула изобретения определяет объем изобретения, и что способы и структуры в рамках этой формулы изобретения и их эквиваленты охвачены ею.

Первоначально поданная формула изобретения

1. Вектор для генной терапии, содержащий конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую:
 - (a) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую терапевтический белок, и
 - (b) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую пептид, который связывается с катион-независимым маннозо 6-фосфатным (M6P) рецептором (CI-MPR) с высокой аффинностью.
2. Вектор для генной терапии по п. 1, отличающийся тем, что пептид представляет собой пептид варианта IGF2 (vIGF2).
3. Вектор для генной терапии по п. 2, отличающийся тем, что пептид vIGF2 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 1 и имеет по меньшей мере одну замену в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 6, 26, 27, 43, 48, 49, 50, 54, 55 и 65 из SEQ ID NO: 1.
4. Вектор для генной терапии по п. 3, отличающийся тем, что по меньшей мере одна замена выбрана из группы, состоящей из E6R, F26S, Y27L, V43L, F48T, R49S, S50I, A54R, L55R и K65R из SEQ ID NO: 1.
5. Вектор для генной терапии по пп. 3-4, отличающийся тем, что пептид vIGF2 содержит по меньшей мере две замены в двух или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 26, 27, 43, 48, 49, 50, 54 и 55 из SEQ ID NO: 1.
6. Вектор для генной терапии по п. 5, отличающийся тем, что по меньшей мере две замены выбраны из группы, состоящей из E6R, F26S, Y27L, V43L, F48T, R49S, S50I, A54R, L55R и K65R из SEQ ID NO: 1.

7. Вектор для генной терапии по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что vIGF2 пептид содержит N-концевую делецию в положении 1 SEQ ID NO: 1.
8. Вектор для генной терапии по п. 7, отличающийся тем, что vIGF2 пептид содержит N-концевую делецию в положениях 1-4 SEQ ID NO: 1.
9. Вектор для генной терапии по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что пептид vIGF2 имеет пониженную аффинность или не имеет аффинности к рецептору инсулина и IGFR1 по сравнению с нативным пептидом IGF2.
10. Вектор для генной терапии по п. 9, отличающийся тем, что пептид vIGF2 способен облегчать захват терапевтического белка лизосомами в клетке.
11. Вектор для генной терапии по любому из пп. 1 -10, отличающийся тем, что терапевтический белок способен заменять дефектный или недостаточный белок, связанный с генетическим расстройством, у субъекта, имеющего генетическое расстройство.
12. Вектор для генной терапии по п. 11, отличающийся тем, что генетическое расстройство представляет собой лизосомальную болезнь накопления.
13. Вектор для генной терапии по пп. 11 или 12, отличающийся тем, что генетическое расстройство выбрано из группы, состоящей из аспартилглюкозаминурии, болезни Баттена, цистиноза, болезни Фабри, болезни Гоше I типа, болезни Гоше II типа, болезни Гоше III типа, болезни Помпе, болезни Тея — Сакса, болезни Сандхоффа, метахроматической лейкодистрофии, муколипидоза I типа, муколипидоза II типа, муколипидоза III типа, муколипидоза IV типа, болезни Гурлера, болезни Хантера, болезни Санфилиппо типа А, болезни Санфилиппо типа В, болезни Санфилиппо типа С, болезни Санфилиппо типа D, болезни Моркио типа А, болезни Моркио типа В, болезни Марото — Лами, болезни Слая, болезни Ниманна — Пика типа А, болезни Ниманна — Пика типа В, болезни Ниманна — Пика типа С1, болезни Ниманна — Пика типа С2, болезни Шиндлера I типа, болезни Шиндлера II типа, аденозиндезаминазного тяжелого комбинированного иммунодефицита (ADA-

SCID), хронической гранулематозной болезни (CGD), расстройства дефицита CDKL5 и нейронального цероидного липофусциноза.

14. Вектор для генной терапии по пп. 11 или 12, отличающийся тем, что генетическое расстройство представляет собой болезнь Помпе.

15. Вектор для генной терапии по пп. 11 или 12, отличающийся тем, что генетическое расстройство представляет собой нейрональный цероидный липофусциноз.

16. Вектор для генной терапии по любому из пп. 1-15, отличающийся тем, что терапевтический белок содержит фермент, выбранный из группы, состоящей из альфа-галактозидазы (А или В), β -галактозидазы, β -гексозаминидазы (А или В), галактозилцерамидазы, арилсульфатазы (А или В), β -глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидазы, лизосомальной кислой липазы, лизосомального фермента кислой сфингомиелиназы, формилглицин-генерирующего фермента, идуронидазы (например, альфа-L), ацетил-КоА:альфа-глюкозаминид-N-ацетилтрансферазы, гликозаминогликан-альфа-L-идуроногидролазы, гепаран-N-сульфатазы, N-ацетил- α -D-глюкозаминидазы (NAGLU), идуронат-2-сульфатазы, галактозамин-6-сульфатсульфатазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, гликозаминогликан N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы, β -глюкуронидазы, гиалуронидазы, альфа-N-ацетилнейраминидазы (сиалидазы), ганглиозидсиалидазы, фосфотрансферазы, альфа-глюкозидазы, альфа-D-маннозидазы, бета-D-маннозидазы, аспартилглюкозаминидазы, альфа-L-фукозидазы, баттенина, пальмитоил-протеинтиозстераз и других связанных с болезнью Баттена белков (например, белка 6 нейронального цероидного липофусциноза) или их ферментативно активного фрагмента.

17. Вектор для генной терапии по п. 16, отличающийся тем, что терапевтический белок представляет собой альфа-глюкозидазу или ее ферментативно активный фрагмент.

18. Вектор для генной терапии по п. 16, отличающийся тем, что терапевтический белок представляет собой пальмитоил-протеинтиоэстеразы.
19. Вектор для генной терапии по п. 1, отличающийся тем, что конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность инициации трансляции.
20. Вектор для генной терапии по п. 19, отличающийся тем, что последовательность инициации трансляции содержит последовательность Козак.
21. Вектор для генной терапии по п. 20, отличающийся тем, что последовательность Козак содержит последовательность AX_1X_2ATGA (SEQ ID NO: 28), где каждый из X_1 и X_2 представляет собой любой нуклеотид.
22. Вектор для генной терапии по п. 21, отличающийся тем, что X_1 содержит А.
23. Вектор для генной терапии по пп. 21 или 22, отличающийся тем, что X_2 содержит G.
24. Вектор для генной терапии по пп. 21 или 22, отличающийся тем, что последовательность Козак содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 90% идентичную AAGATGA (SEQ ID NO: 29).
25. Вектор для генной терапии по любому из пп. 20-24, отличающийся тем, что последовательность Козак содержит AAGATGA (SEQ ID NO: 29).
26. Вектор для генной терапии по п. 20, отличающийся тем, что последовательность Козак содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 90% идентичную GCAAGATG (SEQ ID NO: 44).
27. Вектор для генной терапии по пп. 20 или 26, отличающийся тем, что последовательность Козак содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 90% идентичную GCAAGATG (SEQ ID NO: 44).

28. Вектор для генной терапии по п. 1, отличающийся тем, что конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит сигнальную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сигнальный пептид, причем сигнальный пептид способен повышать секрецию терапевтического белка по сравнению с таковой для терапевтического белка без сигнального пептида.
29. Вектор для генной терапии по п. 28, отличающийся тем, что сигнальный пептид выбран из сигнального пептида, связывающего иммуноглобулин (ViP), и сигнального пептида Gaussia.
30. Вектор для генной терапии по п. 29, отличающийся тем, что сигнальный пептид ViP содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13-17.
31. Вектор для генной терапии по п. 29, отличающийся тем, что сигнальный пептид ViP содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13-17.
32. Вектор для генной терапии по п. 28, отличающийся тем, что сигнальный пептид содержит сигнальный пептид Gaussia.
33. Вектор для генной терапии по п. 32, отличающийся тем, что сигнальный пептид Gaussia содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 32.
34. Вектор для генной терапии по п. 32, отличающийся тем, что сигнальный пептид Gaussia содержит SEQ ID NO: 32.
35. Вектор для генной терапии по любому из пп. 1-34, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты vIGF2 расположена на 5' конце относительно последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей терапевтический белок.

36. Вектор для генной терапии по любому из пп. 1-34, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты vIGF2 расположена на 3' конце относительно последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей терапевтический белок.
37. Вектор для генной терапии по любому из пп. 1-36, отличающийся тем, что конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит линкерную последовательность, кодирующую линкерный пептид между нуклеотидной последовательностью vIGF2 и последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей терапевтический белок.
38. Вектор для генной терапии по п. 37, отличающийся тем, что линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 18-21, SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO:37.
39. Вектор для генной терапии по любому из пп. 1-38, отличающийся тем, что вектор для генной терапии представляет собой вирусный вектор.
40. Вектор для генной терапии по п. 39, отличающийся тем, что вирусный вектор представляет собой аденовирусный вектор, вектор аденоассоциированного вируса (AAB), ретровирусный вектор, лентивирусный вектор, вектор вируса оспы, вектор вируса осповакцины, вектор аденовируса или вектор вируса герпеса.
41. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество вектора для генной терапии по любому из пп. 1-40 и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.
42. Фармацевтическая композиция по п. 41, отличающаяся тем, что вспомогательное вещество содержит неионогенное, низкоосмолярное соединение, буфер, полимер, соль или их комбинацию.
43. Способ лечения генетического расстройства, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, вектора для генной терапии по любому из пп. 1-40 или фармацевтической композиции по пп. 41 или 42.

44. Способ по п. 43, отличающийся тем, что генетическое расстройство представляет собой лизосомальную болезнь накопления.

45. Способ по пп. 43 или 44, отличающийся тем, что генетическое расстройство выбрано из группы, состоящей из аспартилглюкозаминурии, болезни Баттена, цистиноза, болезни Фабри, болезни Гоше I типа, болезни Гоше II типа, болезни Гоше III типа, болезни Помпе, болезни Тея — Сакса, болезни Сандхоффа, метахроматической лейкодистрофии, муколипидоза I типа, муколипидоза II типа, муколипидоза III типа, муколипидоза IV типа, болезни Гурлера, болезни Хантера, болезни Санфилиппо типа А, болезни Санфилиппо типа В, болезни Санфилиппо типа С, болезни Санфилиппо типа D, болезни Моркио типа А, болезни Моркио типа В, болезни Марото — Лами, болезни Слая, болезни Ниманна — Пика типа А, болезни Ниманна — Пика типа В, болезни Ниманна — Пика типа С1, болезни Ниманна — Пика типа С2, болезни Шиндлера I типа, болезни Шиндлера II типа, аденозиндезаминазного тяжелого комбинированного иммунодефицита (ADA-SCID), хронической гранулематозной болезни (CGD), расстройства дефицита CDKL5 и нейронального цероидного липофусциноза.

46. Способ по пп. 43 или 44, отличающийся тем, что генетическое расстройство представляет собой болезнь Помпе.

47. Способ по пп. 43 или 44, отличающийся тем, что генетическое расстройство представляет собой нейрональный цероидный липофусциноз.

48. Способ по любому из пп. 43-47, отличающийся тем, что введение осуществляют интратекально, интраокулярно, интравитреально, ретинально, внутривенно, внутримышечно, интравентрикулярно, интрацеребрально, внутримозжечково, интрацеребровентрикулярно, интрапаренхимально, подкожно или их комбинацией.

49. Способ по любому из пп. 43-47, отличающийся тем, что введение осуществляют интратекально.

50. Фармацевтическая композиция, содержащая вектор для генной терапии по любому из пп. 1-40 и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество, для применения в лечении генетических расстройств.

51. Фармацевтическая композиция, содержащая вектор для генной терапии по любому из пп. 1-40 и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество для использования при получении лекарственного средства для лечения генетического расстройства.

52. Фармацевтическая композиция по пп. 50 или 51, отличающаяся тем, что генетическое расстройство представляет собой лизосомальную болезнь накопления.

53. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 50-52, отличающаяся тем, что генетическое расстройство выбрано из группы, состоящей из аспартилглюкозаминурии, болезни Баттена, цистиноза, болезни Фабри, болезни Гоше I типа, болезни Гоше II типа, болезни Гоше III типа, болезни Помпе, болезни Тея — Сакса, болезни Сандхоффа, метахроматической лейкодистрофии, муколипидоза I типа, муколипидоза II типа, муколипидоза III типа, муколипидоза IV типа, болезни Гурлера, болезни Хантера, болезни Санфилиппо типа А, болезни Санфилиппо типа В, болезни Санфилиппо типа С, болезни Санфилиппо типа D, болезни Моркио типа А, болезни Моркио типа В, болезни Марото — Лами, болезни Слая, болезни Ниманна-Пика типа А, болезни Ниманна-Пика типа В, болезни Ниманна — Пика типа С1, болезни Ниманна — Пика типа С2, болезни Шиндлера I типа, болезни Шиндлера II типа, аденозиндезаминазного тяжелого комбинированного иммунодефицита (ADA-SCID), хронической гранулематозной болезни (CGD) и нейронального цероидного липофусциноза.

54. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 50-53, отличающаяся тем, что генетическое расстройство представляет собой болезнь Помпе.

55. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 50-53, отличающаяся тем, что генетическое расстройство представляет собой нейрональный цероидный липофусциноз.

56. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 50-55, отличающаяся тем, что композиция составлена для интратекального, интраокулярного, интравитреального, ретинального, внутривенного, внутримышечного, интравентрикулярного, интрацеребрального, внутримозжечкового или подкожного введения.

57. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 50-56, отличающаяся тем, что композиция составлена для интратекального введения.

58. Вектор для генной терапии, содержащий конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую в порядке от 5' до 3':

(a) последовательность инициации трансляции, и

(b) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую терапевтический белок.

58. Вектор для генной терапии по п. 58, отличающийся тем, что последовательность инициации трансляции содержит последовательность Козак.

59. Вектор для генной терапии по п. 58, отличающийся тем, что последовательность Козак содержит последовательность AX_1X_2ATGA (SEQ ID NO: 28), где каждый из X_1 и X_2 представляет собой любой нуклеотид.

60. Вектор для генной терапии по п. 59, отличающийся тем, что X_1 содержит А.

61. Вектор для генной терапии по пп. 59 или 60, отличающийся тем, что X_2 содержит G.

62. Вектор для генной терапии по любому из пп. 58-61 отличающийся тем, что последовательность Козак содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 90% идентичную AAGATGA (SEQ ID NO: 29).
63. Вектор для генной терапии по любому из пп. 58-62, отличающийся тем, что последовательность Козак содержит AAGATGA (SEQ ID NO: 29).
64. Вектор для генной терапии по п. 58, отличающийся тем, что последовательность Козак содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 90% идентичную GCAAGATG (SEQ ID NO: 44).
65. Вектор для генной терапии по пп. 58 или 64, отличающийся тем, что последовательность Козак содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 90% идентичную GCAAGATG (SEQ ID NO: 44).
66. Вектор для генной терапии по любому из пп. 58-65, отличающийся тем, что конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сигнальный пептид способный повышать секрецию терапевтического белка по сравнению с таковой для терапевтического белка без сигнального пептида.
67. Вектор для генной терапии по п. 66, отличающийся тем, что сигнальный пептид, выбран из сигнального пептида, связывающего иммуноглобулин (ViP), и сигнального пептида Gaussia.
68. Вектор для генной терапии по п. 67, отличающийся тем, что сигнальный пептид ViP содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13-17.
69. Вектор для генной терапии по п. 67, отличающийся тем, что сигнальный пептид ViP содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13-17.

70. Вектор для генной терапии по п. 67, отличающийся тем, что сигнальный пептид *Gaussia* содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 32.
71. Вектор для генной терапии по п. 67, отличающийся тем, что сигнальный пептид *Gaussia* содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32.
72. Вектор для генной терапии по любому из пп. 58-71, отличающийся тем, что конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность участка внутренней посадки рибосомы (IRES).
73. Вектор для генной терапии по п. 72, отличающийся тем, что IRES представляет собой IRES вируса паралича сверчка (CrPV).
74. Вектор для генной терапии по пп. 72 или п.73, отличающийся тем, что последовательность IRES содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 12.
75. Вектор для генной терапии по пп. 72 или 73, отличающийся тем, что IRES содержит SEQ ID NO: 12.
76. Вектор для генной терапии, содержащий конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую в порядке от 5' до 3':
- (a) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сигнальный пептид, и
 - (b) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую терапевтический белок, причем сигнальный пептид способен повышать секрецию терапевтического белка по сравнению с таковой для терапевтического белка без сигнального пептида.
77. Вектор для генной терапии по п. 76, отличающийся тем, что сигнальный пептид выбран из сигнального пептида, связывающего иммуноглобулин (BiP), и сигнального пептида *Gaussia*.

78. Вектор для генной терапии по п. 77, отличающийся тем, что сигнальный пептид ViP содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13-17.
79. Вектор для генной терапии по п. 77, отличающийся тем, что сигнальный пептид ViP содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13-17.
80. Вектор для генной терапии по любому из пп. 76-79, отличающийся тем, что сигнальный пептид содержит сигнальный пептид Gaussia.
81. Вектор для генной терапии по п. 80, отличающийся тем, что сигнальный пептид Gaussia содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 32.
82. Вектор для генной терапии по п. 80, отличающийся тем, что сигнальный пептид Gaussia содержит SEQ ID NO: 32.
83. Вектор для генной терапии по любому из пп. 76-82, отличающийся тем, что конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность инициации трансляции.
84. Вектор для генной терапии по п. 83, отличающийся тем, что последовательность инициации трансляции содержит последовательность Козак, содержащую AX_1X_2ATGA (SEQ ID NO: 28), где каждый из X_1 и X_2 .
85. Вектор для генной терапии по п. 84, отличающийся тем, что X_1 содержит А.
86. Вектор для генной терапии по пп. 84 или 85, отличающийся тем, что X_2 содержит G.

87. Вектор для генной терапии по любому из пп. 84-86 отличающийся тем, что последовательность Козак содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 90% идентичную AAGATGA (SEQ ID NO: 29).

88. Вектор для генной терапии по любому из пп. 84-87, отличающийся тем, что последовательность Козак содержит AAGATGA (SEQ ID NO: 29).

89. Вектор для генной терапии по п. 83, отличающийся тем, что последовательность инициации трансляции содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 90% идентичную GCAAGATG (SEQ ID NO: 44).

90. Вектор для генной терапии по пп. 83 или 89, отличающийся тем, что последовательность инициации трансляции содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 90% идентичную GCAAGATG (SEQ ID NO: 44).

91. Вектор для генной терапии по любому из пп. 76-90, отличающийся тем, что конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность участка внутренней посадки рибосомы (IRES).

92. Вектор для генной терапии по п. 91, отличающийся тем, что IRES содержит IRES выбранную из группы состоящей из IRES вируса паралича сверчка (CrPV), IRES пикорнавируса, IRES афтоввируса, IRES вируса герпеса, связанного с саркомой Капоши, IRES гепатита А, IRES гепатита С, IRES пестивируса, IRES крипавируса, IRES вируса *Rhopalosiphum padi* и IRES вируса болезни Мерека.

93. Вектор для генной терапии по пп. 91 или 92, отличающийся тем, что последовательность IRES содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 12.

94. Вектор для генной терапии по любому из пп. 91-93, отличающийся тем, что последовательность IRES содержит SEQ ID NO: 12.

95. Вектор для генной терапии, содержащий конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую в порядке от 5' до 3':

(a) последовательность участка внутренней посадки рибосомы (IRES), и

(b) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую терапевтический белок.

96. Вектор для генной терапии по п. 95, отличающийся тем, что IRES содержит IRES выбранную из группы состоящей из IRES вируса паралича сверчка (CrPV), IRES пикорнавируса, IRES афтовируса, IRES вируса герпеса, связанного с саркомой Капоши, IRES гепатита А, IRES гепатита С, IRES пестивируса, IRES крипавируса, IRES вируса *Rhopalosiphum padi* и IRES вируса болезни Мерка.

97. Вектор для генной терапии по п. 96, отличающийся тем, что IRES представляет собой IRES вируса паралича сверчка (CrPV).

98. Вектор для генной терапии по пп. 96 или 97, отличающийся тем, что последовательность IRES содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 12.

99. Вектор для генной терапии по любому из пп. 96-98, отличающийся тем, что последовательность IRES содержит SEQ ID NO: 12.

100. Вектор для генной терапии по любому из пп. 95-99, отличающийся тем, что конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность инициации трансляции.

101. Вектор для генной терапии по п. 100, отличающийся тем, что последовательность инициации трансляции содержит последовательность Козак, содержащую AX_1X_2ATGA (SEQ ID NO: 28), где каждый из X_1 и X_2 представляет собой любой нуклеотид.

102. Вектор для генной терапии по п. 101, отличающийся тем, что X_1 содержит А.
103. Вектор для генной терапии по пп. 101 или 202, отличающийся тем, что X_2 содержит G.
104. Вектор для генной терапии по любому из пп. 101-103 отличающийся тем, что последовательность Козак содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 90% идентичную AAGATGA (SEQ ID NO: 29).
105. Вектор для генной терапии по любому из пп. 101-104, отличающийся тем, что последовательность Козак содержит AAGATGA (SEQ ID NO: 29).
106. Вектор для генной терапии по п. 100, отличающийся тем, что последовательность инициации трансляции содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 90% идентичную GCAAGATG (SEQ ID NO: 44).
107. Вектор для генной терапии по пп. 100 или 106, отличающийся тем, что последовательность инициации трансляции содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 90% идентичную GCAAGATG (SEQ ID NO: 44).
108. Вектор для генной терапии по любому из пп. 95-107, отличающийся тем, что конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность сигнальной нуклеиновой кислоты, кодирующую сигнальный пептид способный повышать секрецию терапевтического белка по сравнению с таковой для терапевтического белка без сигнального пептида.
109. Вектор для генной терапии по п. 106, отличающийся тем, что сигнальный пептид выбран из сигнального пептида, связывающего иммуноглобулин (BiP), и сигнального пептида Gaussia.
110. Вектор для генной терапии по п. 109, отличающийся тем, что сигнальный пептид BiP содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на

90% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13-17.

111. Вектор для генной терапии по п. 109, отличающийся тем, что сигнальный пептид ViP содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13-17.

112. Вектор для генной терапии по п. 109, отличающийся тем, что сигнальный пептид Gaussia содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 32.

113. Вектор для генной терапии по п. 109, отличающийся тем, что сигнальный пептид Gaussia содержит SEQ ID NO: 32.

114. Вектор для генной терапии по любому из пп. 58-113, отличающийся тем, что конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую пептид IGF2.

115. Вектор для генной терапии по п. 114, отличающийся тем, что пептид IGF2 представляет собой пептид vIGF2, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-11, SEQ ID NO: 30-31, SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 35.

116. Вектор для генной терапии по п. 114, отличающийся тем, что пептид IGF2 представляет собой пептид vIGF2, содержащий аминокислотную последовательность выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-11, SEQ ID NO: 30-31, SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 35.

117. Вектор для генной терапии по любому из пп. 114-116, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность vIGF2 расположена на 5' конце относительно последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей терапевтический белок.

118. Вектор для генной терапии по любому из пп. 114-116, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность vIGF2 расположена на 3' конце относительно последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей терапевтический белок.

119. Вектор для генной терапии по любому из пп. 114-118, отличающийся тем, что конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит линкерную последовательность, кодирующую линкерный пептид между нуклеотидной последовательностью vIGF2 и последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей терапевтический белок.

120. Вектор для генной терапии по п. 119, отличающийся тем, что линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 18-21, SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 37.

121. Вектор для генной терапии по п. 119, отличающийся тем, что линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 18-21, SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 37.

122. Вектор для генной терапии по любому из пп. 58-121, отличающийся тем, что терапевтический белок выбран из группы, состоящей из альфа-галактозидазы (А или В), β -галактозидазы, β -гексозаминидазы (А или В), галактозилцерамидазы, арилсульфатазы (А или В), β -глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидазы, липазы лизосомальной кислоты, лизосомального фермента кислой сфингомиелиназы, формилглицин-генерирующего фермента, идуронидазы (например, альфа-L), ацетил-КоА: альфа-глюкозаминид-N-ацетилтрансферазы, гликозаминогликан-альфа-L-идуроногидролазы, гепаран-N-сульфатазы, N-ацетил- α -D-глюкозаминидазы (NAGLU), идуронат-2-сульфатазы, галактозамин-6-сульфатсульфатазы, N-ацетилсульфатазы-6-сульфатазы, гликозаминогликан N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы, β -глюкуронидазы, гиалуронидазы, альфа-N-ацетилнейраминидазы (сиалидазы), ганглиозидсиалидазы, фосфотрансферазы, альфа-глюкозидазы, альфа-D-маннозидазы, бета-D-маннозидазы, аспартилглюкозаминидазы, альфа-L-фукозидазы, баттенина, пальмитоил-протеинтиозстераз и других связанных с

болезнью Баттена белков (например, белка 6 нейронального цероидного липофусциноза) или их ферментативно активного фрагмента.

123. Вектор для генной терапии по п. 122, отличающийся тем, что терапевтический белок представляет собой альфа-глюкозидазу или ее ферментативно активный фрагмент.

124. Вектор для генной терапии по п. 122, отличающийся тем, что фермент представляет собой пальмитоил-протеинтиоэстеразу.

125. Вектор для генной терапии по п. 122, отличающийся тем, что терапевтический белок способен заменять дефектный или недостаточный белок, связанный с генетическим расстройством, у субъекта, имеющего генетическое расстройство.

126. Вектор для генной терапии по п. 125, отличающийся тем, что генетическое расстройство представляет собой лизосомальную болезнь накопления.

127. Вектор для генной терапии по п. 125, отличающийся тем, что генетическое расстройство выбрано из группы, состоящей из аспартилглюкозаминурии, болезни Баттена, цистиноза, болезни Фабри, болезни Гоше I типа, болезни Гоше II типа, болезни Гоше III типа, болезни Помпе, болезни Тея — Сакса, болезни Сандхоффа, метахроматической лейкодистрофии, муколипидоза I типа, муколипидоза II типа, муколипидоза III типа, муколипидоза IV типа, болезни Гурлера, болезни Хантера, болезни Санфилиппо типа А, болезни Санфилиппо типа В, болезни Санфилиппо типа С, болезни Санфилиппо типа D, болезни Моркио типа А, болезни Моркио типа В, болезни Марото — Лами, болезни Слая, болезни Ниманна — Пика типа А, болезни Ниманна — Пика типа В, болезни Ниманна — Пика типа С1, болезни Ниманна — Пика типа С2, болезни Шиндлера I типа, болезни Шиндлера II типа, аденозиндезаминазного тяжелого комбинированного иммунодефицита (ADA-SCID) и нейронального цероидного липофусциноза.

128. Вектор для генной терапии по п. 125, отличающийся тем, что генетическое расстройство представляет собой болезнь Помпе.

129. Вектор для генной терапии по п. 125, отличающийся тем, что генетическое расстройство представляет собой нейрональный цероидный липофуциноз.

130. Вектор для генной терапии по любому из пп. 58-129, отличающийся тем, что вектор для генной терапии представляет собой вирусный вектор.

131. Вектор для генной терапии по п. 130, отличающийся тем, что вирусный вектор представляет собой вектор аденоассоциированного вируса, ретровирусный вектор, лентивирусный вектор, вектор вируса оспы, вектор вируса осповакцины, вектор аденовируса или вектор вируса герпеса.

132. Фармацевтическая композиция, содержащая (i) терапевтически эффективное количество вектора для генной терапии по любому из пп. 58-131 и (ii) фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

133. Фармацевтическая композиция по п. 132, отличающаяся тем, что носитель или вспомогательное вещество содержит неионогенное, низкоосмолярное соединение, буфер, полимер, соль или их комбинацию.

134. Способ лечения генетического расстройства, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, вектора для генной терапии по любому из пп. 58-131 или фармацевтической композиции по пп. 132 или 133.

135. Способ по п. 134, отличающийся тем, что генетическое расстройство представляет собой лизосомальную болезнь накопления.

136. Способ по пп. 134 или 135, отличающийся тем, что генетическое расстройство выбрано из группы, состоящей из аспартилглюкозаминурии, болезни Баттена, цистиноза, болезни Фабри, болезни Гоше I типа, болезни Гоше II типа, болезни Гоше III типа, болезни Помпе, болезни Тея — Сакса, болезни Сандхоффа, метахроматической лейкодистрофии, муколипидоза I типа,

муколипидоза II типа, муколипидоза III типа, муколипидоза IV типа, болезни Гурлера, болезни Хантера, болезни Санфилиппо типа А, болезни Санфилиппо типа В, болезни Санфилиппо типа С, болезни Санфилиппо типа D, болезни Моркио типа А, болезни Моркио типа В, болезни Марото — Лами, болезни Слая, болезни Ниманна — Пика типа А, болезни Ниманна — Пика типа В, болезни Ниманна — Пика типа С1, болезни Ниманна — Пика типа С2, болезни Шиндлера I типа, болезни Шиндлера II типа, аденозиндезаминазного тяжелого комбинированного иммунодефицита (ADA-SCID) и нейронального цероидного липофусциноза.

137. Способ по пп. 134 или 135, отличающийся тем, что генетическое расстройство представляет собой болезнь Помпе.

138. Способ по пп. 134 или 135 отличающийся тем, что генетическое расстройство представляет собой нейрональный цероидный липофусциноз.

139. Способ по любому из пп. 134-138, отличающийся тем, что введение осуществляют интратекально, внутривенно, внутримышечно, интравентрикулярно, интрацеребрально, внутримозжечково, интрацеребровентрикулярно, интрапаренхимально, оккулярно, подкожно или их комбинацией.

140. Способ по любому из пп. 134-139, отличающийся тем, что введение осуществляют интратекально.

141. Фармацевтическая композиция, содержащая вектор для генной терапии по любому из пп. 58-131 и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество, для применения в лечении генетических расстройств.

142. Фармацевтическая композиция, содержащая вектор для генной терапии по любому из пп. 58-131 и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество для использования при получении лекарственного средства для лечения генетического расстройства.

143. Фармацевтическая композиция по пп. 141 или 142, отличающаяся тем, что генетическое расстройство представляет собой лизосомальную болезнь накопления.

144. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 141-143, отличающийся тем, что генетическое расстройство выбрано из группы, состоящей из аспартилглюкозаминурии, болезни Баттена, цистиноза, болезни Фабри, болезни Гоше I типа, болезни Гоше II типа, болезни Гоше III типа, болезни Помпе, болезни Тея — Сакса, болезни Сандхоффа, метахроматической лейкодистрофии, муколипидоза I типа, муколипидоза II типа, муколипидоза III типа, муколипидоза IV типа, болезни Гурлера, болезни Хантера, болезни Санфилиппо типа А, болезни Санфилиппо типа В, болезни Санфилиппо типа С, болезни Санфилиппо типа D, болезни Моркио типа А, болезни Моркио типа В, болезни Марото — Лами, болезни Слая, болезни Ниманна — Пика типа А, болезни Ниманна — Пика типа В, болезни Ниманна — Пика типа С1, болезни Ниманна — Пика типа С2, болезни Шиндлера I типа, болезни Шиндлера II типа, аденозиндезаминазного тяжелого комбинированного иммунодефицита (ADA-SCID) и нейронального цероидного липофусциноза.

145. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 141-144, отличающаяся тем, что генетическое расстройство представляет собой болезнь Помпе.

146. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 141-144, отличающаяся тем, что генетическое расстройство представляет собой нейрональный цероидный липофусциноз.

147. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 141-146, отличающаяся тем, что композиция составлена для интратекального, внутривенного, внутримышечного, интравентрикулярного, интрацеребрального, внутримозжечкового, окулярного или подкожного введения.

148. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 141-147, отличающаяся тем, что композиция составлена для интратекального введения.

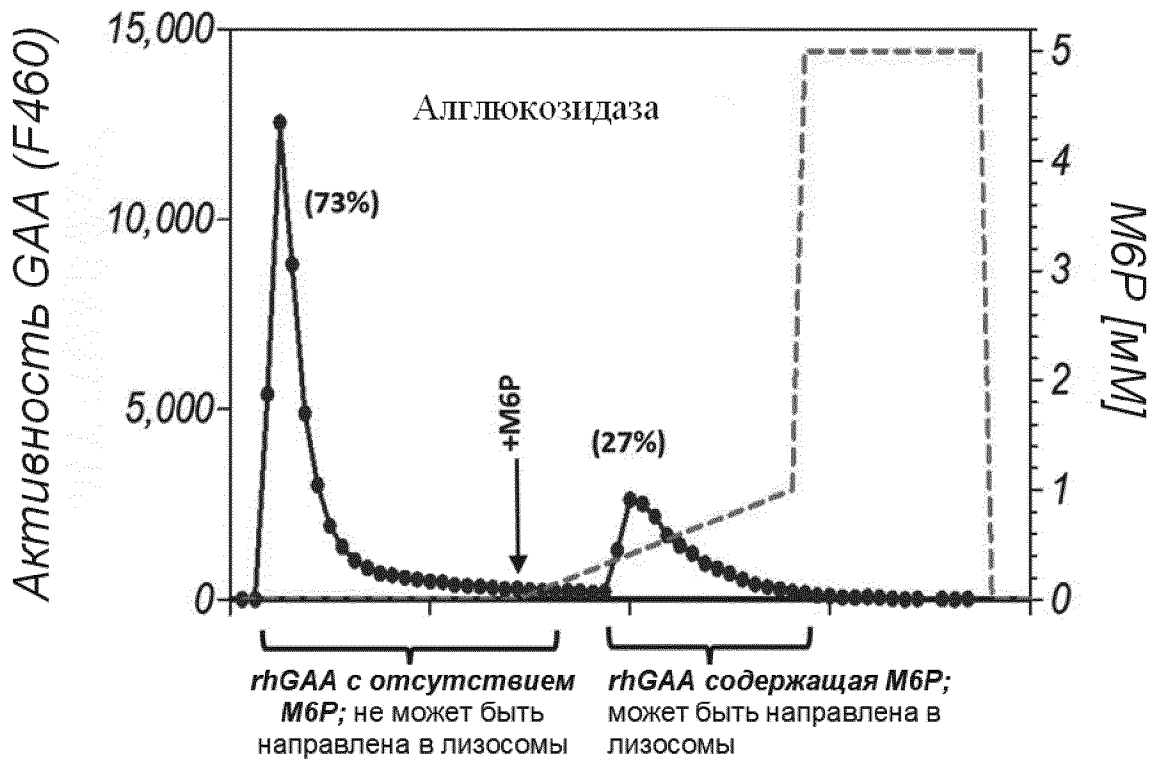
149. Вектор для генной терапии, содержащий конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую:

(a) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую терапевтический белок, и

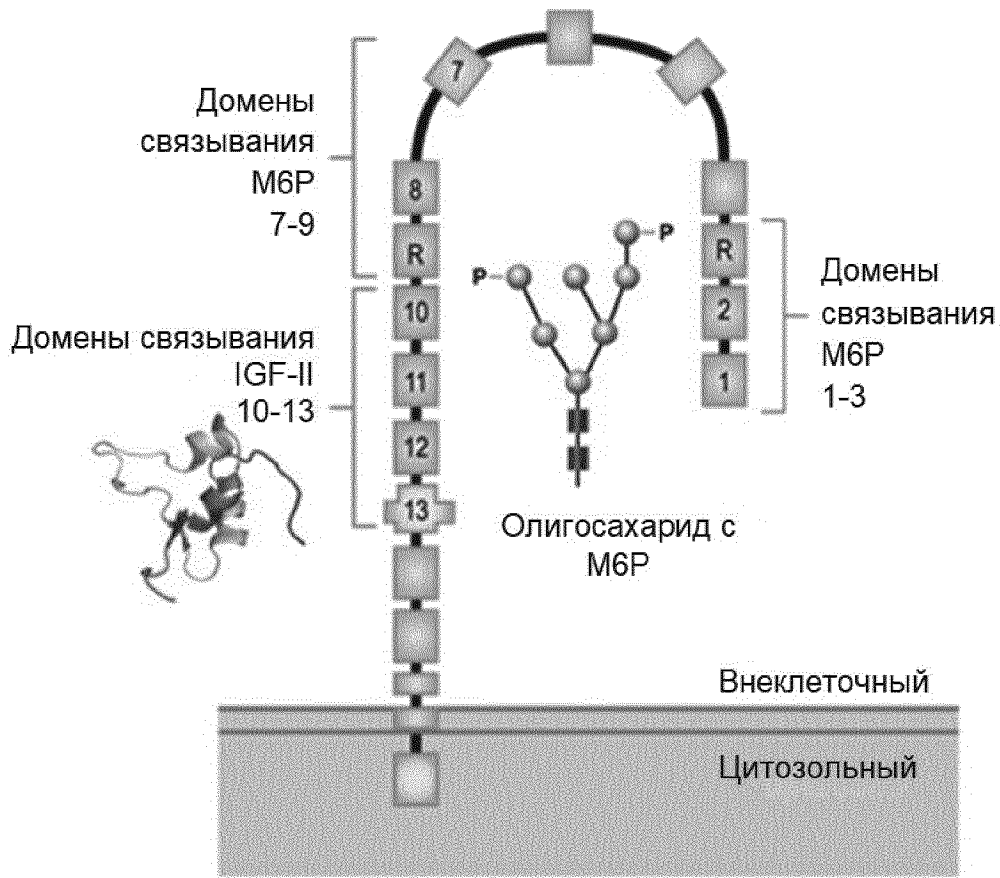
(b) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую пептид, который повышает эндоцитоз терапевтического белка.

150. Вектор для генной терапии по п. 149, отличающийся тем, что пептид, который повышает эндоцитоз терапевтического белка представляет собой пептид, который связывается с CI-MPR.

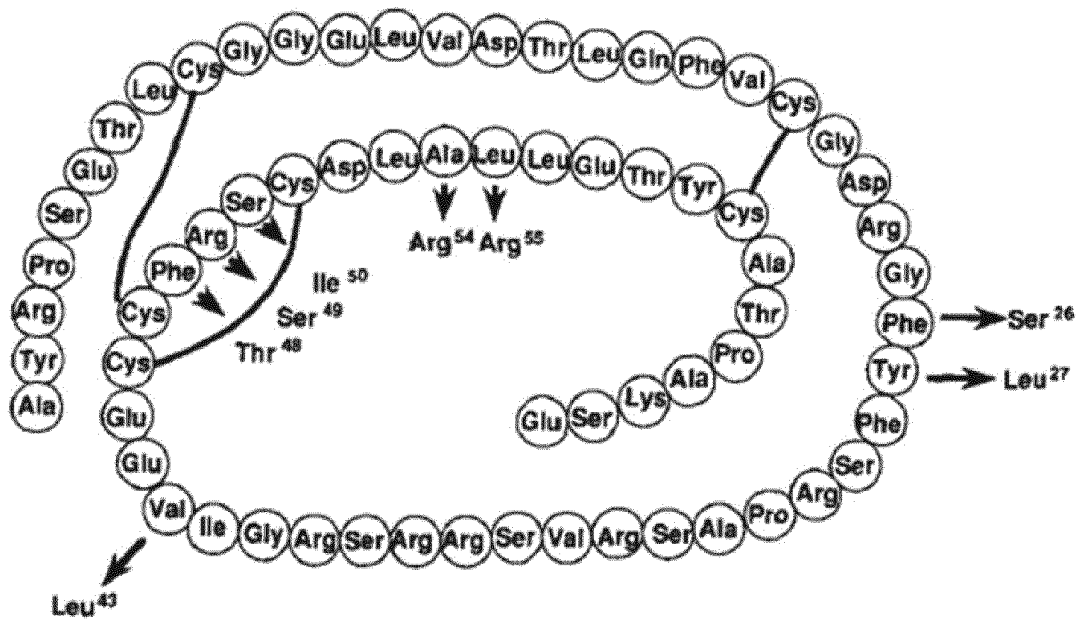
Хроматография с M6P



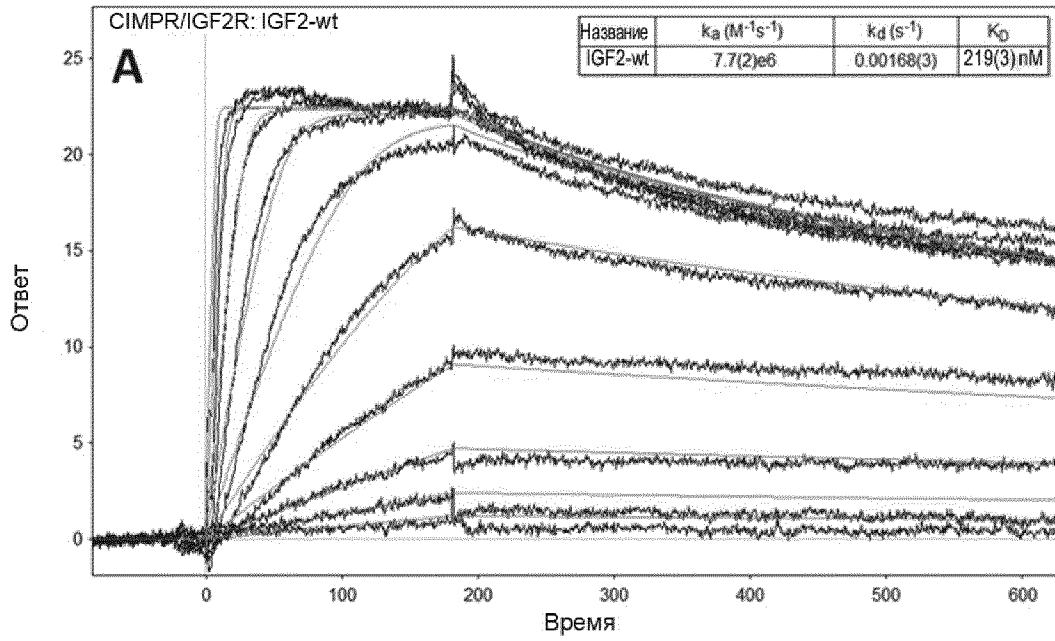
Фиг. 1



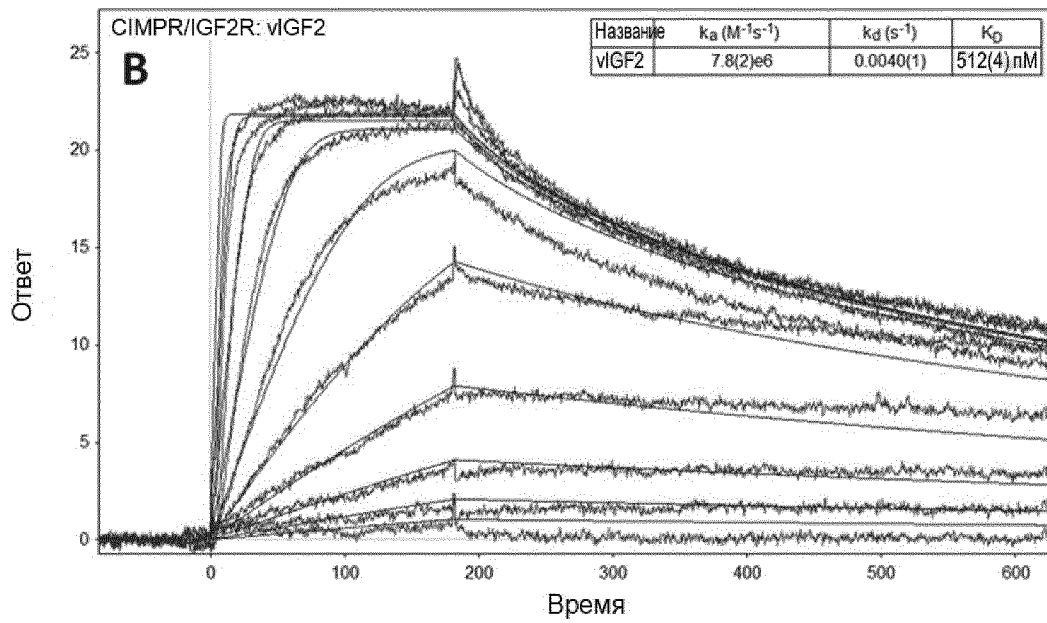
Фиг. 2



Фиг. 3

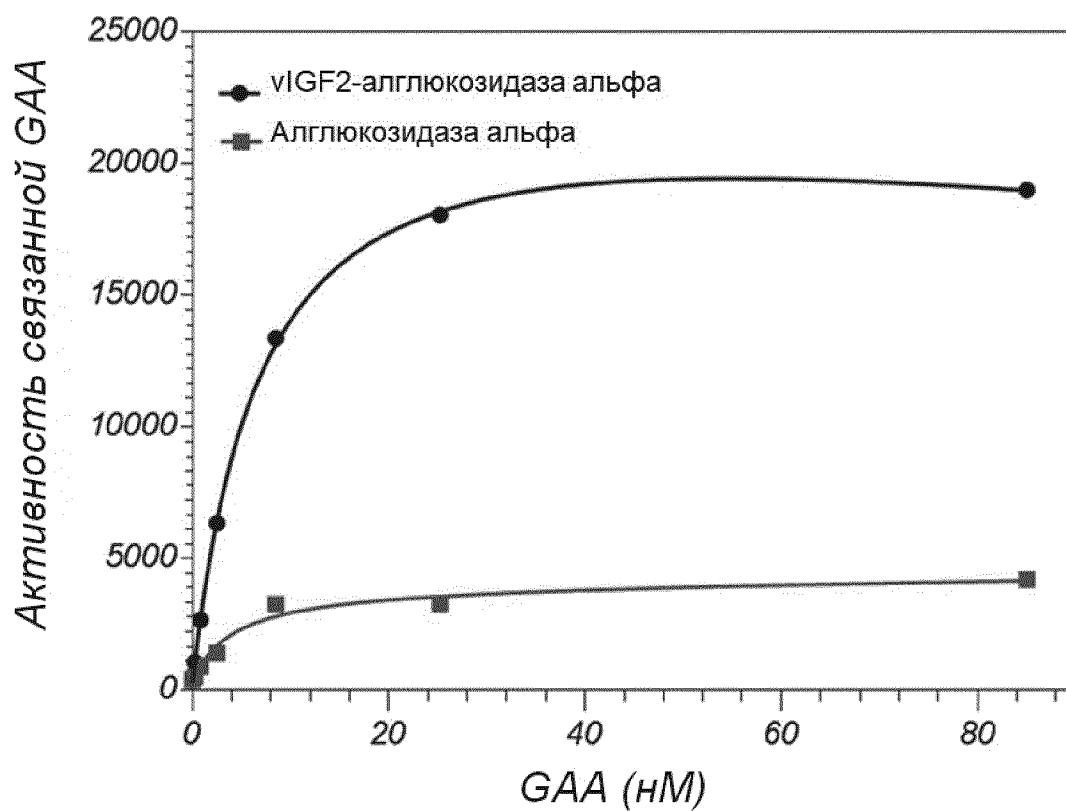


Фиг. 4



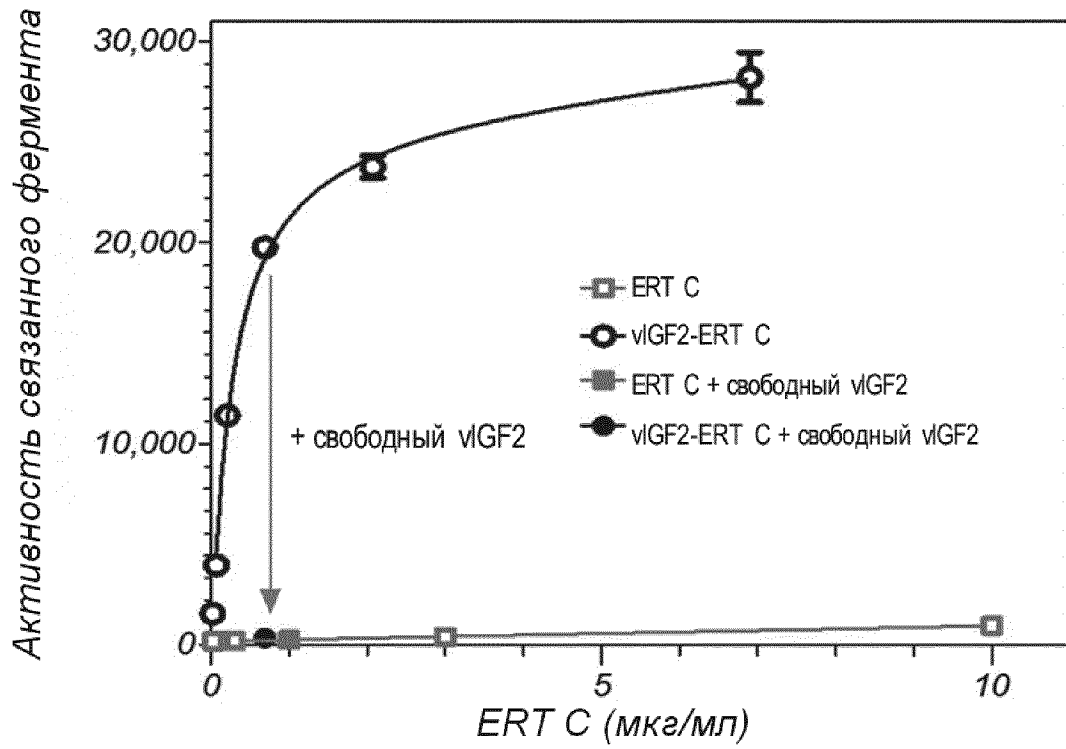
Фиг. 5

Связывание с рецептором IGF2/CI-

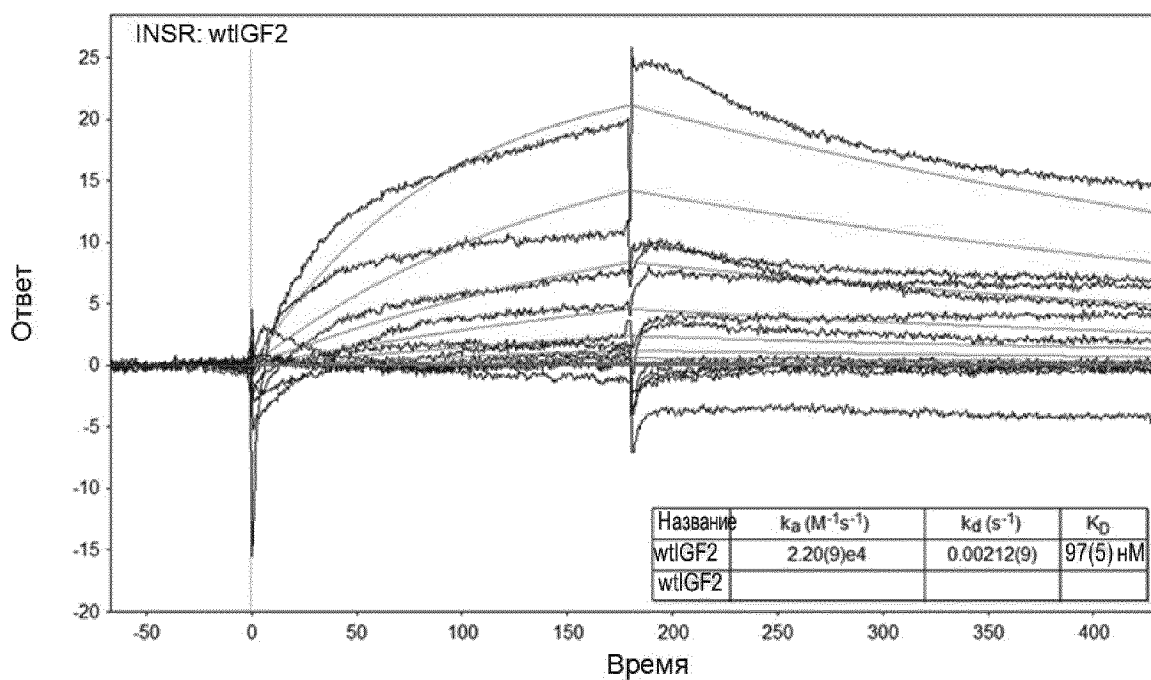


Фиг. 6

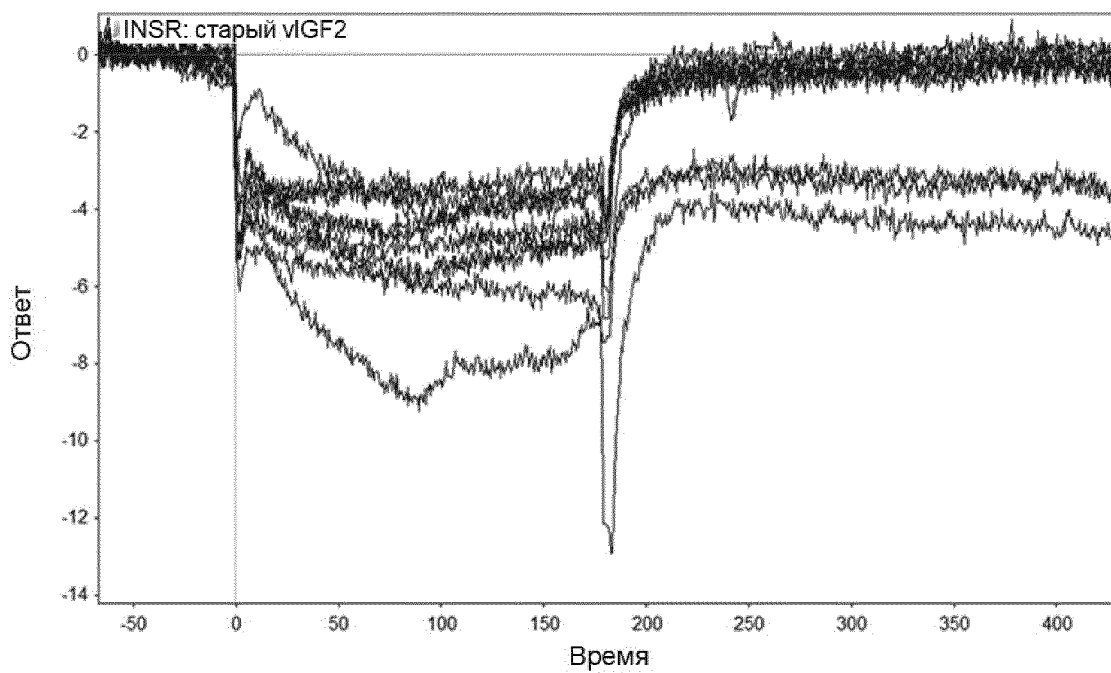
Связывание с рецептором IGF2/CI-MPR



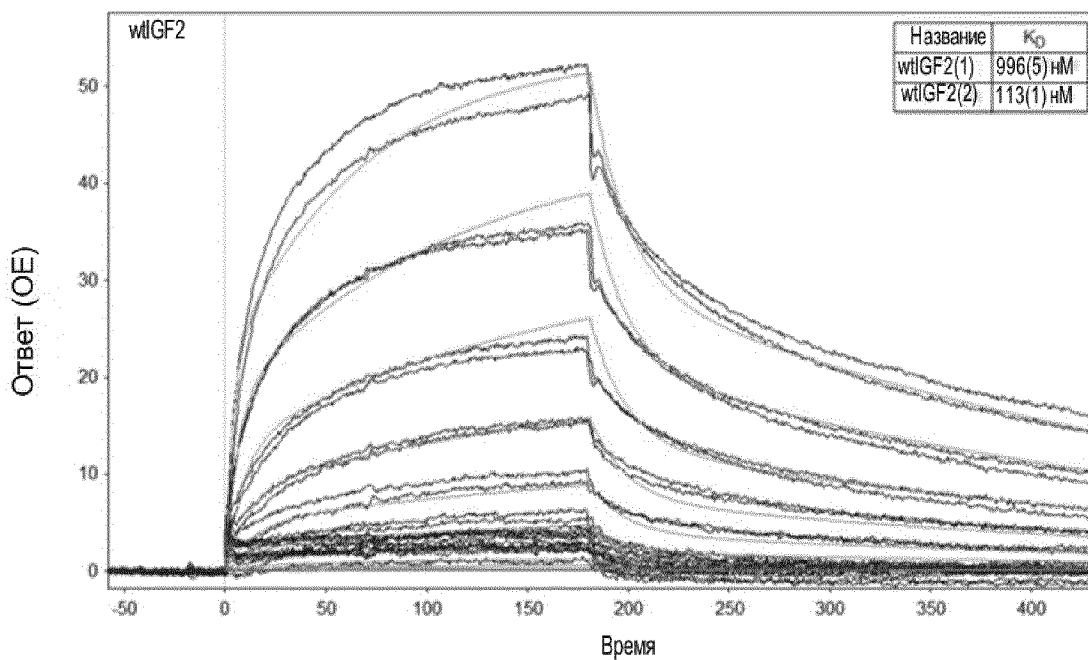
Фиг. 7



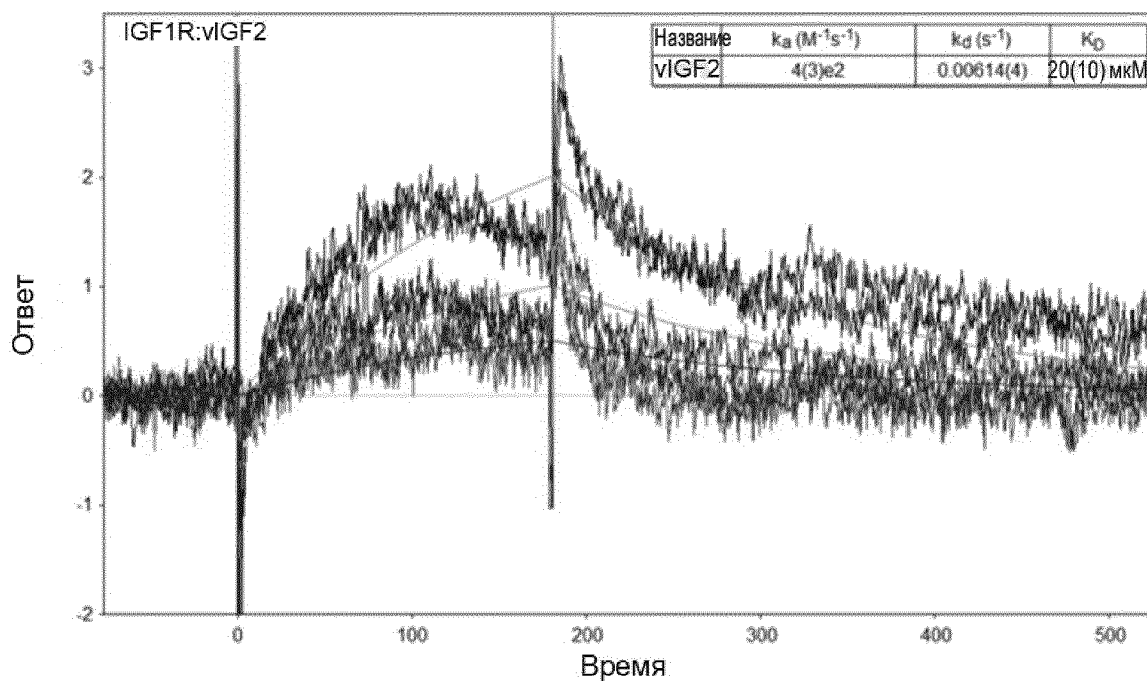
Фиг. 8



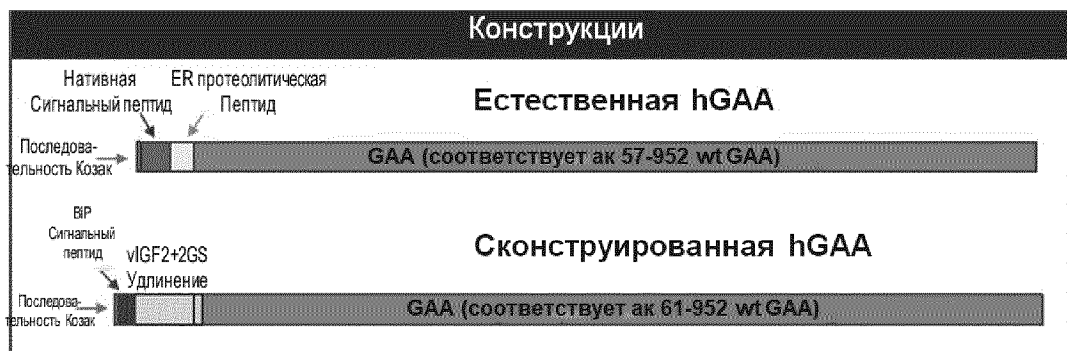
Фиг. 9



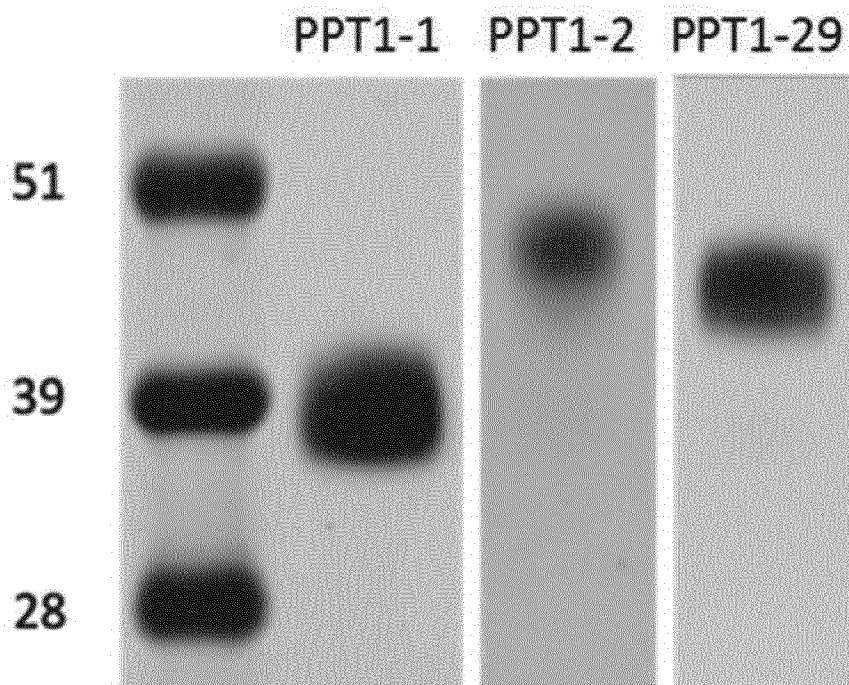
Фиг. 10



Фиг. 11

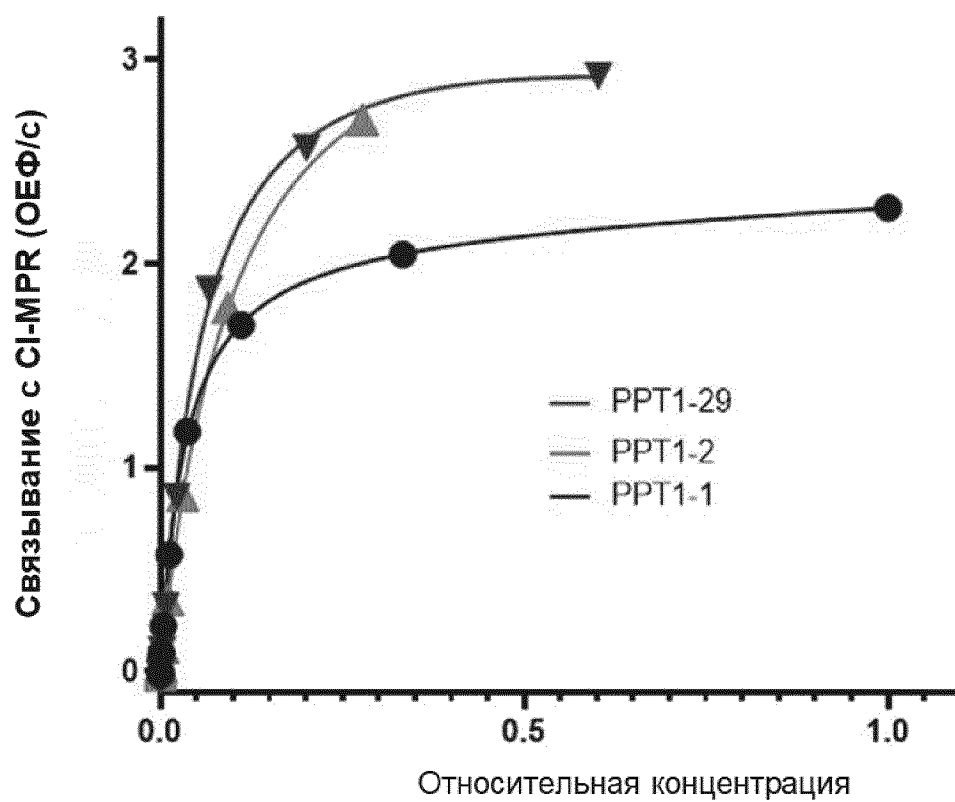


Фиг. 12

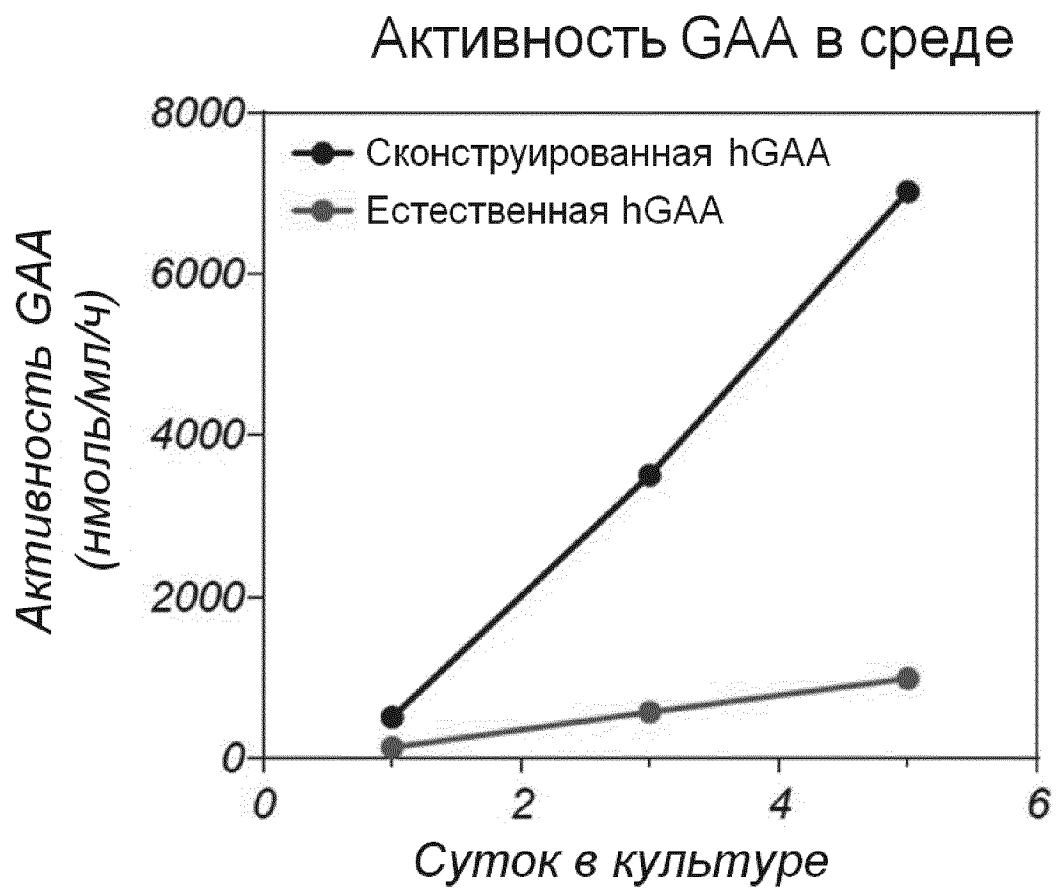


Фиг. 13

Связывание конструкций PPT1 с CI-MPR



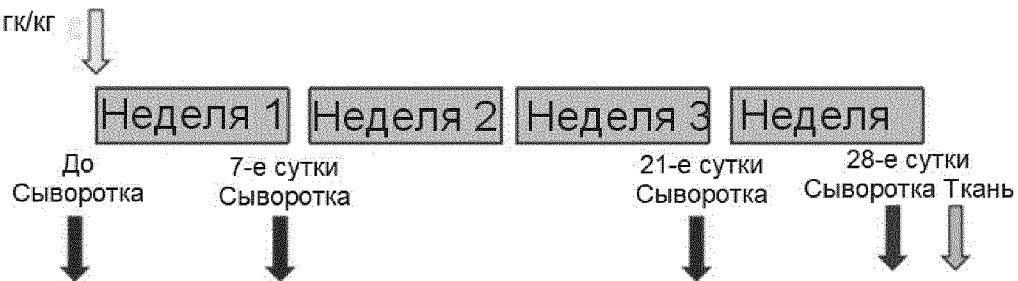
Фиг. 14



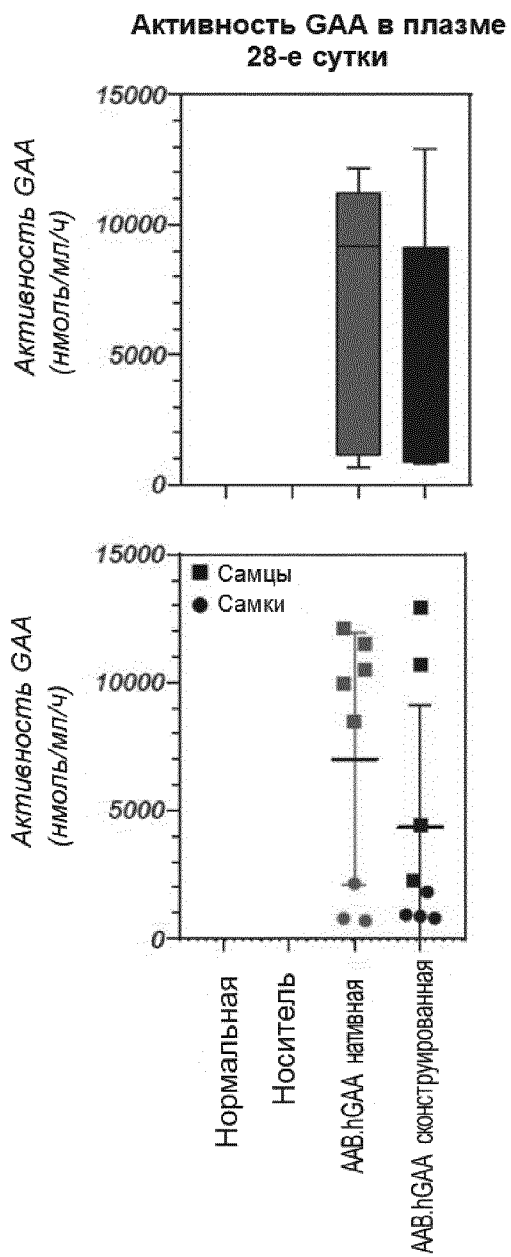
Фиг. 15

Дизайн клинического исследования: 4-недельное исследование на животных

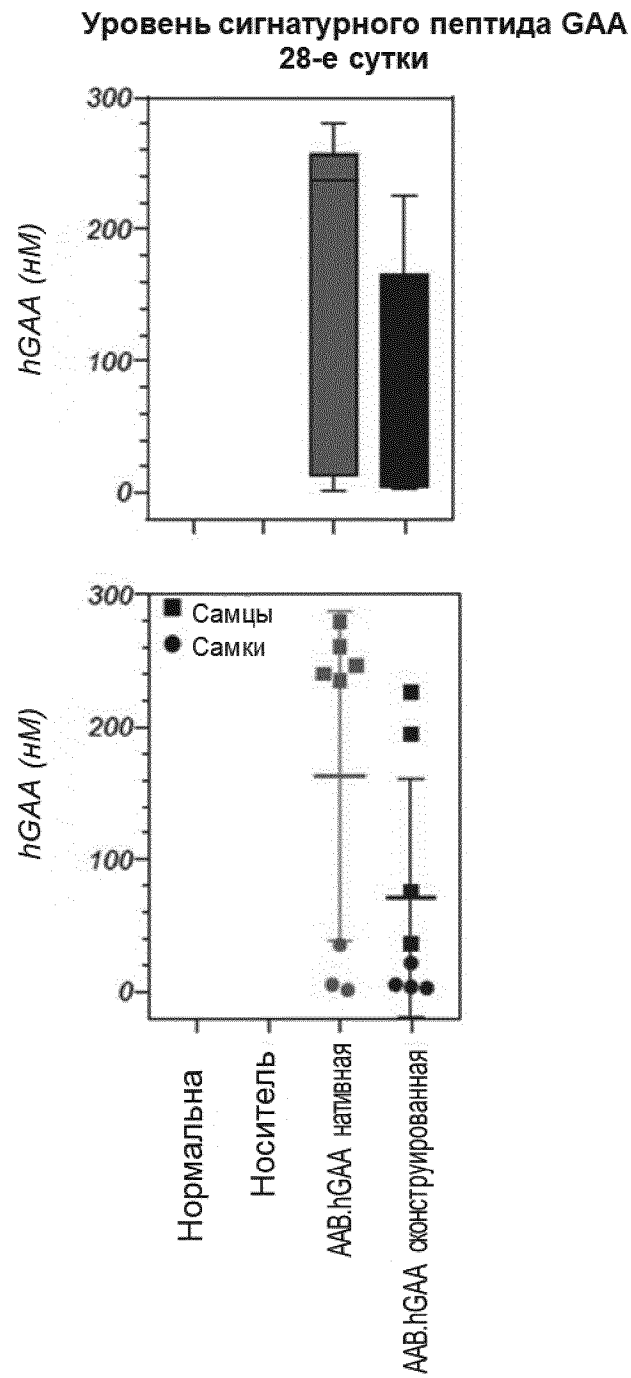
5e11 гк/мышь
~2,5e13 гк/кг



Фиг. 16

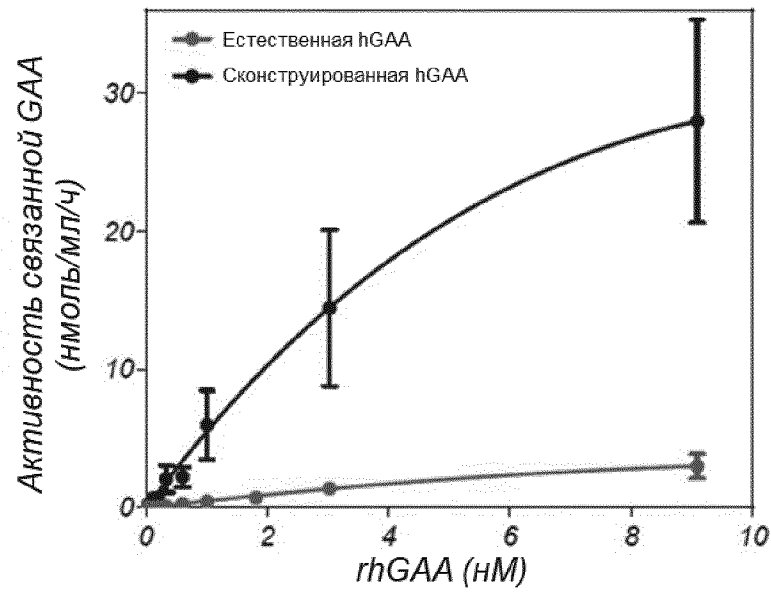


Фиг. 17



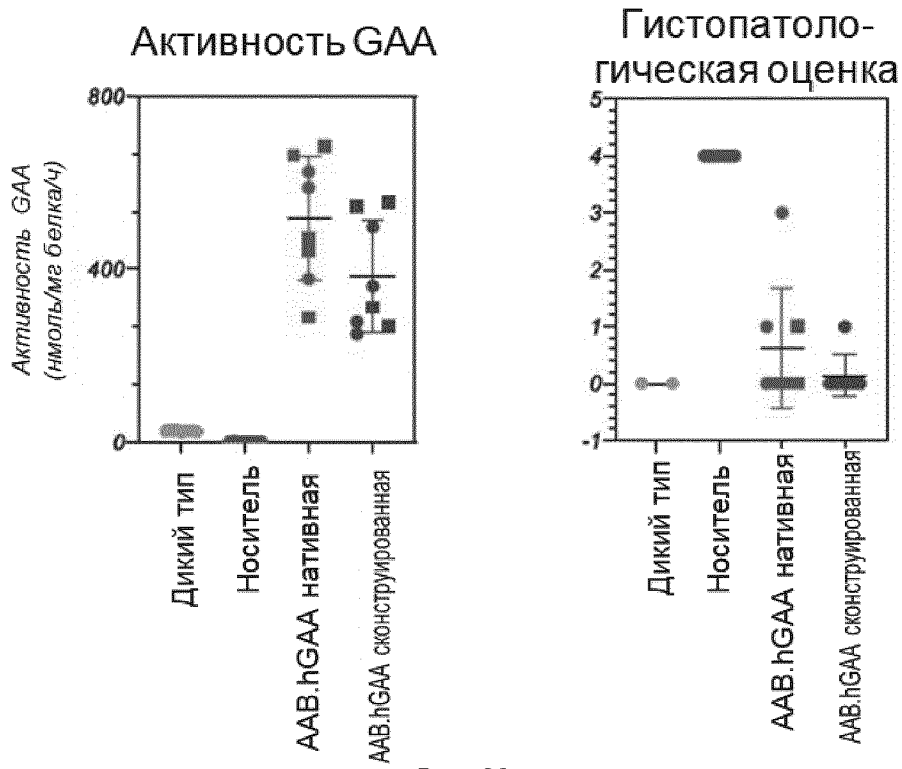
Фиг. 18

Связывание с рецептором клеточной поверхности



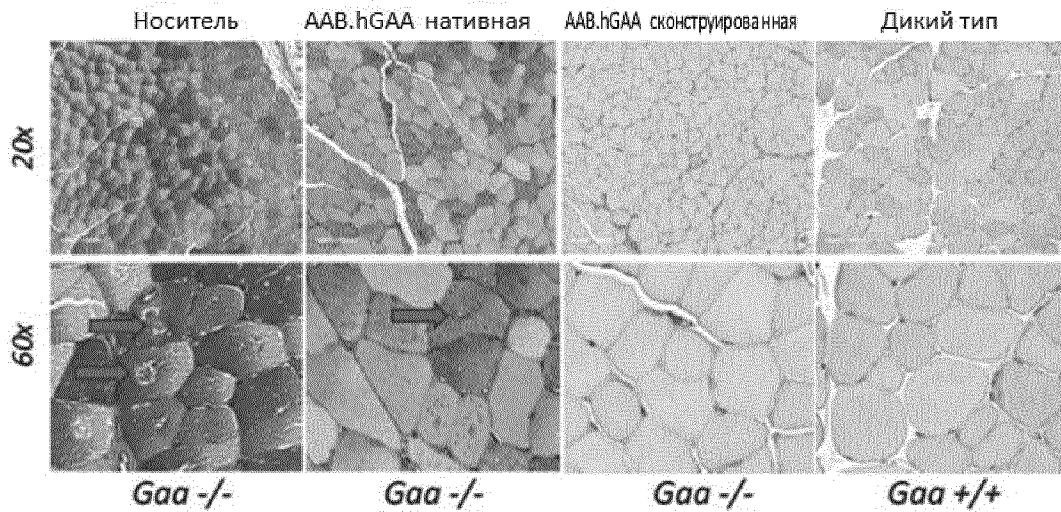
Образцы плазмы, использованные для оценки взаимодействия с рецептором клетки

Фиг. 19



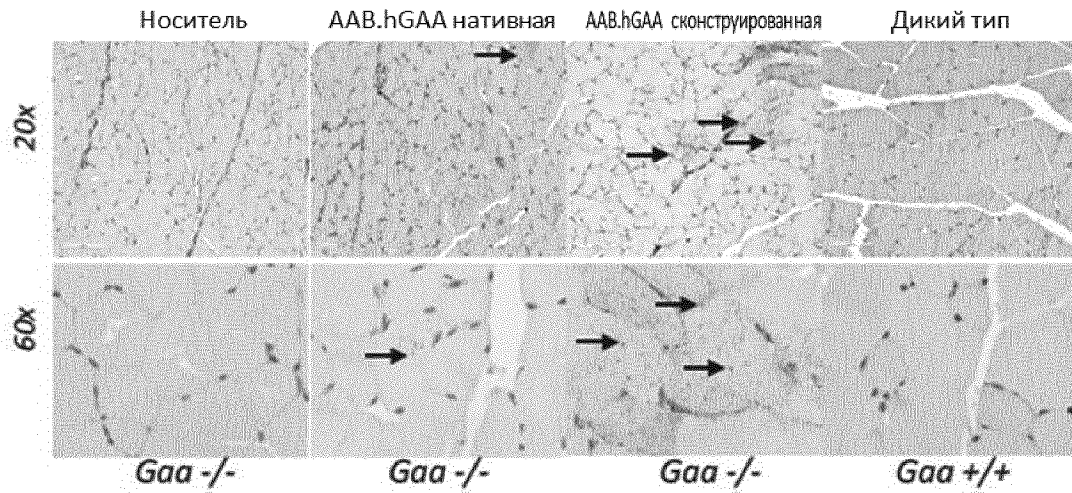
Фиг. 20

ШИК-реакция гликогена - Передняя большеберцовая мышца

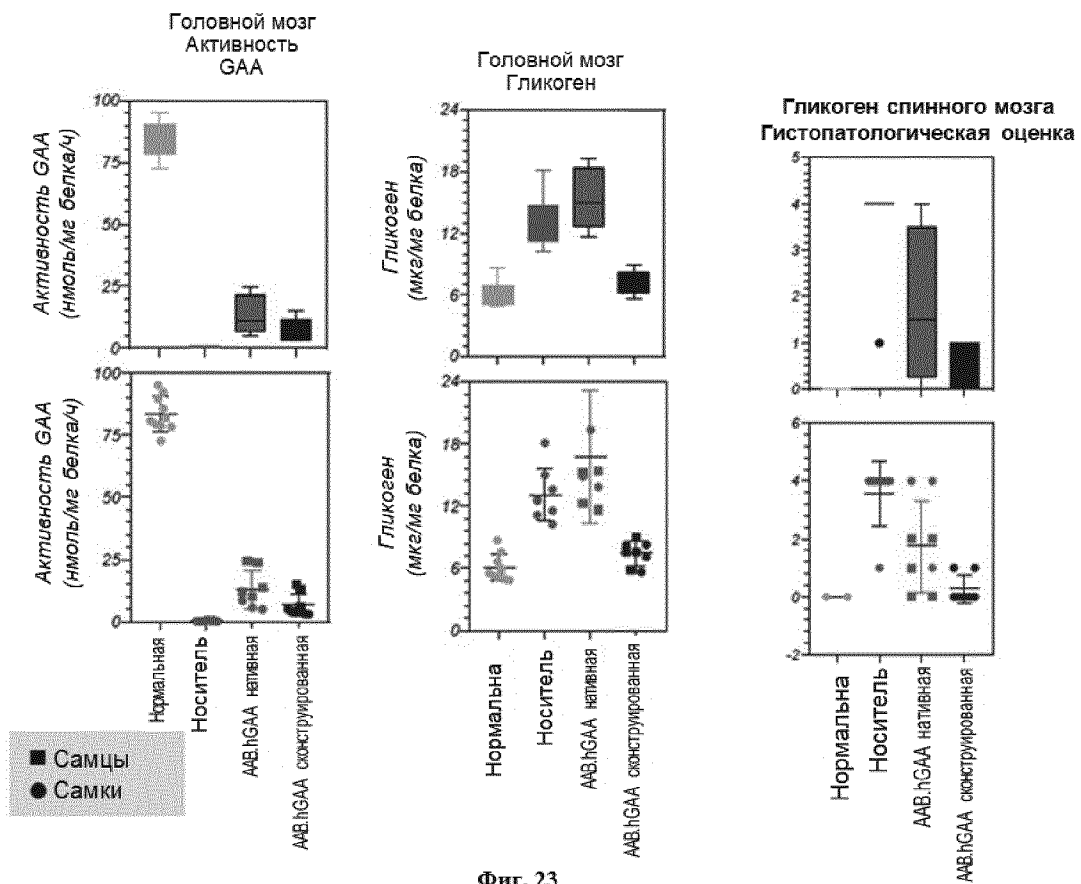


Фиг. 21

hGAA ИГХ - Передняя большеберцовая мышца

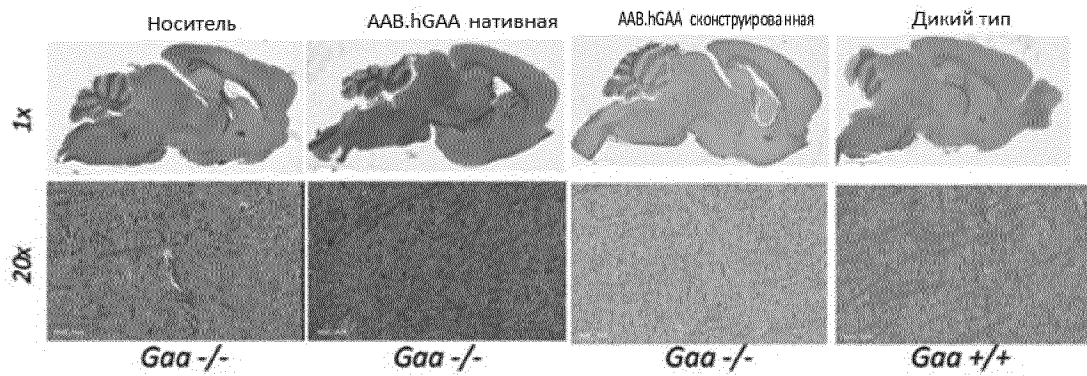


Фиг. 22



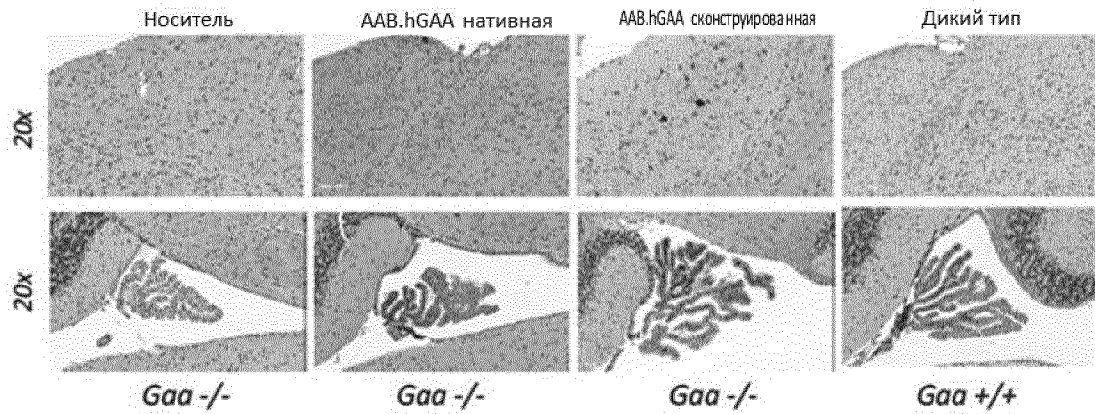
Фиг. 23

Гликоген при окрашивании Licho/ШИК-реакции - Головной мозг



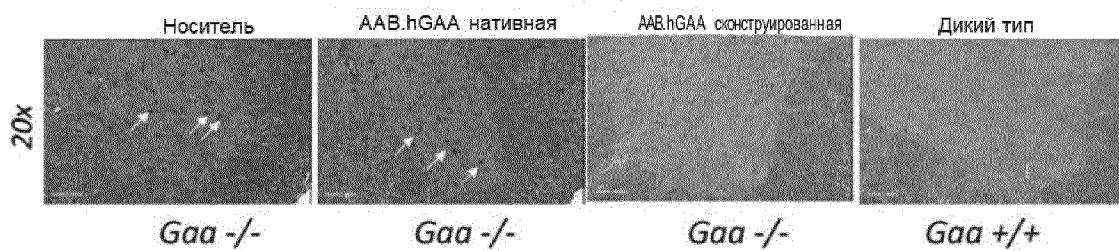
Фиг. 24

hGAA ИГХ - ствол головного мозга и сосудистое сплетение



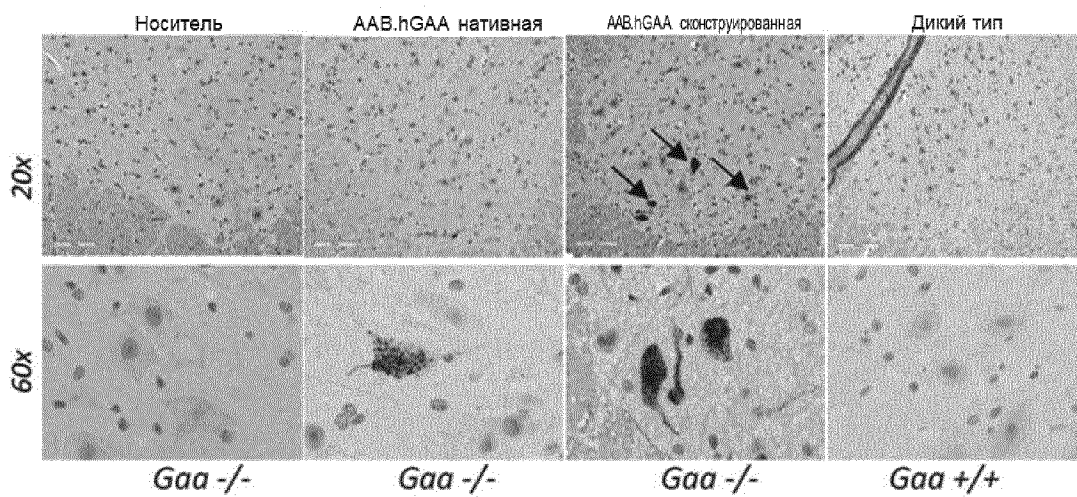
Фиг. 25

Гликоген при окрашивании Luxol/ШИК-реакции - Спинной мозг

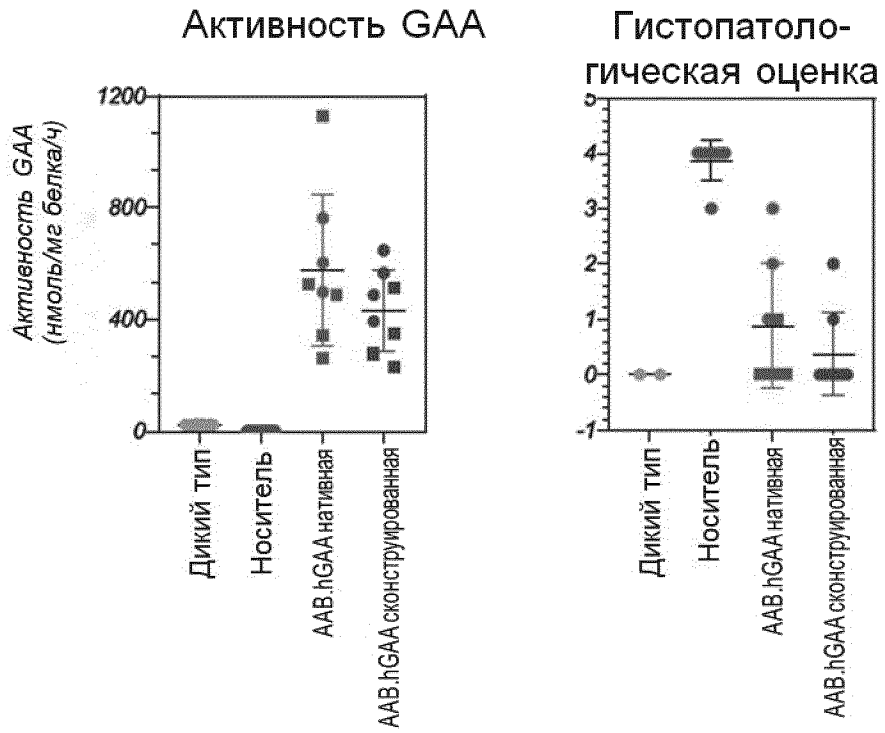


Фиг. 26

hGAA ИГХ-Спинной мозг

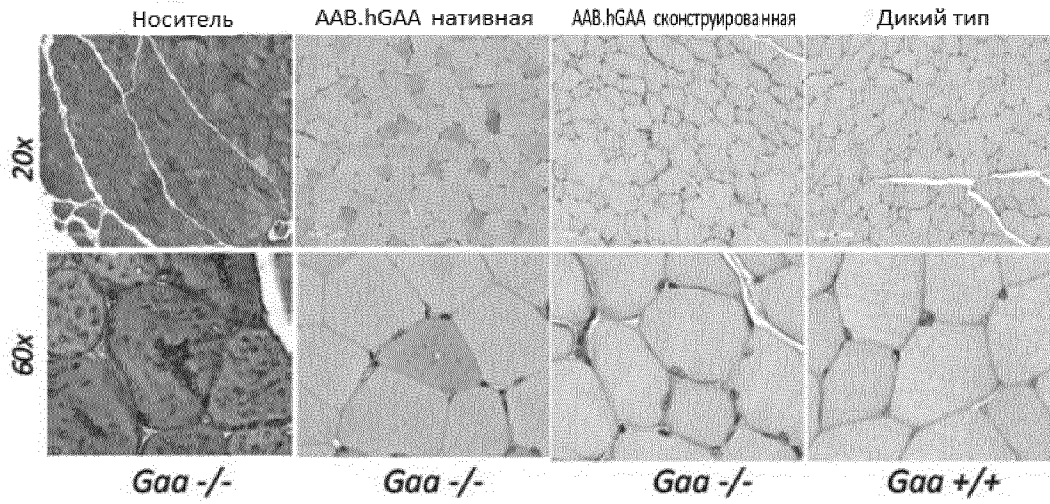


Фиг. 27



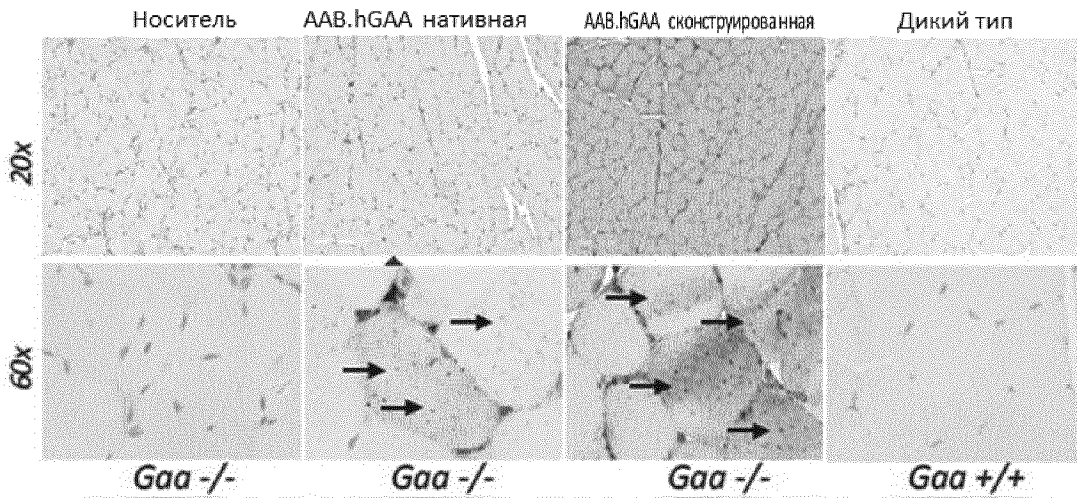
Фиг. 28

ШИК-реакция гликогена - Квадрицепс

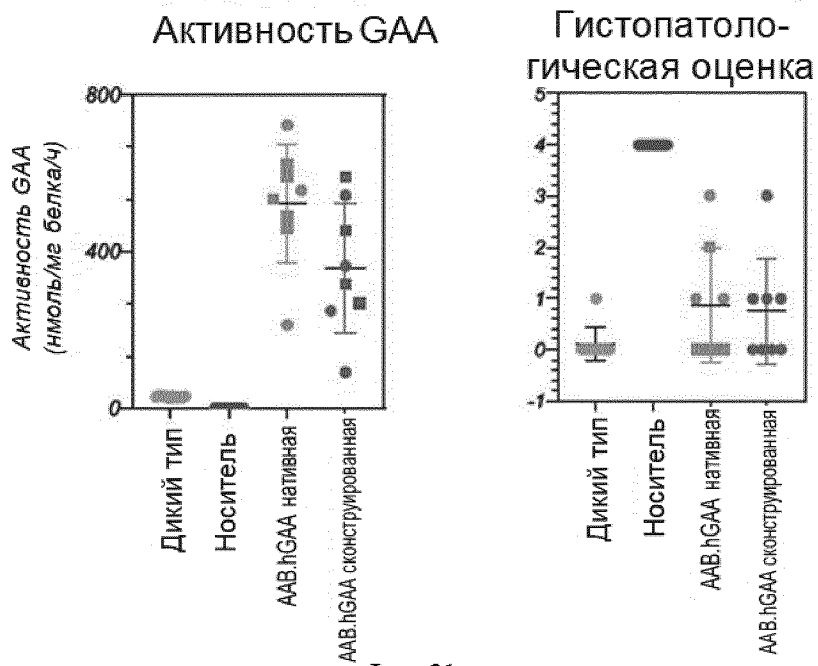


Фиг. 29

hGAA ИГХ - Квадрицепс

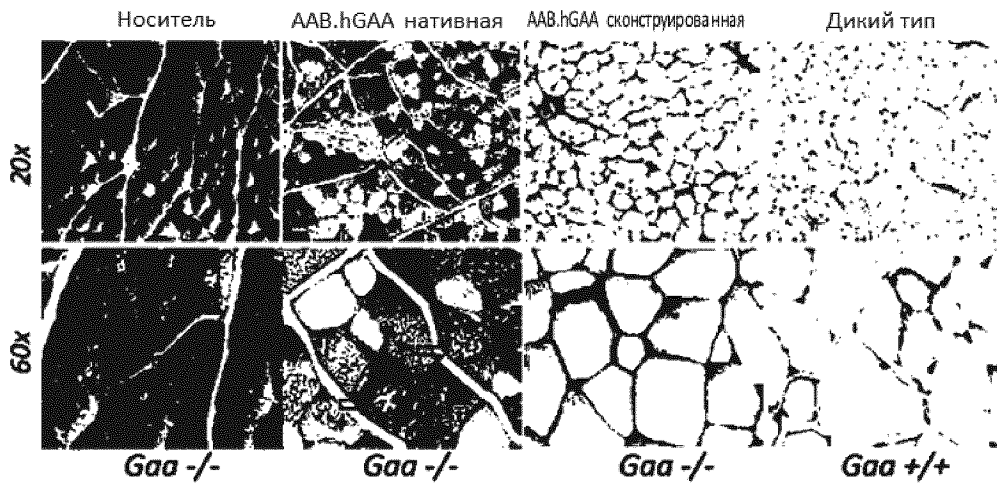


Фиг. 30



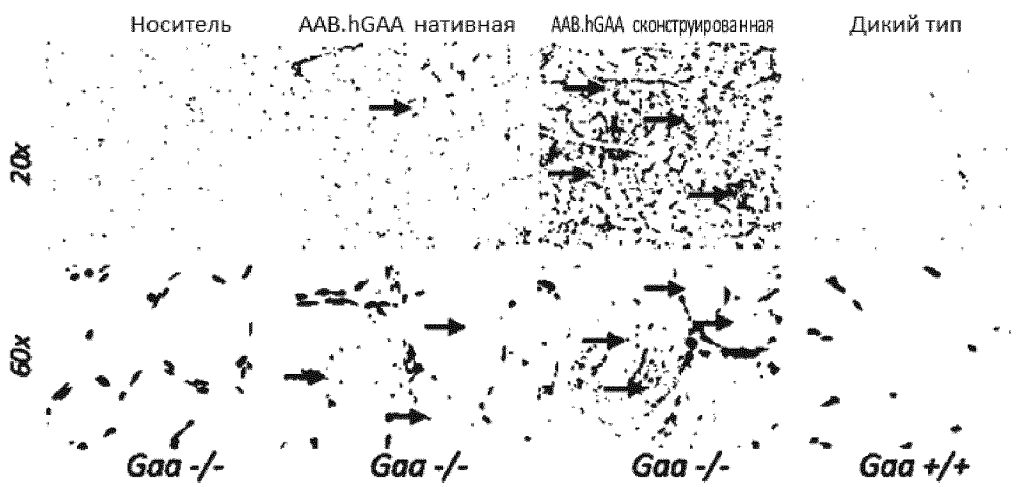
Фиг. 31

ШИК-реакция гликогена - Трицепс



Фиг. 32

hGAA ИГХ - Трицепс



Фиг. 33