(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202190999 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.10.15

(22) Дата подачи заявки
2019.10.10

(51) Int. Cl. ***A61K 38/47*** (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ ПОЛИПЕПТИДОВ, СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ С ПОМОЩЬЮ ДИСУЛЬФИДНОЙ СВЯЗИ, И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

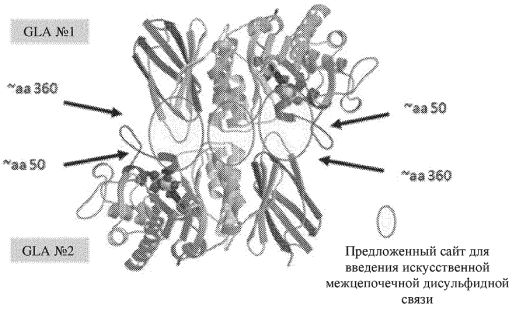
(31) **62/744,069**
(32) **2018.10.10**
(33) **US**
(86) **PCT/US2019/055679**
(87) **WO 2020/077114 2020.04.16**
(88) **2020.07.23**

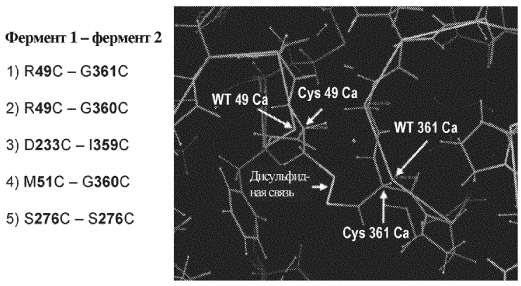
(71) Заявитель:
АМИКУС ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
До Хун, Лиу Се Фен (US)

(74) Представитель:
Рыбина Н.А. (RU)

(57) В данном документе предусмотрены полипептиды, содержащие один или несколько ненативных цистеиновых остатков, которые образуют дисульфидный мостик между ненативными остатками цистеина в белке или между ненативными остатками цистеина двух мономеров белка. Такие модифицированные полипептиды человека являются применимыми в лечении генетических заболеваний посредством заместительной ферментной терапии и/или генной терапии.





202190999 A1

202190999 A1

КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ ПОЛИПЕПТИДОВ, СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ С ПОМОЩЬЮ ДИСУЛЬФИДНОЙ СВЯЗИ, И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/744069, поданной 10 октября 2018 г., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

ПРЕДПОСЫЛКИ К СОЗДАНИЮ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Генетические заболевания можно лечить с помощью заместительной ферментной терапии, в которой применяют рекомбинантные полипептиды, или генной терапии, в которой применяют нуклеиновые кислоты, кодирующие рекомбинантные белки. Например, болезнь Фабри можно лечить с применением рекомбинантной альфа-галактозидазы А или низкомолекулярных шаперонов, таких как 1-дезоксигалактоноджиримицин (мигаластат). Однако рекомбинантные полипептиды дикого типа часто характеризуются недостаточной стабильностью при нейтральном pH и быстро расщепляются в сыворотке крови. Это существенно ограничивает период полужизни фермента, применяемого в терапевтических целях, поскольку его доставляют путем внутривенной инфузии.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

[0003] В определенных аспектах предусмотрены векторы для генной терапии, которые содержат конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую стабилизированную форму белка для лечения генетического нарушения. В некоторых вариантах осуществления стабилизированная форма содержит один или несколько ненативных цистеиновых остатков, которые образуют дисульфидный мостик между ненативными остатками цистеина в белке или между ненативными остатками цистеина двух мономеров белка. В некоторых вариантах осуществления белок выбран из группы, состоящей из альфа-галактозидазы А, β-глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидазы, лизосомной кислой липазы, гликозаминогликан-альфа-L-идуронидазы, альфа-L-идуронидазы, N-сульфоглюкозаминсульфогидролазы (SGSH), N-ацетил-альфа-глюкозаминидазы (NAGLU), идуронат-2-сульфатазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, гликозаминогликан-N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы, альфа-глюкозидазы, трипептидилпептидазы 1 (TPP1), пальмитоилпротеинтиоэстераз (PPT), белков, ассоциированных с развитием восковидного

липофусциноза нейронов 1, восковидного липофусциноза нейронов 2, восковидного липофусциноза нейронов 3, восковидного липофусциноза нейронов 4, восковидного липофусциноза нейронов 5, восковидного липофусциноза нейронов 6, восковидного липофусциноза нейронов 7, восковидного липофусциноза нейронов 8, восковидного липофусциноза нейронов 9, восковидного липофусциноза нейронов 10, восковидного липофусциноза нейронов 11, восковидного липофусциноза нейронов 12, восковидного липофусциноза нейронов 13, восковидного липофусциноза нейронов 14, восковидного липофусциноза нейронов 15, восковидного липофусциноза нейронов 16, и циклинзависимого киназоподобного белка 5. В некоторых вариантах осуществления белок выбран из группы, состоящей из альфа-галактозидазы A, β-глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидазы, лизосомной кислой липазы, гликозаминогликан-альфа-L-идуронидазы, альфа-L-идуронидазы, N-сульфоглюкозаминсульфогидролазы (SGSH), N-ацетил-альфа-глюкозаминидазы (NAGLU), идуронат-2-сульфатазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, гликозаминогликан-N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы, альфа-глюкозидазы, трипептидилпептидазы 1 (TPP1), пальмитоилпротеинтиоэстераз (PPT), белков, ассоциированных с развитием восковидного липофусциноза нейронов 4, восковидного липофусциноза нейронов 10 (катепсин D), восковидного липофусциноза нейронов 11 (програнулин), восковидного липофусциноза нейронов 13 (катепсин F), восковидного липофусциноза нейронов 14 (KCTD7), восковидного липофусциноза нейронов 15 (TBCK), и циклинзависимого киназоподобного белка 5. В некоторых вариантах осуществления стабилизированный белок предусматривает лизосомный фермент. В некоторых вариантах осуществления стабилизированный белок предусматривает стабилизированный белок α-галактозидазу (α-GAL). В некоторых вариантах осуществления стабилизированный белок α-галактозидаза A (α-GAL) содержит один или несколько ненативных цистеиновых остатков, выбранных из группы, состоящей из (i) D233C и I359C и (ii) M51C и G360C. В некоторых вариантах осуществления стабилизированный белок предусматривает стабилизированную пальмитоилпротеинтиоэстеразу 1 (PPT1). В некоторых вариантах осуществления стабилизированный белок PPT1 содержит ненативные цистеиновые остатки A171C и A183C. В некоторых вариантах осуществления стабилизированный белок характеризуется более длительным периодом полужизни при pH 7,4 по сравнению с соответствующим белком без ненативных остатков цистеина. В некоторых вариантах осуществления стабилизированный белок может заменять белок, являющийся дефектным или дефицитным при генетическом нарушении. В некоторых вариантах осуществления

стабилизированный белок может обеспечивать уменьшение выраженности или замедление развития одного или нескольких симптомов, ассоциированных с генетическим нарушением. В некоторых вариантах осуществления стабилизированный белок является более эффективным в отношении уменьшения выраженности или замедления развития одного или нескольких симптомов генетического нарушения по сравнению с нестабилизированным белком. В некоторых вариантах осуществления генетическое нарушение представляет собой неврологическое расстройство. В некоторых вариантах осуществления генетическое нарушение представляет собой лизосомное нарушение накопления. В некоторых вариантах осуществления генетическое нарушение выбрано из группы, состоящей из аспартилглюкозаминурии, болезни Баттена, цистиноза, болезни Фабри, болезни Гоше типа I, болезни Гоше типа II, болезни Гоше типа III, болезни Помпе, болезни Тея-Сакса, болезни Сандхоффа, метахроматической лейкодистрофии, муколипидоза типа I, муколипидоза типа II, муколипидоза типа III, 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, тяжелого комбинированного иммунодефицита аденозиндезаминазы (ADA-SCID), хронической гранулематозной болезни (CGD), инфантильной, ювенильной и зрелой форм восковидного липофусциноза нейронов и болезни, связанной с дефицитом CDKL5. В некоторых вариантах осуществления вектор для генной терапии представляет собой вирусный вектор, выбранный из группы, состоящей из вектора на основе аденовируса, вектора на основе аденоассоциированного вируса, вектора на основе ретровируса, вектора на основе лентивируса и вектора на основе вируса герпеса. В некоторых вариантах осуществления аденоассоциированный вирус представляет собой серотип, выбранный из группы, состоящей из AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13, AAV rh.74, AAV-B1 и AAV-hu68. В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты включена в геном вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления геном вирусного вектора предусматривает геном рекомбинантного AAV (rAAV). В некоторых вариантах осуществления геном rAAV предусматривает самокомплементарный геном. В некоторых вариантах осуществления геном rAAV предусматривает одноцепочечный геном. В некоторых вариантах осуществления геном rAAV содержит первый инвертированный

концевой повтор и второй инвертированный концевой повтор. В некоторых вариантах осуществления инвертированные концевые повторы AAV представляют собой инвертированные концевые повторы AAV2. В некоторых вариантах осуществления геном rAAV дополнительно содержит интрон SV40. В некоторых вариантах осуществления геном rAAV дополнительно содержит последовательность полиаденилирования. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок α-GAL, где последовательность нуклеиновой кислоты является на по меньшей мере 85% идентичной одной из последовательностей под SEQ ID NO: 7-12. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок α-GAL, где белок α-GAL предусматривает последовательность, являющуюся на по меньшей мере 85% идентичной одной из последовательностей под SEQ ID NO: 1-6. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок α-GAL, где последовательность нуклеиновой кислоты предусматривает последовательность под одним из SEQ ID NO: 8-12. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок α-GAL, где белок α-GAL предусматривает последовательность под одним из SEQ ID NO: 2-6. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок PPT1, где последовательность нуклеиновой кислоты является на по меньшей мере 85% идентичной одной из последовательностей под SEQ ID NO: 15-16. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок PPT1, где белок PPT1 предусматривает последовательность, являющуюся на по меньшей мере 85% идентичной одной из последовательностей под SEQ ID NO: 13-14. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок PPT1, где последовательность нуклеиновой кислоты предусматривает последовательность под SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок PPT1, где белок PPT1 предусматривает последовательность под SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит промоторную последовательность. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой конститутивный промотор. В некоторых вариантах

осуществления промотор представляет собой тканеспецифический промотор. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты, выбранных из группы, состоящей из последовательности Козак, IRES CrPV, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей линкер, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей сигнальную последовательность, и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид IGF2. В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность пептида предусматривает сигнальную последовательность белка, связывающего иммуноглобулины (Bip). В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность пептида предусматривает сигнальную последовательность Bip, предусматривающую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29-33. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность внутренней посадки рибосомы (IRES). В некоторых вариантах осуществления IRES предусматривает IRES вируса паралича сверчка (CrPV). В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант пептида IGF2 (vIGF2). В некоторых вариантах осуществления пептид vIGF2 предусматривает аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17-27. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая пептид vIGF2, расположена в направлении 5'-конца относительно последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей стабилизированную форму белка. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая пептид vIGF2, расположена в направлении 3'-конца относительно последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей стабилизированную форму белка. В некоторых вариантах осуществления конструкция упакована в вирусный капсид.

[0004] В дополнительных аспектах предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие вектор для генной терапии, содержащий конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую стабилизированную форму белка для лечения генетического нарушения, и фармацевтически приемлемые вспомогательное вещество, носитель или разбавитель. В некоторых вариантах осуществления стабилизированная форма содержит один или несколько ненативных цистеиновых остатков, которые образуют дисульфидный мостик между ненативными остатками

цистеина в белке или между ненативными остатками цистеина двух мономеров белка. В некоторых вариантах осуществления белок выбран из группы, состоящей из альфа-галактозидазы А, β-глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидазы, лизосомной кислой липазы, гликозаминогликан-альфа-L-идуронидазы, альфа-L-идуронидазы, N-сульфоглюкозаминсульфогидролазы (SGSH), N-ацетил-альфа-глюкозаминидазы (NAGLU), идуронат-2-сульфатазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, гликозаминогликан-N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы, альфа-глюкозидазы, трипептидилпептидазы 1 (TPP1), пальмитоилпротеинтиоэстераз (PPT), белков, ассоциированных с развитием восковидного липофусциноза нейронов 1, восковидного липофусциноза нейронов 2, восковидного липофусциноза нейронов 3, восковидного липофусциноза нейронов 4, восковидного липофусциноза нейронов 5, восковидного липофусциноза нейронов 6, восковидного липофусциноза нейронов 7, восковидного липофусциноза нейронов 8, восковидного липофусциноза нейронов 9, восковидного липофусциноза нейронов 10, восковидного липофусциноза нейронов 11, восковидного липофусциноза нейронов 12, восковидного липофусциноза нейронов 13, восковидного липофусциноза нейронов 14, восковидного липофусциноза нейронов 15, восковидного липофусциноза нейронов 16, и циклинзависимого киназоподобного белка 5. В некоторых вариантах осуществления белок выбран из группы, состоящей из альфа-галактозидазы А, β-глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидазы, лизосомной кислой липазы, гликозаминогликан-альфа-L-идуронидазы, альфа-L-идуронидазы, N-сульфоглюкозаминсульфогидролазы (SGSH), N-ацетил-альфа-глюкозаминидазы (NAGLU), идуронат-2-сульфатазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, гликозаминогликан-N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы, альфа-глюкозидазы, трипептидилпептидазы 1 (TPP1), пальмитоилпротеинтиоэстераз (PPT), белков, ассоциированных с развитием восковидного липофусциноза нейронов 4, восковидного липофусциноза нейронов 10 (катепсин D), восковидного липофусциноза нейронов 11 (програнулин), восковидного липофусциноза нейронов 13 (катепсин F), восковидного липофусциноза нейронов 14 (KCTD7), восковидного липофусциноза нейронов 15 (TBCK), и циклинзависимого киназоподобного белка 5. В некоторых вариантах осуществления стабилизированный белок предусматривает лизосомный фермент. В некоторых вариантах осуществления стабилизированный белок предусматривает стабилизированный белок α-галактозидазу (α-GAL). В некоторых вариантах осуществления стабилизированный белок α-галактозидаза А (α-GAL) содержит один или несколько ненативных цистеиновых остатков, выбранных из группы, состоящей из (i) D233C и I359C и (ii) M51C и G360C. В

некоторых вариантах осуществления стабилизированный белок предусматривает стабилизированную пальмитоилпротеинтиоэстеразу 1 (PPT1). В некоторых вариантах осуществления стабилизированный белок PPT1 содержит ненативные цистеиновые остатки A171C и A183C. В некоторых вариантах осуществления стабилизированный белок характеризуется более длительным периодом полужизни при pH 7,4 по сравнению с соответствующим белком без ненативных остатков цистеина. В некоторых вариантах осуществления стабилизированный белок может заменять белок, являющийся дефектным или дефицитным при генетическом нарушении. В некоторых вариантах осуществления стабилизированный белок может обеспечивать уменьшение выраженности или замедление развития одного или нескольких симптомов, ассоциированных с генетическим нарушением. В некоторых вариантах осуществления стабилизированный белок является более эффективным в отношении уменьшения выраженности или замедления развития одного или нескольких симптомов генетического нарушения по сравнению с нестабилизированным белком. В некоторых вариантах осуществления генетическое нарушение представляет собой неврологическое расстройство. В некоторых вариантах осуществления генетическое нарушение представляет собой лизосомное нарушение накопления. В некоторых вариантах осуществления генетическое нарушение выбрано из группы, состоящей из аспартилглюкозаминурии, болезни Баттена, цистиноза, болезни Фабри, болезни Гоше типа I, болезни Гоше типа II, болезни Гоше типа III, болезни Помпе, болезни Тея-Сакса, болезни Сандхоффа, метахроматической лейкодистрофии, муколипидоза типа I, муколипидоза типа II, муколипидоза типа III, 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, тяжелого комбинированного иммунодефицита аденозиндезаминазы (ADA-SCID), хронической гранулематозной болезни (CGD), инфантильной, ювенильной и зрелой форм восковидного липофусциноза нейронов и болезни, связанной с дефицитом CDKL5. В некоторых вариантах осуществления вектор для генной терапии представляет собой вирусный вектор, выбранный из группы, состоящей из вектора на основе аденовируса, вектора на основе аденоассоциированного вируса, вектора на основе ретровируса, вектора на основе лентивируса и вектора на основе вируса герпеса. В некоторых вариантах осуществления аденоассоциированный вирус представляет собой серотип, выбранный из

группы, состоящей из AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13, AAV rh.74, AAV-B1 и AAV-hu68. В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты включена в геном вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления геном вирусного вектора предусматривает геном рекомбинантного AAV (rAAV). В некоторых вариантах осуществления геном rAAV предусматривает самокомплементарный геном. В некоторых вариантах осуществления геном rAAV предусматривает одноцепочечный геном. В некоторых вариантах осуществления геном rAAV содержит первый инвертированный концевой повтор и второй инвертированный концевой повтор. В некоторых вариантах осуществления инвертированные концевые повторы AAV представляют собой инвертированные концевые повторы AAV2. В некоторых вариантах осуществления геном rAAV дополнительно содержит интрон SV40. В некоторых вариантах осуществления геном rAAV дополнительно содержит последовательность полиаденилирования. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок α-GAL, где последовательность нуклеиновой кислоты является на по меньшей мере 85% идентичной одной из последовательностей под SEQ ID NO: 7-12. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок α-GAL, где белок α-GAL предусматривает последовательность, являющуюся на по меньшей мере 85% идентичной одной из последовательностей под SEQ ID NO: 1-6. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок α-GAL, где последовательность нуклеиновой кислоты предусматривает последовательность под одним из SEQ ID NO: 8-12. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок α-GAL, где белок α-GAL предусматривает последовательность под одним из SEQ ID NO: 2-6. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок PPT1, где последовательность нуклеиновой кислоты является на по меньшей мере 85% идентичной одной из последовательностей под SEQ ID NO: 15-16. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок PPT1, где белок PPT1 предусматривает последовательность, являющуюся на по меньшей мере 85% идентичной одной из последовательностей под SEQ ID NO: 13-14. В некоторых вариантах

осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок PPT1, где последовательность нуклеиновой кислоты предусматривает последовательность под SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок PPT1, где белок PPT1 предусматривает последовательность под SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит промоторную последовательность. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой конститутивный промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой тканеспецифический промотор. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты, выбранных из группы, состоящей из последовательности Козак, IRES CrPV, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей линкер, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей сигнальную последовательность, и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид IGF2. В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность пептида предусматривает сигнальную последовательность белка, связывающего иммуноглобулины (Bip). В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность пептида предусматривает сигнальную последовательность Bip, предусматривающую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29-33. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность внутренней посадки рибосомы (IRES). В некоторых вариантах осуществления IRES предусматривает IRES вируса паралича сверчка (CrPV). В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант пептида IGF2 (vIGF2). В некоторых вариантах осуществления пептид vIGF2 предусматривает аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17-27. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая пептид vIGF2, расположена в направлении 5'-конца относительно последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей стабилизированную форму белка. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая пептид vIGF2, расположена в направлении 3'-конца относительно последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей стабилизированную форму белка. В некоторых

вариантах осуществления конструкция упакована в вирусный капсид. В некоторых вариантах осуществления вспомогательное вещество выбрано из группы, состоящей из солевого раствора, малеиновой кислоты, винной кислоты, молочной кислоты, лимонной кислоты, уксусной кислоты, бикарбоната натрия, фосфата натрия, гистидина, глицина, хлорида натрия, хлорида калия, хлорида кальция, хлорида цинка, воды, декстрозы, N-метилпирролидона, диметилсульфоксида, N,N-диметилацетамида, этанола, пропиленгликоля, полиэтиленгликоля, моноэтилового эфира диэтиленгликоля и поверхностно-активного вещества, представляющего собой моноолеат полиоксиэтиленсорбитана.

[0005] В дополнительных аспектах предусмотрены способы лечения генетического нарушения у субъекта, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества вектора для генной терапии, содержащего конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую стабилизированную форму белка для лечения генетического нарушения, или фармацевтических композиций на его основе. В некоторых вариантах осуществления стабилизированная форма содержит один или несколько ненативных цистеиновых остатков, которые образуют дисульфидный мостик между ненативными остатками цистеина в белке или между ненативными остатками цистеина двух мономеров белка. В некоторых вариантах осуществления белок выбран из группы, состоящей из альфа-галактозидазы A, β-глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидазы, лизосомной кислой липазы, гликозаминогликан-альфа-L-идуронидазы, альфа-L-идуронидазы, N-сульфоглюкозаминсульфогидролазы (SGSH), N-ацетил-альфа-глюкозаминидазы (NAGLU), идуронат-2-сульфатазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, гликозаминогликан-N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы, альфа-глюкозидазы, трипептидилпептидазы 1 (TPP1), пальмитоилпротеинтиоэстераз (PPT), белков, ассоциированных с развитием восковидного липофусциноза нейронов 1, восковидного липофусциноза нейронов 2, восковидного липофусциноза нейронов 3, восковидного липофусциноза нейронов 4, восковидного липофусциноза нейронов 5, восковидного липофусциноза нейронов 6, восковидного липофусциноза нейронов 7, восковидного липофусциноза нейронов 8, восковидного липофусциноза нейронов 9, восковидного липофусциноза нейронов 10, восковидного липофусциноза нейронов 11, восковидного липофусциноза нейронов 12, восковидного липофусциноза нейронов 13, восковидного липофусциноза нейронов 14, восковидного липофусциноза нейронов 15, восковидного липофусциноза нейронов 16, и циклинзависимого киназоподобного белка 5. В некоторых вариантах осуществления белок

выбран из группы, состоящей из альфа-галактозидазы A, β-глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидазы, лизосомной кислой липазы, гликозаминогликан-альфа-L-идуронидазы, альфа-L-идуронидазы, N-сульфоглюкозаминсульфогидролазы (SGSH), N-ацетил-альфа-глюкозаминидазы (NAGLU), идуронат-2-сульфатазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, гликозаминогликан-N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы, альфа-глюкозидазы, трипептидилпептидазы 1 (TPP1), пальмитоилпротеинтиоэстераз (PPT), белков, ассоциированных с развитием восковидного липофусциноза нейронов 4, восковидного липофусциноза нейронов 10 (катепсин D), восковидного липофусциноза нейронов 11 (програнулин), восковидного липофусциноза нейронов 13 (катепсин F), восковидного липофусциноза нейронов 14 (KCTD7), восковидного липофусциноза нейронов 15 (TBCK), и циклинзависимого киназоподобного белка 5. В некоторых вариантах осуществления стабилизированный белок предусматривает лизосомный фермент. В некоторых вариантах осуществления стабилизированный белок предусматривает стабилизированный белок α-галактозидазу (α-GAL). В некоторых вариантах осуществления стабилизированный белок α-галактозидаза A (α-GAL) содержит один или несколько ненативных цистеиновых остатков D233C и I359C. В некоторых вариантах осуществления стабилизированный белок предусматривает стабилизированную пальмитоилпротеинтиоэстеразу 1 (PPT1). В некоторых вариантах осуществления стабилизированный белок PPT1 содержит ненативные цистеиновые остатки A171C и A183C. В некоторых вариантах осуществления стабилизированный белок характеризуется более длительным периодом полужизни при pH 7,4 по сравнению с соответствующим белком без ненативных остатков цистеина. В некоторых вариантах осуществления стабилизированный белок может заменять белок, являющийся дефектным или дефицитным при генетическом нарушении. В некоторых вариантах осуществления стабилизированный белок может обеспечивать уменьшение выраженности или замедление развития одного или нескольких симптомов, ассоциированных с генетическим нарушением. В некоторых вариантах осуществления стабилизированный белок является более эффективным в отношении уменьшения выраженности или замедления развития одного или нескольких симптомов генетического нарушения по сравнению с нестабилизированным белком. В некоторых вариантах осуществления генетическое нарушение представляет собой неврологическое расстройство. В некоторых вариантах осуществления генетическое нарушение представляет собой лизосомное нарушение накопления. В некоторых вариантах осуществления генетическое нарушение выбрано из группы, состоящей из аспартилглюкозаминурии, болезни Баттена, цистиноза, болезни

Фабри, болезни Гоше типа I, болезни Гоше типа II, болезни Гоше типа III, болезни Помпе, болезни Тея-Сакса, болезни Сандхоффа, метахроматической лейкодистрофии, муколипидоза типа I, муколипидоза типа II, муколипидоза типа III, 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, тяжелого комбинированного иммунодефицита аденозиндезаминазы (ADA-SCID), хронической гранулематозной болезни (CGD), инфантильной, ювенильной и зрелой форм восковидного липофусциноза нейронов и болезни, связанной с дефицитом CDKL5. В некоторых вариантах осуществления вектор для генной терапии представляет собой вирусный вектор, выбранный из группы, состоящей из вектора на основе аденовируса, вектора на основе аденоассоциированного вируса, вектора на основе ретровируса, вектора на основе лентивируса и вектора на основе вируса герпеса. В некоторых вариантах осуществления аденоассоциированный вирус представляет собой серотип, выбранный из группы, состоящей из AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13, AAV rh.74, AAV-B1 и AAV-hu68. В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты включена в геном вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления геном вирусного вектора предусматривает геном рекомбинантного AAV (rAAV). В некоторых вариантах осуществления геном rAAV предусматривает самокомплементарный геном. В некоторых вариантах осуществления геном rAAV предусматривает одноцепочечный геном. В некоторых вариантах осуществления геном rAAV содержит первый инвертированный концевой повтор и второй инвертированный концевой повтор. В некоторых вариантах осуществления инвертированные концевые повторы AAV представляют собой инвертированные концевые повторы AAV2. В некоторых вариантах осуществления геном rAAV дополнительно содержит интрон SV40. В некоторых вариантах осуществления геном rAAV дополнительно содержит последовательность полиаденилирования. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок α-GAL, где последовательность нуклеиновой кислоты является на по меньшей мере 85% идентичной одной из последовательностей под SEQ ID NO: 7-12. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой

кислоты, кодирующую белок α-GAL, где белок α-GAL предусматривает последовательность, являющуюся на по меньшей мере 85% идентичной одной из последовательностей под SEQ ID NO: 1-6. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок α-GAL, где последовательность нуклеиновой кислоты предусматривает последовательность под одним из SEQ ID NO: 8-12. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок α-GAL, где белок α-GAL предусматривает последовательность под одним из SEQ ID NO: 2-6. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок PPT1, где последовательность нуклеиновой кислоты является на по меньшей мере 85% идентичной одной из последовательностей под SEQ ID NO: 15-16. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок PPT1, где белок PPT1 предусматривает последовательность, являющуюся на по меньшей мере 85% идентичной одной из последовательностей под SEQ ID NO: 13-14. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок PPT1, где последовательность нуклеиновой кислоты предусматривает последовательность под SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок PPT1, где белок PPT1 предусматривает последовательность под SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит промоторную последовательность. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой конститутивный промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой тканеспецифический промотор. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты, выбранных из группы, состоящей из последовательности Козак, IRES CrPV, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей линкер, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей сигнальную последовательность, и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид IGF2. В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность пептида предусматривает сигнальную последовательность белка, связывающего иммуноглобулины (Bip). В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность пептида предусматривает сигнальную последовательность Bip,

предусматривающую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29-33. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность внутренней посадки рибосомы (IRES). В некоторых вариантах осуществления IRES предусматривает IRES вируса паралича сверчка (CrPV). В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант пептида IGF2 (vIGF2). В некоторых вариантах осуществления пептид vIGF2 предусматривает аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17-27. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая пептид vIGF2, расположена в направлении 5'-конца относительно последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей стабилизированную форму белка. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая пептид vIGF2, расположена в направлении 3'-конца относительно последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей стабилизированную форму белка. В некоторых вариантах осуществления конструкция упакована в вирусный капсид. В некоторых вариантах осуществления вектор для генной терапии или фармацевтическую композицию доставляют посредством интратекальной, интрацеребровентрикулярной, интрапаренхимальной или внутривенной инъекции или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления вектор для генной терапии или фармацевтическая композиция обеспечивают уменьшение выраженности или замедление развития одного или нескольких симптомов генетического нарушения у субъекта. В некоторых вариантах осуществления генетическое нарушение представляет собой лизосомное нарушение накопления. В некоторых вариантах осуществления генетическое нарушение выбрано из группы, состоящей из аспартилглюкозаминурии, болезни Баттена, цистиноза, болезни Фабри, болезни Гоше типа I, болезни Гоше типа II, болезни Гоше типа III, болезни Помпе, болезни Тея-Сакса, болезни Сандхоффа, метахроматической лейкодистрофии, муколипидоза типа I, муколипидоза типа II, муколипидоза типа III, 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, тяжелого

комбинированного иммунодефицита аденозиндезаминазы (ADA-SCID), хронической гранулематозной болезни (CGD), восковидного липофусциноза нейронов и нарушения, связанного с дефицитом CDKL5.

[0006] В дополнительных аспектах предусмотрены стабилизированные димеры α-галактозидазы А (α-GAL) человека. В некоторых вариантах осуществления стабилизированные димеры α-GAL содержат один или несколько ненативных цистеиновых остатков, где один или несколько ненативных цистеиновых остатков образуют по меньшей мере одну межмолекулярную дисульфидную связь, соединяющую первую субъединицу и вторую субъединицу димера α-GAL. В некоторых вариантах осуществления один или несколько ненативных цистеиновых остатков выбраны из группы, состоящей из (i) D233C и I359C и (ii) M51C и G360C. В некоторых вариантах осуществления один или несколько ненативных цистеиновых остатков предусматривают D233C и I359C. В некоторых вариантах осуществления один или несколько ненативных цистеиновых остатков предусматривают M51C и G360C. В некоторых вариантах осуществления один или несколько ненативных цистеиновых остатков предусматривают i) D233C и I359C и (ii) M51C и G360C. В некоторых вариантах осуществления полипептид характеризуется последовательностью, которая на по меньшей мере 90% идентична одной из последовательностей под SEQ ID NO: 1-6. В некоторых вариантах осуществления полипептид кодируется нуклеиновой кислотой, которая на по меньшей мере 85% идентична одной из последовательностей под SEQ ID NO: 7-12. В некоторых вариантах осуществления полипептид демонстрирует увеличенный период полужизни при pH 7,4 по сравнению с полипептидом α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления полипептид дополнительно содержит вариант пептида IGF2 (vIGF2).

[0007] В дополнительных аспектах предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие стабилизированные димеры α-GAL человека и фармацевтически приемлемые вспомогательное вещество, носитель или разбавитель. В некоторых вариантах осуществления стабилизированные димеры α-GAL содержат один или несколько ненативных цистеиновых остатков, где один или несколько ненативных цистеиновых остатков образуют по меньшей мере одну межмолекулярную дисульфидную связь, соединяющую первую субъединицу и вторую субъединицу димера α-GAL. В некоторых вариантах осуществления один или несколько ненативных цистеиновых остатков выбраны из группы, состоящей из (i) D233C и I359C и (ii) M51C и G360C. В некоторых вариантах осуществления один или несколько ненативных цистеиновых остатков предусматривают D233C и I359C. В некоторых вариантах осуществления один или

несколько ненативных цистеиновых остатков предусматривают M51C и G360C. В некоторых вариантах осуществления один или несколько ненативных цистеиновых остатков предусматривают i) D233C и I359C и (ii) M51C и G360C. В некоторых вариантах осуществления полипептид характеризуется последовательностью, которая на по меньшей мере 90% идентична одной из последовательностей под SEQ ID NO: 1-6. В некоторых вариантах осуществления полипептид кодируется нуклеиновой кислотой, которая на по меньшей мере 85% идентична одной из последовательностей под SEQ ID NO: 7-12. В некоторых вариантах осуществления полипептид демонстрирует увеличенный период полужизни при pH 7,4 по сравнению с полипептидом α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления полипептид дополнительно содержит вариант пептида IGF2 (vIGF2). В некоторых вариантах осуществления вспомогательное вещество выбрано из группы, состоящей из солевого раствора, малеиновой кислоты, винной кислоты, молочной кислоты, лимонной кислоты, уксусной кислоты, бикарбоната натрия, фосфата натрия, гистидина, глицина, хлорида натрия, хлорида калия, хлорида кальция, хлорида цинка, воды, декстрозы, N-метилпирролидона, диметилсульфоксида, N,N-диметилацетамида, этанола, пропиленгликоля, полиэтиленгликоля, моноэтилового эфира диэтиленгликоля и поверхностно-активного вещества, представляющего собой моноолеат полиоксиэтиленсорбитана.

[0008] В дополнительных аспектах предусмотрены способы лечения болезни Фабри у субъекта, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества стабилизированного димера α-GAL человека или фармацевтической композиции на его основе субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления стабилизированные димеры α-GAL содержат один или несколько ненативных цистеиновых остатков, где один или несколько ненативных цистеиновых остатков образуют по меньшей мере одну межмолекулярную дисульфидную связь, соединяющую первую субъединицу и вторую субъединицу димера α-GAL. В некоторых вариантах осуществления один или несколько ненативных цистеиновых остатков выбраны из группы, состоящей из (i) D233C и I359C и (ii) M51C и G360C. В некоторых вариантах осуществления один или несколько ненативных цистеиновых остатков предусматривают D233C и I359C. В некоторых вариантах осуществления один или несколько ненативных цистеиновых остатков предусматривают M51C и G360C. В некоторых вариантах осуществления один или несколько ненативных цистеиновых остатков предусматривают i) D233C и I359C и (ii) M51C и G360C. В некоторых вариантах осуществления полипептид характеризуется последовательностью, которая на по меньшей мере 90% идентична одной

из последовательностей под SEQ ID NO: 1-6. В некоторых вариантах осуществления полипептид кодируется нуклеиновой кислотой, которая на по меньшей мере 85% идентична одной из последовательностей под SEQ ID NO: 7-12. В некоторых вариантах осуществления полипептид демонстрирует увеличенный период полужизни при pH 7,4 по сравнению с полипептидом α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления полипептид дополнительно содержит вариант пептида IGF2 (vIGF2). В некоторых вариантах осуществления вспомогательное вещество выбрано из группы, состоящей из солевого раствора, малеиновой кислоты, винной кислоты, молочной кислоты, лимонной кислоты, уксусной кислоты, бикарбоната натрия, фосфата натрия, гистидина, глицина, хлорида натрия, хлорида калия, хлорида кальция, хлорида цинка, воды, декстрозы, N-метилпирролидона, диметилсульфоксида, N,N-диметилацетамида, этанола, пропиленгликоля, полиэтиленгликоля, моноэтилового эфира диэтиленгликоля и поверхностно-активного вещества, представляющего собой моноолеат полиоксиэтиленсорбитана. В некоторых вариантах осуществления стабилизированный димер α-GAL человека или фармацевтическую композицию доставляют посредством интратекальной, интрацеребровентрикулярной, интрапаренхимальной, подкожной, внутримышечной, глазной, внутривенной инъекции или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления стабилизированный димер α-GAL человека или фармацевтическая композиция на его основе обеспечивает уменьшение выраженности или замедление развития одного или нескольких симптомов болезни Фабри у субъекта.

[0009] В дополнительных аспектах предусмотрены стабилизированные молекулы пальмитоилпротеинтиоэстеразы 1 (PPT1) человека. В некоторых вариантах осуществления стабилизированная молекула PPT1 содержит один или несколько ненативных цистеиновых остатков, где один или несколько ненативных цистеиновых остатков образуют по меньшей мере одну внутримолекулярную дисульфидную связь в молекуле PPT1. В некоторых вариантах осуществления стабилизированная PPT1 содержит ненативные цистеиновые остатки A171C и A183C. В некоторых вариантах осуществления полипептид характеризуется последовательностью, которая на по меньшей мере 90% идентична одной из последовательностей под SEQ ID NO: 13-14. В некоторых вариантах осуществления полипептид кодируется нуклеиновой кислотой, которая на по меньшей мере 85% идентична одной из последовательностей под SEQ ID NO: 15-16. В некоторых вариантах осуществления полипептид демонстрирует увеличенный период полужизни при pH 7,4 по сравнению с полипептидом PPT1 дикого типа. В некоторых

вариантах осуществления полипептид дополнительно содержит вариант пептида IGF2 (vIGF2).

[0010] В дополнительных аспектах предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие стабилизированную PPT1 и фармацевтически приемлемые вспомогательное вещество, носитель или разбавитель. В некоторых вариантах осуществления стабилизированная молекула PPT1 содержит один или несколько ненативных цистеиновых остатков, где один или несколько ненативных цистеиновых остатков образуют по меньшей мере одну внутримолекулярную дисульфидную связь в молекуле PPT1. В некоторых вариантах осуществления стабилизированная PPT1 содержит ненативные цистеиновые остатки A171C и A183C. В некоторых вариантах осуществления полипептид характеризуется последовательностью, которая на по меньшей мере 90% идентична одной из последовательностей под SEQ ID NO: 13-14. В некоторых вариантах осуществления полипептид кодируется нуклеиновой кислотой, которая на по меньшей мере 85% идентична одной из последовательностей под SEQ ID NO: 15-16. В некоторых вариантах осуществления полипептид демонстрирует увеличенный период полужизни при pH 7,4 по сравнению с полипептидом PPT1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления полипептид дополнительно содержит вариант пептида IGF2 (vIGF2). В некоторых вариантах осуществления вспомогательное вещество выбрано из группы, состоящей из солевого раствора, малеиновой кислоты, винной кислоты, молочной кислоты, лимонной кислоты, уксусной кислоты, бикарбоната натрия, фосфата натрия, гистидина, глицина, хлорида натрия, хлорида калия, хлорида кальция, хлорида цинка, воды, декстрозы, N-метилпирролидона, диметилсульфоксида, N,N-диметилацетамида, этанола, пропиленгликоля, полиэтиленгликоля, моноэтилового эфира диэтиленгликоля и поверхностно-активного вещества, представляющего собой моноолеат полиоксиэтиленсорбитана.

[0011] В дополнительных аспектах предусмотрены способы лечения заболевания CLN1 у субъекта, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества стабилизированной PPT1 или фармацевтической композиции на ее основе субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления стабилизированная молекула PPT1 содержит один или несколько ненативных цистеиновых остатков, где один или несколько ненативных цистеиновых остатков образуют по меньшей мере одну внутримолекулярную дисульфидную связь в молекуле PPT1. В некоторых вариантах осуществления стабилизированная PPT1 содержит ненативные цистеиновые остатки A171C и A183C. В некоторых вариантах осуществления полипептид характеризуется

последовательностью, которая на по меньшей мере 90% идентична одной из последовательностей под SEQ ID NO: 13-14. В некоторых вариантах осуществления полипептид кодируется нуклеиновой кислотой, которая на по меньшей мере 85% идентична одной из последовательностей под SEQ ID NO: 15-16. В некоторых вариантах осуществления полипептид демонстрирует увеличенный период полужизни при pH 7,4 по сравнению с полипептидом PPT1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления полипептид дополнительно содержит вариант пептида IGF2 (vIGF2). В некоторых вариантах осуществления вспомогательное вещество выбрано из группы, состоящей из солевого раствора, малеиновой кислоты, винной кислоты, молочной кислоты, лимонной кислоты, уксусной кислоты, бикарбоната натрия, фосфата натрия, гистидина, глицина, хлорида натрия, хлорида калия, хлорида кальция, хлорида цинка, воды, декстрозы, N-метилпирролидона, диметилсульфоксида, N,N-диметилацетамида, этанола, пропиленгликоля, полиэтиленгликоля, моноэтилового эфира диэтиленгликоля и поверхностно-активного вещества, представляющего собой моноолеат полиоксиэтиленсорбитана. В некоторых вариантах осуществления модифицированную PPT1 или фармацевтическую композицию доставляют посредством интратекальной, интрацеребровентрикулярной, интрапаренхимальной, подкожной, внутримышечной, глазной, внутривенной инъекции или их комбинации.

[0012] В дополнительных аспектах предусмотрены модифицированные полипептиды α-галактозидазы A (α-GAL) человека, содержащие цистеиновые замены в последовательности полипептида α-GAL, выбранные из группы, состоящей из (i) D233C и I359C и (ii) M51C и G360C. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит цистеиновые замены D233C и I359C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит цистеиновые замены M51C и G360C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления полипептид образует гомодимер. В некоторых вариантах осуществления гомодимер стабилизирован дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления полипептид демонстрирует увеличенный период полужизни при pH 7,4 по сравнению с полипептидом α-GAL дикого типа.

[0013] В дополнительных аспектах предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный полипептид α-GAL человека. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид α-GAL человека содержит цистеиновые замены в последовательности полипептида α-GAL, выбранные из группы, состоящей из (i) D233C и I359C и (ii) M51C и G360C. В некоторых

вариантах осуществления полипептид содержит цистеиновые замены D233C и I359C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит цистеиновые замены M51C и G360C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления полипептид образует гомодимер. В некоторых вариантах осуществления гомодимер стабилизирован дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления полипептид демонстрирует увеличенный период полужизни при pH 7,4 по сравнению с полипептидом α-GAL дикого типа.

[0014] В дополнительных аспектах предусмотрены векторы для генной терапии, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный полипептид α-GAL человека. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид α-GAL человека содержит цистеиновые замены в последовательности полипептида α-GAL, выбранные из группы, состоящей из (i) D233C и I359C и (ii) M51C и G360C. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит цистеиновые замены D233C и I359C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит цистеиновые замены M51C и G360C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления полипептид образует гомодимер. В некоторых вариантах осуществления гомодимер стабилизирован дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления полипептид демонстрирует увеличенный период полужизни при pH 7,4 по сравнению с полипептидом α-GAL дикого типа.

[0015] В дополнительных аспектах предусмотрены модифицированные полипептиды α-галактозидазы A (α-GAL) человека, содержащие цистеиновые замены в последовательности полипептида α-GAL, где цистеиновые замены обеспечивают образование дисульфидной связи между двумя полипептидами α-GAL с образованием гомодимера. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит цистеиновые замены в последовательности полипептида α-GAL, выбранные из группы, состоящей из (i) D233C и I359C и (ii) M51C и G360C. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит цистеиновые замены D233C и I359C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит цистеиновые замены M51C и G360C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления полипептид демонстрирует увеличенный период полужизни при pH 7,4 по сравнению с полипептидом α-GAL дикого типа.

[0016] В дополнительных аспектах предусмотрена молекула нуклеиновой кислоты, включающая в себя нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный полипептид α-GAL человека. В некоторых вариантах осуществления модифицированные полипептиды α-галактозидазы А (α-GAL) человека содержат цистеиновые замены в последовательности полипептида α-GAL, где цистеиновые замены обеспечивают образование дисульфидной связи между двумя полипептидами α-GAL с образованием гомодимера. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит цистеиновые замены в последовательности полипептида α-GAL, выбранные из группы, состоящей из (i) D233C и I359C и (ii) M51C и G360C. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит цистеиновые замены D233C и I359C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит цистеиновые замены M51C и G360C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления полипептид демонстрирует увеличенный период полужизни при pH 7,4 по сравнению с полипептидом α-GAL дикого типа.

[0017] В дополнительных аспектах предусмотрены векторы для генной терапии, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный полипептид α-GAL человека. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид α-галактозидазы А (α-GAL) человека содержит цистеиновые замены в последовательности полипептида α-GAL, где цистеиновые замены обеспечивают образование дисульфидной связи между двумя полипептидами α-GAL с образованием гомодимера. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит цистеиновые замены в последовательности полипептида α-GAL, выбранные из группы, состоящей из (i) D233C и I359C и (ii) M51C и G360C. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит цистеиновые замены D233C и I359C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит цистеиновые замены M51C и G360C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления полипептид демонстрирует увеличенный период полужизни при pH 7,4 по сравнению с полипептидом α-GAL дикого типа.

[0018] В дополнительных аспектах предусмотрены гомодимеры, содержащие два модифицированных полипептида α-GAL человека, где каждый модифицированный полипептид α-GAL человека содержит цистеиновые замены в последовательности полипептида α-GAL, выбранные из группы, состоящей из (i) D233C и I359C и (ii) M51C и G360C. В некоторых вариантах осуществления каждый модифицированный полипептид α-GAL человека содержит цистеиновые замены D233C и I359C в последовательности

полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления каждый модифицированный полипептид α-GAL человека содержит цистеиновые замены M51C и G360C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления гомодимер стабилизирован дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления гомодимер демонстрирует увеличенный период полужизни при pH 7,4 по сравнению с гомодимером α-GAL дикого типа.

[0019] В дополнительных аспектах предусмотрены гомодимеры, содержащие два модифицированных полипептида α-GAL человека, где каждый модифицированный полипептид α-GAL человека содержит цистеиновые замены в последовательности полипептида α-GAL, где цистеиновые замены обеспечивают образование дисульфидной связи между двумя полипептидами α-GAL с образованием гомодимера. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит цистеиновые замены в последовательности полипептида α-GAL, выбранные из группы, состоящей из (i) D233C и I359C и (ii) M51C и G360C. В некоторых вариантах осуществления каждый модифицированный полипептид α-GAL человека содержит цистеиновые замены D233C и I359C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления каждый модифицированный полипептид α-GAL человека содержит цистеиновые замены M51C и G360C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления гомодимер стабилизирован дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления гомодимер демонстрирует увеличенный период полужизни при pH 7,4 по сравнению с гомодимером α-GAL дикого типа.

[0020] В дополнительных аспектах предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный полипептид α-GAL человека, где нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий цистеиновые замены в последовательности полипептида α-GAL, выбранные из группы, состоящей из (i) D233C и I359C и (ii) M51C и G360C. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий цистеиновые замены D233C и I359C. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий цистеиновые замены M51C и G360C. В некоторых вариантах осуществления полипептид образует гомодимер. В некоторых вариантах осуществления гомодимер стабилизирован дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления полипептид демонстрирует увеличенный период полужизни при pH 7,4 по сравнению с полипептидом α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой конструкцию для генной терапии. В некоторых вариантах

осуществления нуклеиновая кислота дополнительно содержит промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой конститутивный промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой тканеспецифический промотор. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит по меньшей мере часть последовательности нуклеиновой кислоты вируса. В некоторых вариантах осуществления вирус выбран исходя из того, что вирус включает ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, лентивирус или вирус герпеса.

[0021] В дополнительных аспектах предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный полипептид α-GAL человека, где нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий цистеиновые замены в последовательности полипептида α-GAL, где цистеиновые замены обеспечивают образование дисульфидной связи между двумя полипептидами α-GAL с образованием гомодимера. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит цистеиновые замены в последовательности полипептида α-GAL, выбранные из группы, состоящей из (i) D233C и I359C и (ii) M51C и G360C. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий цистеиновые замены D233C и I359C. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий цистеиновые замены M51C и G360C. В некоторых вариантах осуществления полипептид образует гомодимер. В некоторых вариантах осуществления гомодимер стабилизирован дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления полипептид демонстрирует увеличенный период полужизни при pH 7,4 по сравнению с полипептидом α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой конструкцию для генной терапии. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота дополнительно содержит промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой конститутивный промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой тканеспецифический промотор. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит по меньшей мере часть последовательности нуклеиновой кислоты вируса. В некоторых вариантах осуществления вирус выбран исходя из того, что вирус включает ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, лентивирус или вирус герпеса.

[0022] В дополнительных аспектах предусмотрены конструкции нуклеиновой кислоты, содержащие по меньшей мере один промотор и нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный полипептид α-GAL человека, где модифицированный полипептид α-GAL человека содержит цистеиновые замены в последовательности полипептида α-GAL,

выбранные из группы, состоящей из (i) D233C и I359C и (ii) M51C и G360C. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий цистеиновые замены D233C и I359C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий цистеиновые замены M51C и G360C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой конститутивный промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой тканеспецифический промотор. В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты содержит одну или несколько нуклеиновых кислот из группы, состоящей из IRES CrPV, последовательности Козак, нуклеиновой кислоты, кодирующей линкер, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей лидерную последовательность, и нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид IGF2. В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере часть последовательности нуклеиновой кислоты вируса. В некоторых вариантах осуществления вирус включает ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, лентивирус или вирус герпеса. В некоторых вариантах осуществления полипептид образует гомодимер. В некоторых вариантах осуществления гомодимер стабилизирован дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления полипептид демонстрирует увеличенный период полужизни при pH 7,4 по сравнению с полипептидом α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота упакована внутри вирусного капсидного белка. В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты является подходящей для генной терапии.

[0023] В дополнительных аспектах предусмотрены конструкции нуклеиновых кислот, содержащие по меньшей мере один промотор и нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный полипептид α-GAL человека, где модифицированный полипептид α-GAL человека содержит цистеиновые замены в последовательности полипептида α-GAL, где цистеиновые замены обеспечивают образование дисульфидной связи между двумя полипептидами α-GAL с образованием гомодимера. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит цистеиновые замены в последовательности полипептида α-GAL, выбранные из группы, состоящей из (i) D233C и I359C и (ii) M51C и G360C. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий цистеиновые замены D233C и I359C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий цистеиновые замены M51C и G360C в

последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой конститутивный промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой тканеспецифический промотор. В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты содержит одну или несколько нуклеиновых кислот из группы, состоящей из IRES CrPV, последовательности Козак, нуклеиновой кислоты, кодирующей линкер, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей лидерную последовательность, и нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид IGF2. В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере часть последовательности нуклеиновой кислоты вируса. В некоторых вариантах осуществления вирус включает ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, лентивирус или вирус герпеса. В некоторых вариантах осуществления полипептид образует гомодимер. В некоторых вариантах осуществления гомодимер стабилизирован дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления полипептид демонстрирует увеличенный период полужизни при pH 7,4 по сравнению с полипептидом α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота упакована внутри вирусного капсидного белка. В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты является подходящей для генной терапии.

[0024] В дополнительных аспектах предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие (a) модифицированный полипептид α-GAL человека, где модифицированный полипептид α-GAL человека содержит цистеиновые замены в последовательности полипептида α-GAL, выбранные из группы, состоящей из (i) D233C и I359C и (ii) M51C и G360C, и (b) фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид α-GAL человека содержит цистеиновые замены D233C и I359C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид α-GAL человека содержит цистеиновые замены M51C и G360C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид α-GAL человека образует гомодимер. В некоторых вариантах осуществления гомодимер стабилизирован дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид α-GAL человека демонстрирует увеличенный период полужизни при pH 7,4 по сравнению с полипептидом α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вспомогательное вещество выбрано из группы, состоящей из солевого раствора, малеиновой кислоты, винной кислоты, молочной кислоты, лимонной кислоты, уксусной

кислоты, бикарбоната натрия, фосфата натрия, гистидина, глицина, хлорида натрия, хлорида калия, хлорида кальция, хлорида цинка, воды, декстрозы, N-метилпирролидона, диметилсульфоксида, N,N-диметилацетамида, этанола, пропиленгликоля, полиэтиленгликоля, моноэтилового эфира диэтиленгликоля и поверхностно-активного вещества, представляющего собой моноолеат полиоксиэтиленсорбитана. В некоторых вариантах осуществления композиция является подходящей для заместительной ферментной терапии.

[0025] В дополнительных аспектах предусмотрены способы уменьшения интенсивности по меньшей мере одного симптома болезни Фабри у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение по меньшей мере одной дозы композиции, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты для генной терапии, содержащую по меньшей мере один промотор и нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный полипептид α-GAL человека, где модифицированный полипептид α-GAL человека содержит цистеиновые замены в последовательности полипептида α-GAL, выбранные из группы, состоящей из (i) D233C и I359C и (ii) M51C и G360C. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий цистеиновые замены D233C и I359C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий цистеиновые замены M51C и G360C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который образует гомодимер. В некоторых вариантах осуществления гомодимер стабилизирован дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует модифицированный полипептид α-GAL человека, характеризующийся увеличенным периодом полужизни при pH 7,4 по сравнению с полипептидом α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой конститутивный промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой тканеспецифический промотор. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит по меньшей мере часть таковой вируса. В некоторых вариантах осуществления вирус выбран исходя из того, что вирус включает ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, лентивирус или вирус герпеса. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота упакована внутри вирусного капсидного белка. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один симптом выбран из одного или нескольких из боли, изменения цвета кожи, неспособности к потоотделению, помутнения глаза, нарушения функции желудочно-кишечного тракта, шума в ушах,

потери слуха, пролапса митрального клапана, заболевания сердца, боли в суставах, почечной недостаточности и нарушения функции почки. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один симптом уменьшается при однократном введении конструкции нуклеиновой кислоты для генной терапии. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает измерение активности α-GAL в ткани, полученной от субъекта после лечения.

[0026] В дополнительных аспектах предусмотрены способы уменьшения интенсивности по меньшей мере одного симптома болезни Фабри у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение по меньшей мере одной дозы композиции, содержащей модифицированный полипептид α-GAL человека, где модифицированный полипептид α-GAL человека содержит цистеиновые замены в последовательности полипептида α-GAL, выбранные из группы, состоящей из (i) D233C и I359C и (ii) M51C и G360C. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид α-GAL человека предусматривает цистеиновые замены D233C и I359C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид α-GAL человека предусматривает цистеиновые замены M51C и G360C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид α-GAL человека образует гомодимер. В некоторых вариантах осуществления гомодимер стабилизирован дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид α-GAL человека демонстрирует увеличенный период полужизни при pH 7,4 по сравнению с полипептидом α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один симптом выбран из одного или нескольких из боли, изменения цвета кожи, неспособности к потоотделению, помутнения глаза, нарушения функции желудочно-кишечного тракта, шума в ушах, потери слуха, пролапса митрального клапана, заболевания сердца, боли в суставах, почечной недостаточности и нарушения функции почки.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПУТЕМ ССЫЛКИ

[0027] Все публикации, патенты и заявки на патенты, упоминаемые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки в том же объеме, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были специально и отдельно указаны с включением посредством ссылки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0028] Понимание признаков и преимуществ настоящего изобретения будет получено при обращении к нижеследующему подробному описанию, в котором изложены иллюстративные варианты осуществления, в которых используются принципы настоящего изобретения, и прилагаемым следующим графическим материалам.

[0029] На **фиг. 1A** и **фиг. 1B** показана структура α-галактозидазы A (α-GAL) и предлагаемые сайты аминокислотных замен.

[0030] На **фиг. 2A** показано образование модифицированного димера α-GAL.

[0031] На **фиг. 2B** показана ферментативная активность модифицированной α-GAL.

[0032] На **фиг. 3A** показана стабильность α-GAL при pH 4,6 и pH 7,4 в течение 24 часов.

[0033] На **фиг. 3B** показана стабильность α-GAL при pH 4,6 и pH 7,4 в течение 7 дней.

[0034] На **фиг. 4A** показан захват и ферментативная активность модифицированной α-GAL в фибробластах пациента с болезнью Фабри.

[0035] На **фиг. 4B** показано уменьшение уровня глоботриаозилсфингозина (lyso-Gb_3) в фибробластах пациента с болезнью Фабри.

[0036] На **фиг. 5** показана активность при увеличенном периоде полужизни двух димеров α-GAL с дисульфидными связями в клетках при болезни Фабри.

[0037] На **фиг. 6** показаны результаты гистологического анализа в отношении субстрата GB3 у мышей дикого типа и мышей с нокаутом GLA при применении лечения с помощью генной терапии с использованием модифицированной α-GAL и без него.

[0038] На **фиг. 7** показана активность фермента GLA у мышей дикого типа и мышей с нокаутом GLA при применении лечения с помощью генной терапии с использованием модифицированной α-GAL и без него.

[0039] На **фиг. 8** показан уровень субстрата GB3, измеренный в лизате ткани почек у мышей дикого типа и мышей с нокаутом GLA при применении лечения с помощью генной терапии с использованием модифицированной α-GAL и без него.

[0040] На **фиг. 9** показан анализ с помощью WinNonlin ферментативной активности пальмитоилпротеинтиоэстеразы 1 (PPT-1) дикого типа по сравнению с мутантом PPT-1 в составе конструкции с течением времени.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0041] В данном документе предусмотрены варианты полипептидов для терапии, включая конструкции для генной терапии, содержащие цистеиновые замены, которые обеспечивают стабилизацию за счет образования дисульфидных связей внутри молекулы

или за счет образования дисульфидных связей между двумя субъединицами в полипептиде с образованием димера. Эти дисульфидные связи позволяют получить более стабильный рекомбинантный фермент при нейтральном pH, таком как pH крови. Соответственно, предусмотрен более стабильный полипептид с более длительным периодом полужизни, пригодный для лечения заболеваний, возникающих в результате мутаций, включая заболевания, возникающие в результате мутации α-GAL, такие как болезнь Фабри; или мутации PPT-1, такие как болезнь CLN1. Варианты полипептидов (также называемые "модифицированные полипептиды") в данном документе включают без ограничения варианты α-GAL и PPT-1.

Модифицированные полипептиды α-GAL

[0042] В данном документе предусмотрены модифицированные полипептиды α-GAL, содержащие цистеиновые замены в последовательности полипептида α-GAL. Предполагаемые замены, предусмотренные в данном документе, включают: (i) R49C и G361C; (ii) R49C и G360C; (iii) D233C и I359C; (iv) M51C и G360C; и (v) S276C. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит цистеиновые замены в последовательности полипептида α-GAL, выбранные из группы, состоящей из (i) D233C и I359C и (ii) M51C и G360C. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит цистеиновые замены D233C и I359C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит цистеиновые замены M51C и G360C в последовательности полипептида α-GAL. Модифицированные полипептиды α-GAL могут образовывать гомодимер, стабилизированный по меньшей мере одной, более предпочтительно двумя межмолекулярными дисульфидными связями. Полипептид, предусматривающий модифицированные полипептиды α-GAL, демонстрирует увеличенный период полужизни при pH 7,4 по сравнению с полипептидом α-GAL дикого типа.

[0043] Последовательности дикого типа и иллюстративные модифицированные последовательности α-GAL представлены в таблице 1.

Таблица 1. Последовательности полипептида α-GAL

Вариант α-GAL	**Последовательность**	**SEQ ID NO:**
Человеческая α-GAL	MQLRNPELHLGCALALRFLALVSWDIPGARALDNGLARTPTMG WLHWERFMCNLDCQEEPDSCISEKLFMEMAELMVSEGWKDAG YEYLCIDDCWMAPQRDSEGRLQADPQRFPHGIRQLANYVHSKG	1

дикого типа (NP_000160.1)	LKLGIYADVGNKTCAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGVDLLKFDG CYCDSLENLADGYKHMSLALNRTGRSIVYSCEWPLYMWPFQKP NYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWKSIKSILDWTSFNQERIVDVAGP GGWNDPDMLVIGNFGLSWNQQVTQMALWAIMAAPLFMSNDLR HISPQAKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRQGDNFEVWERPLS GLAWAVAMINRQEIGGPRSYTIAVASLGKGVACNPACFITQLLPV KRKLGFYEWTSRLRSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL	
Человеческая α-GAL R49C – G361C	MQLRNPELHLGCALALRFLALVSWDIPGARALDNGLARTPTMG WLHWE**C**FMCNLDCQEEPDSCISEKLFMEMAELMVSEGWKDAG YEYLCIDDCWMAPQRDSEGRLQADPQRFPHGIRQLANYVHSKG LKLGIYADVGNKTCAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGVDLLKFDG CYCDSLENLADGYKHMSLALNRTGRSIVYSCEWPLYMWPFQKP NYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWKSIKSILDWTSFNQERIVDVAGP GGWNDPDMLVIGNFGLSWNQQVTQMALWAIMAAPLFMSNDLR HISPQAKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRQGDNFEVWERPLS GLAWAVAMINRQEIG**C**PRSYTIAVASLGKGVACNPACFITQLLPV KRKLGFYEWTSRLRSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL	2
Человеческая A-GAL R49C - G360C	MQLRNPELHLGCALALRFLALVSWDIPGARALDNGLARTPTMG WLHWE**C**FMCNLDCQEEPDSCISEKLFMEMAELMVSEGWKDAG YEYLCIDDCWMAPQRDSEGRLQADPQRFPHGIRQLANYVHSKG LKLGIYADVGNKTCAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGVDLLKFDG CYCDSLENLADGYKHMSLALNRTGRSIVYSCEWPLYMWPFQKP NYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWKSIKSILDWTSFNQERIVDVAGP GGWNDPDMLVIGNFGLSWNQQVTQMALWAIMAAPLFMSNDLR HISPQAKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRQGDNFEVWERPLS GLAWAVAMINRQEI**C**GPRSYTIAVASLGKGVACNPACFITQLLPV KRKLGFYEWTSRLRSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL	3
Человеческая α-GAL M51C - G360C	MQLRNPELHLGCALALRFLALVSWDIPGARALDNGLARTPTMG WLHWERF**C**CNLDCQEEPDSCISEKLFMEMAELMVSEGWKDAG YEYLCIDDCWMAPQRDSEGRLQADPQRFPHGIRQLANYVHSKG LKLGIYADVGNKTCAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGVDLLKFDG CYCDSLENLADGYKHMSLALNRTGRSIVYSCEWPLYMWPFQKP NYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWKSIKSILDWTSFNQERIVDVAGP GGWNDPDMLVIGNFGLSWNQQVTQMALWAIMAAPLFMSNDLR	4

	HISPQAKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRQGDNFEVWERPLS GLAWAVAMINRQEI**C**GPRSYTIAVASLGKGVACNPACFITQLLPV KRKLGFYEWTSRLRSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL	
Человеческая α-GAL D233C – I359C	MQLRNPELHLGCALALRFLALVSWDIPGARALDNGLARTPTMG WLHWERFMCNLDCQEEPDSCISEKLFMEMAELMVSEGWKDAG YEYLCIDDCWMAPQRDSEGRLQADPQRFPHGIRQLANYVHSKG LKLGIYADVGNKTCAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGVDLLKFDG CYCDSLENLADGYKHMSLALNRTGRSIVYSCEWPLYMWPFQKP NYTEIRQYCNHWRNFADI**C**DSWKSIKSILDWTSFNQERIVDVAGP GGWNDPDMLVIGNFGLSWNQQVTQMALWAIMAAPLFMSNDLR HISPQAKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRQGDNFEVWERPLS GLAWAVAMINRQE**C**GGPRSYTIAVASLGKGVACNPACFITQLLP VKRKLGFYEWTSRLRSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL	5
Человеческая α-GAL S276C	MQLRNPELHLGCALALRFLALVSWDIPGARALDNGLARTPTMG WLHWERFMCNLDCQEEPDSCISEKLFMEMAELMVSEGWKDAG YEYLCIDDCWMAPQRDSEGRLQADPQRFPHGIRQLANYVHSKG LKLGIYADVGNKTCAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGVDLLKFDG CYCDSLENLADGYKHMSLALNRTGRSIVYSCEWPLYMWPFQKP NYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWKSIKSILDWTSFNQERIVDVAGP GGWNDPDMLVIGNFGL**C**WNQQVTQMALWAIMAAPLFMSNDLR HISPQAKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRQGDNFEVWERPLS GLAWAVAMINRQEIGGPRSYTIAVASLGKGVACNPACFITQLLPV KRKLGFYEWTSRLRSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL	6

[0044] В данном документе также предусмотрены модифицированные полипептиды α-GAL, предусматривающие полипептид с последовательностью, содержащей цистеиновые остатки в положениях 51 и 360 и характеризующейся по меньшей мере 90% идентичностью с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления модифицированные полипептиды α-GAL предусматривают полипептид с последовательностью, содержащей цистеиновые остатки в положениях 51 и 360 и характеризующейся по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления модифицированные полипептиды α-GAL предусматривают полипептид с последовательностью, содержащей цистеиновые остатки в положениях 51 и 360 и

характеризующейся по меньшей мере 96% идентичностью с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления модифицированные полипептиды α-GAL предусматривают полипептид с последовательностью, содержащей цистеиновые остатки в положениях 51 и 360 и характеризующейся по меньшей мере 97% идентичностью с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления модифицированные полипептиды α-GAL предусматривают полипептид с последовательностью, содержащей цистеиновые остатки в положениях 51 и 360 и характеризующейся по меньшей мере 98% идентичностью с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления модифицированные полипептиды α-GAL предусматривают полипептид с последовательностью, содержащей цистеиновые остатки в положениях 51 и 360 и характеризующейся по меньшей мере 99% идентичностью с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления модифицированные полипептиды α-GAL предусматривают полипептид с последовательностью, содержащей цистеиновые остатки в положениях 51 и 360 и характеризующейся более, чем 99% идентичностью с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления модифицированные полипептиды α-GAL предусматривают полипептид с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 4.

[0045] В данном документе также предусмотрены модифицированные полипептиды α-GAL, предусматривающие полипептид с последовательностью, содержащей цистеиновые остатки в положениях 233 и 359 и характеризующейся по меньшей мере 90% идентичностью с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления модифицированные полипептиды α-GAL предусматривают полипептид с последовательностью, содержащей цистеиновые остатки в положениях 233 и 359 и характеризующейся по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления модифицированные полипептиды α-GAL предусматривают полипептид с последовательностью, содержащей цистеиновые остатки в положениях 233 и 359 и характеризующейся по меньшей мере 96% идентичностью с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления модифицированные полипептиды α-GAL, предусматривают полипептид с последовательностью, содержащей цистеиновые остатки в положениях 233 и 359 и

характеризующейся по меньшей мере 97% идентичностью с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления модифицированные полипептиды α-GAL, предусматривают полипептид с последовательностью, содержащей цистеиновые остатки в положениях 233 и 359 и характеризующейся по меньшей мере 98% идентичностью с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления модифицированные полипептиды α-GAL, предусматривают полипептид с последовательностью, содержащей цистеиновые остатки в положениях 233 и 359 и характеризующейся по меньшей мере 99% идентичностью с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления модифицированные полипептиды α-GAL, предусматривают полипептид с последовательностью, содержащей цистеиновые остатки в положениях 233 и 359 и характеризующейся более чем 99% идентичностью с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления модифицированные полипептиды α-GAL, предусматривают полипептид с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 5.

[0046] В данном документе также предусмотрены гомодимеры, содержащие два модифицированных полипептида α-GAL, где каждый модифицированный полипептид α-GAL содержит цистеиновые замены в последовательности полипептида α-GAL, выбранные из группы, состоящей из (i) R49C и G361C; (ii) R49C и G360C; (iii) D233C и I359C; (iv) M51C и G360C; и (v) S276C. В некоторых вариантах осуществления каждый модифицированный полипептид α-GAL содержит цистеиновые замены в последовательности полипептида α-GAL, выбранные из группы, состоящей из (i) D233C и I359C и (ii) M51C и G360C. В некоторых вариантах осуществления каждый модифицированный полипептид α-GAL содержит цистеиновые замены D233C и I359C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления каждый модифицированный полипептид α-GAL содержит цистеиновые замены M51C и G360C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления гомодимер стабилизирован дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления гомодимер демонстрирует увеличенный период полужизни при pH 7,4 по сравнению с гомодимером α-GAL дикого типа.

[0047] В некоторых вариантах осуществления модифицированные полипептиды α-GAL характеризуются увеличенным периодом полужизни при pH 4,6. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 4,6 является на по меньшей мере 50% большим,

чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 4,6 является на по меньшей мере 150% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 4,6 является на по меньшей мере 200% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 4,6 является на по меньшей мере 250% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 4,6 является на по меньшей мере 300% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 4,6 является на по меньшей мере 350% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 4,6 является на по меньшей мере 400% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа.

[0048] В некоторых вариантах осуществления модифицированный димер α-GAL характеризуется периодом полужизни при pH 4,6, который увеличен в по меньшей мере приблизительно 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 раз по сравнению с периодом полужизни α-GAL дикого типа при pH 4,6. Более предпочтительно модифицированный димер α-GAL характеризуется периодом полужизни при pH 4,6, который увеличен в по меньшей мере приблизительно 3, 3,5 или 4 раза по сравнению с периодом полужизни полипептида α-GAL дикого типа при pH 4,6.

[0049] В некоторых вариантах осуществления модифицированный димер α-GAL характеризуется периодом полужизни внутри клетки, который увеличен в по меньшей мере приблизительно 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 раз по сравнению с периодом полужизни внутри клетки человеческого α-GAL дикого типа. Более предпочтительно модифицированный димер α-GAL характеризуется периодом полужизни внутри клетки, который увеличен в по меньшей мере приблизительно 3, 3,5 или 4, 4,5, или 5 раз по сравнению с периодом полужизни внутри клетки полипептида α-GAL дикого типа.

[0050] Модифицированный димер α-GAL характеризуется существенно увеличенным периодом полужизни при pH 7,4 по сравнению с человеческим α-GAL дикого типа.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие модифицированные полипептиды α-GAL

[0051] В данном документе также предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие модифицированный полипептид α-GAL. Предполагаемые нуклеиновые кислоты включают таковые, кодирующие полипептид, содержащий цистеиновые замены в последовательности полипептида α-GAL, включая (i) R49C и G361C; (ii) R49C и G360C; (iii) D233C и I359C; (iv) M51C и G360C; и (v) S276C. В

некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий цистеиновые замены в последовательности полипептида α-GAL, выбранные из группы, состоящей из (i) D233C и I359C и (ii) M51C и G360C. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий цистеиновые замены D233C и I359C. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий цистеиновые замены M51C и G360C. В некоторых вариантах осуществления полипептид образует гомодимер. В некоторых вариантах осуществления гомодимер стабилизирован дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления полипептид демонстрирует увеличенный период полужизни при pH 7,4 по сравнению с полипептидом α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой конструкцию для генной терапии. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота дополнительно содержит промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой конститутивный промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой тканеспецифический промотор. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит по меньшей мере часть последовательности нуклеиновой кислоты вируса. В некоторых вариантах осуществления вирус выбран исходя из того, что вирус включает ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, лентивирус или вирус герпеса.

[0052] В данном документе также предусмотрены конструкции нуклеиновых кислот, содержащие по меньшей мере один промотор и нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный полипептид α-GAL. Предполагается, что модифицированные полипептиды α-GAL содержат цистеиновые замены в последовательности полипептида α-GAL, включая (i) R49C и G361C; (ii) R49C и G360C; (iii) D233C и I359C; (iv) M51C и G360C; и (v) S276C. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий цистеиновые замены в последовательности полипептида α-GAL, выбранные из группы, состоящей из (i) D233C и I359C и (ii) M51C и G360C. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий цистеиновые замены D233C и I359C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий цистеиновые замены M51C и G360C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой конститутивный промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой тканеспецифический промотор. В

некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере часть последовательности нуклеиновой кислоты вируса. В некоторых вариантах осуществления вирус включает ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, лентивирус или вирус герпеса. В некоторых вариантах осуществления полипептид образует гомодимер. В некоторых вариантах осуществления гомодимер стабилизирован дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления полипептид демонстрирует увеличенный период полужизни при pH 7,4 по сравнению с полипептидом α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота упакована внутри вирусного капсидного белка. В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты является подходящей для генной терапии.

Таблица 2. Последовательности нуклеиновой кислоты α-GAL

Вариант α-GAL	**Последовательность**	**SEQ ID NO:**
α-GAL дикого типа	atgcagctgaggaacccagaactacatctgggctgcgcgcttgcgcttcgcttcctggccctcgt ttcctgggacatccctggggctagagcactggacaatggattggcaaggacgcctaccatggg ctggctgcactgggagcgcttcatgtgcaaccttgactgccaggaagagccagattcctgcatc agtgagaagctcttcatggagatggcagagctcatggtctcagaaggctggaaggatgcaggtt atgagtacctctgcattgatgactgttggatggctccccaaagagattcagaaggcagacttcag gcagaccctcagcgctttcctcatgggattcgccagctagctaattatgttcacagcaaaggactg aagctagggatttatgcagatgttggaaataaaacctgcgcaggcttccctgggagttttggatac tacgacattgatgcccagacctttgctgactggggagtagatctgctaaaatttgatggttgttact gtgacagtttggaaaatttggcagatggttataagcacatgtccttggccctgaataggactggca gaagcattgtgtactcctgtgagtggcctctttatatgtggccctttcaaaagcccaattatacagaa atccgacagtactgcaatcactggcgaaattttgctgacattgatgattcctggaaaagtataaag agtatcttggactggacatcttttaaccaggagagaattgttgatgttgctggaccaggggttgg aatgacccagatatgttagtgattggcaactttggcctcagctggaatcagcaagtaactcagatg gccctctgggctatcatggctgctcctttattcatgtctaatgacctccgacacatcagccctcaag ccaaagctctccttcaggataaggacgtaattgccatcaatcaggacccctgggcaagcaagg gtaccagcttagacagggagacaactttgaagtgtgggaacgacctctctcaggcttagcctgg gctgtagctatgataaaccggcaggagattggtggacctcgctcttataccatcgcagttgcttcc ctgggtaaaggagtggcctgtaatcctgcctgcttcatcacacagctcctccctgtgaaaaggaa gctagggttctatgaatggacttcaaggttaagaagtcacataaatcccacaggcactgttttgctt	7

	cagctagaaaatacaatgcagatgtcattaaaagacttactttaa	
α-GAL R49C-G361C	atgcagctgaggaacccagaactacatctgggctgcgcgcttgcgcttcgcttcctggccctcgt ttcctgggacatccctggggctagagcactggacaatggattggcaaggacgcctaccatggg ctggctgcactgggag**T**gcttcatgtgcaaccttgactgccaggaagagccagattcctgcatc agtgagaagctcttcatggagatggcagagctcatggtctcagaaggctggaaggatgcaggtt atgagtacctctgcattgatgactgttggatggctccccaaagagattcagaaggcagacttcag gcagaccctcagcgctttcctcatgggattcgccagctagctaattatgttcacagcaaaggactg aagctagggatttatgcagatgttggaaataaaacctgcgcaggcttccctgggagttttggatac tacgacattgatgcccagacctttgctgactggggagtagatctgctaaaatttgatggttgttact gtgacagtttggaaaatttggcagatggttataagcacatgtccttggccctgaataggactggca gaagcattgtgtactcctgtgagtggcctctttatatgtggccctttcaaaagcccaattatacagaa atccgacagtactgcaatcactggcgaaattttgctgacattgatgattcctggaaaagtataaag agtatcttggactggacatcttttaaccaggagagaattgttgatgttgctggaccaggggttgg aatgacccagatatgttagtgattggcaactttggcctcagctggaatcagcaagtaactcagatg gccctctgggctatcatggctgctcctttattcatgtctaatgacctccgacacatcagccctcaag ccaaagctctccttcaggataaggacgtaattgccatcaatcaggacccctttgggcaagcaagg gtaccagcttagacagggagacaactttgaagtgtgggaacgacctctctcaggcttagcctgg gctgtagctatgataaaccggcaggagattggt**T**g**C**cctcgctcttataccatcgcagttgcttc cctgggtaaaggagtggcctgtaatcctgcctgcttcatcacacagctcctccctgtgaaaagga agctagggttctatgaatggacttcaaggttaagaagtcacataaatcccacaggcactgttttgct tcagctagaaaatacaatgcagatgtcattaaaagacttactttaa	8
α-GAL R49C-G360C	atgcagctgaggaacccagaactacatctgggctgcgcgcttgcgcttcgcttcctggccctcgt ttcctgggacatccctggggctagagcactggacaatggattggcaaggacgcctaccatggg ctggctgcactgggag**T**gcttcatgtgcaaccttgactgccaggaagagccagattcctgcatc agtgagaagctcttcatggagatggcagagctcatggtctcagaaggctggaaggatgcaggtt atgagtacctctgcattgatgactgttggatggctccccaaagagattcagaaggcagacttcag gcagaccctcagcgctttcctcatgggattcgccagctagctaattatgttcacagcaaaggactg aagctagggatttatgcagatgttggaaataaaacctgcgcaggcttccctgggagttttggatac tacgacattgatgcccagacctttgctgactggggagtagatctgctaaaatttgatggttgttact gtgacagtttggaaaatttggcagatggttataagcacatgtccttggccctgaataggactggca gaagcattgtgtactcctgtgagtggcctctttatatgtggccctttcaaaagcccaattatacagaa	9

	atccgacagtactgcaatcactggcgaaattttgctgacattgatgattcctggaaaagtataaag agtatcttggactggacatcttttaaccaggagagaattgttgatgttgctggaccaggggttgg aatgacccagatatgttagtgattggcaactttggcctcagctggaatcagcaagtaactcagatg gccctctgggctatcatggctgctcctttattcatgtctaatgacctccgacacatcagccctcaag ccaaagctctccttcaggataaggacgtaattgccatcaatcaggacccctttgggcaagcaagg gtaccagcttagacagggagacaactttgaagtgtgggaacgacctctctcaggcttagcctgg gctgtagctatgataaaccggcaggagatt**T**gtggacctcgctcttataccatcgcagttgcttcc ctgggtaaaggagtggcctgtaatcctgcctgcttcatcacacagctcctccctgtgaaaaggaa gctagggttctatgaatggacttcaaggttaagaagtcacataaatcccacaggcactgttttgctt cagctagaaaatacaatgcagatgtcattaaaagacttactttaa	
α-GAL M51C- G360C	atgcagctgaggaacccagaactacatctgggctgcgcgcttgcgcttcgcttcctggccctcgt ttcctgggacatccctggggctagagcactggacaatggattggcaaggacgcctaccatgggg ctggctgcactgggagcgcttc**TGC**tgcaaccttgactgccaggaagagccagattcctgca tcagtgagaagctcttcatggagatggcagagctcatggtctcagaaggctggaaggatgcag gttatgagtacctctgcattgatgactgttggatggctccccaaagagattcagaaggcagacttc aggcagaccctcagcgctttcctcatgggattcgccagctagctaattatgttcacagcaaagga ctgaagctagggatttatgcagatgttggaaataaaacctgcgcaggcttccctgggagttttgga tactacgacattgatgcccagacctttgctgactggggagtagatctgctaaaatttgatggttgtta ctgtgacagtttggaaaatttggcagatggttataagcacatgtccttggccctgaataggactgg cagaagcattgtgtactcctgtgagtggcctctttatatgtggccctttcaaaagcccaattatacag aaatccgacagtactgcaatcactggcgaaattttgctgacattgatgattcctggaaaagtataaa gagtatcttggactggacatcttttaaccaggagagaattgttgatgttgctggaccaggggttg gaatgacccagatatgttagtgattggcaactttggcctcagctggaatcagcaagtaactcagat ggccctctgggctatcatggctgctcctttattcatgtctaatgacctccgacacatcagccctcaa gccaaagctctccttcaggataaggacgtaattgccatcaatcaggacccctttgggcaagcaag ggtaccagcttagacagggagacaactttgaagtgtgggaacgacctctctcaggcttagcctg ggctgtagctatgataaaccggcaggagatt**T**gtggacctcgctcttataccatcgcagttgcttc cctgggtaaaggagtggcctgtaatcctgcctgcttcatcacacagctcctccctgtgaaaagga agctagggttctatgaatggacttcaaggttaagaagtcacataaatcccacaggcactgttttgct tcagctagaaaatacaatgcagatgtcattaaaagacttactttaa	10
α-GAL D233C- I359C	atgcagctgaggaacccagaactacatctgggctgcgcgcttgcgcttcgcttcctggccctcgt ttcctgggacatccctggggctagagcactggacaatggattggcaaggacgcctaccatgggg ctggctgcactgggagcgcttcatgtgcaaccttgactgccaggaagagccagattcctgcatc agtgagaagctcttcatggagatggcagagctcatggtctcagaaggctggaaggatgcaggtt	11

	atgagtacctctgcattgatgactgttggatggctccccaaagagattcagaaggcagacttcag gcagaccctcagcgctttcctcatgggattcgccagctagctaattatgttcacagcaaaggactg aagctagggatttatgcagatgttggaaataaaacctgcgcaggcttccctgggagttttggatac tacgacattgatgcccagacctttgctgactggggagtagatctgctaaaatttgatggttgttact gtgacagtttggaaaatttggcagatggttataagcacatgtccttggccctgaataggactggca gaagcattgtgtactcctgtgagtggcctctttatatgtggccctttcaaaagcccaattatacagaa atccgacagtactgcaatcactggcgaaattttgctgacatt**TGC**gattcctggaaaagtataa agagtatcttggactggacatcttttaaccaggagagaattgttgatgttgctggaccaggggttt ggaatgacccagatatgttagtgattggcaactttggcctcagctggaatcagcaagtaactcag atggccctctgggctatcatggctgctcctttattcatgtctaatgacctccgacacatcagccctc aagccaaagctctccttcaggataaggacgtaattgccatcaatcaggacccctgggcaagca agggtaccagcttagacagggagacaactttgaagtgtgggaacgacctctctcaggcttagcc tgggctgtagctatgataaaccggcaggag**TGC**ggtggacctcgctcttataccatcgcagtt gcttccctgggtaaaggagtggcctgtaatcctgcctgcttcatcacacagctcctccctgtgaaa aggaagctagggttctatgaatggacttcaaggttaagaagtcacataaatcccacaggcactgt tttgcttcagctagaaaatacaatgcagatgtcattaaaagacttactttaa	
α-GAL S276C	atgcagctgaggaacccagaactacatctgggctgcgcgcttgcgcttcgcttcctggccctcgt ttcctgggacatccctggggctagagcactggacaatggattggcaaggacgcctaccatggg ctggctgcactgggagcgcttcatgtgcaaccttgactgccaggaagagccagattcctgcatc agtgagaagctcttcatggagatggcagagctcatggtctcagaaggctggaaggatgcaggtt atgagtacctctgcattgatgactgttggatggctccccaaagagattcagaaggcagacttcag gcagaccctcagcgctttcctcatgggattcgccagctagctaattatgttcacagcaaaggactg aagctagggatttatgcagatgttggaaataaaacctgcgcaggcttccctgggagttttggatac tacgacattgatgcccagacctttgctgactggggagtagatctgctaaaatttgatggttgttact gtgacagtttggaaaatttggcagatggttataagcacatgtccttggccctgaataggactggca gaagcattgtgtactcctgtgagtggcctctttatatgtggccctttcaaaagcccaattatacagaa atccgacagtactgcaatcactggcgaaattttgctgacattgatgattcctggaaaagtataaag agtatcttggactggacatcttttaaccaggagagaattgttgatgttgctggaccaggggttgg aatgacccagatatgttagtgattggcaactttggcctc**T**gctggaatcagcaagtaactcagat ggccctctgggctatcatggctgctcctttattcatgtctaatgacctccgacacatcagccctcaa gccaaagctctccttcaggataaggacgtaattgccatcaatcaggacccctgggcaagcaag ggtaccagcttagacagggagacaactttgaagtgtgggaacgacctctctcaggcttagcctg ggctgtagctatgataaaccggcaggagattggtggacctcgctcttataccatcgcagttgcttc cctgggtaaaggagtggcctgtaatcctgcctgcttcatcacacagctcctccctgtgaaaagga	12

	agctagggttctatgaatggacttcaaggttaagaagtcacataaatcccacaggcactgttttgct tcagctagaaaatacaatgcagatgtcattaaaagacttactttaa	

[0053] В некоторых вариантах осуществления кодируемые нуклеиновыми кислотами модифицированные полипептиды α-GAL, представленные в данном документе, характеризуются увеличенным периодом полужизни по сравнению с полипептидом α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни является на по меньшей мере 50% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни является на по меньшей мере 150% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни является на по меньшей мере 200% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни является на по меньшей мере 250% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни является на по меньшей мере 300% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни является на по меньшей мере 350% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа.

Модифицированные полипептиды PPT-1

[0054] В данном документе предусмотрены модифицированные полипептиды PPT-1, содержащие цистеиновые замены в последовательности полипептида PPT-1. Предполагаемые замены, предусмотренные в данном документе, включают A171C и A183C. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит цистеиновые замены A171C и A183C в последовательности полипептида PPT-1. Модифицированный полипептид PPT-1 стабилизирован по меньшей мере одной, более предпочтительно двумя внутримолекулярными дисульфидными связями. Полипептид, предусматривающий модифицированные полипептиды PPT-1, демонстрирует увеличенный период полужизни при pH 7,4 по сравнению с полипептидом PPT-1 дикого типа.

[0055] PPT-1 дикого типа и иллюстративный модифицированный PPT-1 представлены в таблице 3.

Таблица 3. Последовательности полипептида PPT-1

Вариант PPT-1	**Последовательность**	**SEQ ID NO:**
Челове	MASPGCLWLLAVALLPWTCASRALQHLDPPAPLPLVIWHGMG	13

ческая PPT-1 дикого типа (NP_000301.1)	DSCCNPLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLN VNSQVTTVCQALAKDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCP SPPMINLISVGGQHQGVFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSK VVQERLVQAEYWHDPIKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKN LMALKKFVMVKFLNDSIVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETS LYTQDRLGLKEMDNAGQLVFLATEGDHLQLSEEWFYAHIIPFLG	
PPT-1 A171C A183C	MASPGCLWLLAVALLPWTCASRALQHLDPPAPLPLVIWHGMG DSCCNPLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLN VNSQVTTVCQALAKDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCP SPPMINLISVGGQHQGVFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAG**C**YSK VVQERLVQ**C**EYWHDPIKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKN LMALKKFVMVKFLNDSIVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETS LYTQDRLGLKEMDNAGQLVFLATEGDHLQLSEEWFYAHIIPFLG	14

[0056] В данном документе также предусмотрены модифицированные полипептиды PPT-1, предусматривающие полипептид с последовательностью, содержащей цистеиновые остатки в положениях 171 и 183 и характеризующейся по меньшей мере 90% идентичностью с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления модифицированные полипептиды PPT-1 предусматривают полипептид с последовательностью, содержащей цистеиновые остатки в положениях 171 и 183 и характеризующейся по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления модифицированные полипептиды PPT-1 предусматривают полипептид с последовательностью, содержащей цистеиновые остатки в положениях 171 и 183 и характеризующейся по меньшей мере 96% идентичностью с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления модифицированные полипептиды PPT-1 предусматривают полипептид с последовательностью, содержащей цистеиновые остатки в положениях 171 и 183 и характеризующейся по меньшей мере 97% идентичностью с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления модифицированные полипептиды PPT-1 предусматривают полипептид с последовательностью, содержащей цистеиновые остатки в положениях 171 и 183 и характеризующейся по меньшей мере 98% идентичностью с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления

модифицированные полипептиды PPT-1 предусматривают полипептид с последовательностью, содержащей цистеиновые остатки в положениях 171 и 183 и характеризующейся по меньшей мере 99% идентичностью с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления модифицированные полипептиды PPT-1 предусматривают полипептид с последовательностью, содержащей цистеиновые остатки в положениях 171 и 183 и характеризующейся более, чем 99% идентичностью с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления модифицированные полипептиды PPT-1 предусматривают полипептид с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 14.

[0057] В некоторых вариантах осуществления модифицированные полипептиды PPT-1 характеризуются увеличенным периодом полужизни при pH 4,6. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 4,6 является на по меньшей мере 50% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 4,6 является на по меньшей мере 150% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 4,6 является на по меньшей мере 200% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 4,6 является на по меньшей мере 250% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 4,6 является на по меньшей мере 300% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 4,6 является на по меньшей мере 350% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 4,6 является на по меньшей мере 400% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа.

[0058] В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид PPT-1 характеризуется периодом полужизни при pH 4,6, который увеличен в по меньшей мере приблизительно 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 раз по сравнению с периодом полужизни PPT-1 дикого типа при pH 4,6. Более предпочтительно модифицированный полипептид PPT-1 характеризуется периодом полужизни при pH 4,6, который увеличен в по меньшей мере приблизительно 3, 3,5 или 4 раза по сравнению с периодом полужизни полипептида PPT-1 дикого типа при pH 4,6.

[0059] В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид PPT-1 характеризуется периодом полужизни внутри клетки, который увеличен в по меньшей

мере приблизительно 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 раз по сравнению с периодом полужизни внутри клетки человеческого α-GAL дикого типа. Более предпочтительно модифицированный полипептид PPT-1 характеризуется периодом полужизни внутри клетки, который увеличен в по меньшей мере приблизительно 3, 3,5 или 4, 4,5, или 5 раз по сравнению с периодом полужизни внутри клетки полипептида PPT-1 дикого типа.

[0060] Модифицированный полипептид PPT-1 характеризуется существенно увеличенным периодом полужизни при pH 7,4 по сравнению с человеческим α-GAL дикого типа.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие модифицированные полипептиды PPT-1

[0061] В данном документе также предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие модифицированный полипептид PPT-1. Предполагаемые нуклеиновые кислоты включают таковые, кодирующие полипептид, содержащий цистеиновые замены в последовательности полипептида PPT-1, включая A171C и A183C. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий цистеиновые замены A171C и A183C. В некоторых вариантах осуществления полипептид стабилизирован дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления полипептид демонстрирует увеличенный период полужизни при pH 7,4 по сравнению с полипептидом PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой конструкцию для генной терапии. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота дополнительно содержит промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой конститутивный промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой тканеспецифический промотор. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит по меньшей мере часть последовательности нуклеиновой кислоты вируса. В некоторых вариантах осуществления вирус выбран исходя из того, что вирус включает ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, лентивирус или вирус герпеса.

Таблица 4. Последовательности нуклеиновой кислоты PPT-1		
Вариант PPT-1	**Последовательность**	**SEQ ID NO:**

PPT-1 дикого типа	TTATTTTGATTCACCGCAGAGGGCGGTCTACGAGAGCGC AGAGCCCCACTCGGCCAGCGGGGTCTGGCGGGGGACCTG TCGCGCTGAAAGCTCCAGGGTAGGGCCGACGCCCATCAG GCTGGGCATCCGTTCGGGATGCGCAGGTTGCGATCTGCA ACCGGCGGCGCCACGCCCAGGCGGGCGGAGCGCGGTTCC CGGAGTCTCGCGCCCGCGGTCATGTGACACAGCGAAGAT GGCGTCGCCCGGCTGCCTGTGGCTCTTGGCTGTGGCTCTC CTGCCATGGACCTGCGCTTCTCGGGCGCTGCAGCATCTGG ACCCGCCGGCGCCGCTGCCGTTGGTGATCTGGCATGGGA TGGGAGACAGCTGTTGCAATCCCTTAAGCATGGGTGCTAT TAAAAAAATGGTGGAGAAGAAAATACCTGGAATTTACGT CTTATCTTTAGAGATTGGGAAGACCCTGATGGAGGACGT GGAGAACAGCTTCTTCTTGAATGTCAATTCCCAAGTAACA ACAGTGTGTCAGGCACTTGCTAAGGATCCTAAATTGCAG CAAGGCTACAATGCTATGGGATTCTCCCAGGGAGGCCAA TTTCTGAGGGCAGTGGCTCAGAGATGCCCTTCACCTCCCA TGATCAATCTGATCTCGGTTGGGGGACAACATCAAGGTG TTTTTGGACTCCCTCGATGCCCAGGAGAGAGCTCTCACAT CTGTGACTTCATCCGAAAAACACTGAATGCTGGGGCGTA CTCCAAAGTTGTTCAGGAACGCCTCGTGCAAGCCGAATA CTGGCATGACCCCATAAAGGAGGATGTGTATCGCAACCA CAGCATCTTCTTGGCAGATATAAATCAGGAGCGGGGTAT CAATGAGTCCTACAAGAAAAACCTGATGGCCCTGAAGAA GTTTGTGATGGTGAAATTCCTCAATGATTCCATTGTGGAC CCTGTAGATTCGGAGTGGTTTGGATTTTACAGAAGTGGCC AAGCCAAGGAAACCATTCCCTTACAGGAGACCTCCCTGT ACACACAGGACCGCCTGGGGCTAAAGGAAATGGACAAT GCAGGACAGCTAGTGTTTCTGGCTACAGAAGGGGACCAT CTTCAGTTGTCTGAAGAATGGTTTTATGCCCACATCATAC CATTCCTTGGATGAAACCCGTATAGTTCACAATAGAGCTC AGGGAGCCCCTAACTCTTCCAAACCACATGGGAGACAGT TTCCTTCATGCCCAAGCCTGAGCTCAGATCCAGCTTGCAA CTAATCCTTCTATCATCTAACATGCCCTACTTGGAAAGAT CTAAGATCTGAATCTTATCCTTTGCCATCTTCTGTTACCAT	15

	ATGGTGTTGAATGCAAGTTTAATTACCATGGAGATTGTTT TACAAACTTTTGATGTGGTCAAGTTCAGTTTTAGAAAAGG GAGTCTGTTCCAGATCAGTGCCAGAACTGTGCCCAGGCC CAAAGGAGACAACTAACTAAAGTAGTGAGATAGATTCTA AGGGCAAACATTTTTCCAAGTCTTGCCATATTTCAAGCAA AGAGGTGCCCAGGCCTGAGGTACTCACATAAATGCTTTG TTTTGCTGGTGATTTAACCAGTGCTTGGAAAAATCTTGCT TGGCTATTTCTGCATCATTTCTTAAGGCTGCCTTCCTCTCT CAGTACGTTGCCCTCTGTGCTATCATCTTATCATCAATTAT TAGACAAATCCCACTGGCCTACAGTCTTGCTTCTGCAGCA CCCACTTTGTCTCCTCAGGTAGTGATGAATTAGTTGCTGT CACAAAAGGAGGGAAGTAGCACCCAAATTAAGTTGCTTA AGAGAGGAAATGTACATCTTGTATAACTTAGGGAGCGAA GAAAATGTAGGCGCGAAAGTGAAAAGTGAGGCAGCTAG TTCTTCCTATTCCATTCTCGACCAACCTGCCCTTTCTTAAT ATGACTAGTGGTCTTGATGCTAGAGTCAACTTACTCTGTT GCTGGCTTTAGCAGAGAATAGGAGGAACCATATGAAAAA GATCAGGCTTTCTGACTTCCATCCCCAAAACACATTTACC AGCATACTCCAAACTGTTTCTGATGTGTTCCATGAGAAAA GGATTGTTTGCTCAAAAAGCTTGGAAAATACTACACACTC CCTTTCTCCTTCTGGAGATCAACCCACATTAGAGTGTCTA AGGACTCCTGAGAATTCCTGTTACAGTAAACAAAACTAA CGTAATCTACCATTTCCTACACTATTTGAGCATGGAAATC ATAGTCCCCACTCTGTGAAAACTTAACGCTTTTTGGAAGA CATTTCTGTAGCATGTCAGTTTGGAGAAATGATGAGCTAC GCCTTGATGAAAGAACCGTGTTGGTGCTGCTAAGTTTAGC CATTATGGTTTTTCCTTTCTCTCTCTTAAGCCTTATTCTTC AACTAAAAGATGAGGATTAAGAGCAAGAAGTTGGGGGG GATGTGAAAATAATTTTATGAGGTTGTCTAAAATAAAGA GTAGTTTCTTATC	
PPT-1 A171C A183C	ATGGCATCACCGGGTTGCCTCTGGTTGTTGGCCGTTGCGT TGCTTCCGTGGACATGTGCATCAAGAGCTCTTCAACATCT GGATCCCCCAGCTCCCCTGCCGCTCGTAATCTGGCACGGG ATGGGGGATTCATGTTGTAACCCGTTGTCAATGGGCGCG	16

	ATAAAAAAGATGGTTGAAAAGAAGATTCCAGGCATCTAC GTTCTGTCCCTGGAAATCGGTAAGACACTGATGGAAGAC GTGGAGAACTCCTTCTTTCTCAACGTCAATAGTCAGGTCA CTACCGTCTGTCAAGCATTGGCAAAGGACCCTAAACTTC AGCAGGGGTACAATGCGATGGGGTTTAGCCAGGGCGGAC AGTTTCTTAGAGCCGTCGCACAGCGCTGTCCATCTCCCCC GATGATTAACCTTATATCTGTCGGGGGACAACACCAGGG TGTTTTTGGTCTTCCTCGCTGTCCTGGTGAAAGCTCCCAC ATCTGTGATTTCATACGCAAAACGTTGAACGCAGGATGCT ATAGTAAAGTCGTCCAAGAACGGCTTGTTCAATGCGAGT ATTGGCATGACCCAATAAAAGAAGACGTTTATAGGAATC ACTCTATCTTCTTGGCCGATATCAACCAAGAACGCGGAAT CAACGAAAGCTACAAAAAGAATCTTATGGCTCTCAAGAA ATTTGTTATGGTGAAATTCCTTAATGACTCTATAGTAGAT CCTGTCGATTCAGAATGGTTCGGGTTCTACAGGTCTGGCC AGGCGAAGGAGACTATTCCCCTCCAAGAAACGTCTCTCT ATACACAAGACAGACTCGGACTGAAAGAGATGGATAATG CGGGCCAGTTGGTCTTCTTGGCTACGGAAGGCGATCATCT CCAACTCTCCGAAGAGTGGTTCTATGCCCATATAATCCCG TTCCTGGGCTAA	

[0062] В некоторых вариантах осуществления кодируемые нуклеиновыми кислотами модифицированные полипептиды PPT-1, представленные в данном документе, характеризуются увеличенным периодом полужизни по сравнению с полипептидом PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни является на по меньшей мере 50% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни является на по меньшей мере 150% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни является на по меньшей мере 200% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни является на по меньшей мере 250% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни является на по меньшей мере 300% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления

период полужизни является на по меньшей мере 350% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа.

Пептиды IGF2

[0063] В некоторых случаях модифицированные полипептиды, представленные в данном документе, такие как модифицированные полипептиды α-GAL или модифицированные полипептиды PPT-1, представленные в данном документе, слиты с пептидом инсулиноподобный фактор роста 2 (IGF2) для обеспечения направленной доставки модифицированных полипептидов в лизосомы, где они необходимы. Варианты последовательности пептида IGF2 сохраняют высокую аффинность связывания с IGF2/CI-MPR и исключают связывание с IGF1, рецепторами инсулина и белками, связывающими IGF (IGFBP). Вариант пептида IGF2 является значительно более селективным и характеризуется меньшими рисками безопасности по сравнению с обычными слитыми белками на основе IGF2. Пептиды IGF2, представленные в данном документе, включают пептиды, имеющие аминокислотную последовательность AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPASRVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYC ATPAKSE (SEQ ID NO: 17). Дополнительные пептиды IGF2 имеют вариантные аминокислотные последовательности, оптимизированные для улучшения направленной доставки. Варианты пептидов IGF2 предусматривают вариантные аминокислоты в положениях 26, 27, 43, 48, 49, 50, 54, 55 или 65 в последовательности IGF2 дикого типа. К ним относятся замены в F26, Y27, V43, F48, R49, S50, A54, L55 или K65 в SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления пептид IGF2 имеет последовательность, содержащую одну или несколько замен из группы, состоящей из F26S, Y27L, V43L, F48T, R49S, S50I, A54R, L55R и K65R. В некоторых вариантах осуществления пептид IGF2 имеет последовательность, характеризующуюся наличием замены F26S. В некоторых вариантах осуществления пептид IGF2 имеет последовательность, характеризующуюся наличием замены Y27L. В некоторых вариантах осуществления пептид IGF2 имеет последовательность, характеризующуюся наличием замены V43L. В некоторых вариантах осуществления пептид IGF2 имеет последовательность, характеризующуюся наличием замены F48T. В некоторых вариантах осуществления пептид IGF2 имеет последовательность, характеризующуюся наличием замены R49S. В некоторых вариантах осуществления пептид IGF2 имеет последовательность, характеризующуюся наличием замены S50I. В некоторых вариантах осуществления пептид IGF2 имеет последовательность, характеризующуюся наличием замены A54R. В некоторых вариантах

осуществления пептид IGF2 имеет последовательность, характеризующуюся наличием замены L55R. В некоторых вариантах осуществления пептид IGF2 имеет последовательность, характеризующуюся наличием замены K65R. В некоторых вариантах осуществления пептид IGF2 имеет последовательность, характеризующуюся наличием замен F26S, Y27L, V43L, F48T, R49S, S50I, A54R и L55R. В некоторых вариантах осуществления пептид IGF2 характеризуется N-концевой делецией. В некоторых вариантах осуществления пептид IGF2 характеризуется N-концевой делецией одной аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления пептид IGF2 характеризуется N-концевой делецией двух аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептид IGF2 характеризуется N-концевой делецией трех аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептид IGF2 характеризуется N-концевой делецией трех аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептид IGF2 характеризуется N-концевой делецией четырех аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептид IGF2 характеризуется N-концевой делецией пяти аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептид IGF2 характеризуется N-концевой делецией шести аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептид IGF2 характеризуется N-концевой делецией семи аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептид IGF2 характеризуется N-концевой делецией семи аминокислот и наличием замен Y27L и K65R.

[0064] Предполагаются дополнительные замены для уменьшения нестабильности при сохранении аффинности связывания CI-MPR. Предполагается, что эти замены можно комбинировать с любыми другими заменами, описанными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления пептид IGF2 имеет последовательность, характеризующуюся наличием замены L17N. В некоторых вариантах осуществления пептид IGF2 имеет последовательность, характеризующуюся наличием замены P31G. В некоторых вариантах осуществления пептид IGF2 имеет последовательность, характеризующуюся наличием замены R38G. В некоторых вариантах осуществления пептид IGF2 имеет последовательность, характеризующуюся наличием замены E45W. В некоторых вариантах осуществления пептид IGF2 имеет последовательность, характеризующуюся наличием замены S50G. В некоторых вариантах осуществления пептид IGF2 имеет последовательность, характеризующуюся наличием замен R38G и E45W. В некоторых вариантах осуществления пептид IGF2 имеет последовательность, характеризующуюся наличием замен R38G, E45W и S50G. В некоторых вариантах осуществления пептид IGF2 имеет последовательность, характеризующуюся наличием замен P31G, R38G, E45W и S50G. В некоторых вариантах осуществления пептид IGF2

имеет последовательность, характеризующуюся наличием замен L17N, P31G, R38G, E45W и S50G. Иллюстративные последовательности пептида представлены под SEQ ID NO: 17-27.

Таблица 5. Последовательности пептида IGF (вариантные остатки подчеркнуты)

Пептид	**Последовательность**	**SEQ ID NO**
Дикий тип	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRP ASRVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATP AKSE	17
F26S	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGSYFSRP ASRVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATP AKSE	18
Y27L	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPA SRVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPA KSE	19
V43L	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRP ASRVSRRSRGILEECCFRSCDLALLETYCATP AKSE	20
F48T	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRP ASRVSRRSRGIVEECCTRSCDLALLETYCATP AKSE	21
R49S	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRP ASRVSRRSRGIVEECCFSSCDLALLETYCATP AKSE	22
S50I	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRP ASRVSRRSRGIVEECCFRICDLALLETYCATPA KSE	23
A54R	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRP ASRVSRRSRGIVEECCFRSCDLRLLETYCATP AKSE	24
L55R	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRP	25

	ASRVSRRSRGIVEECCFRSCDLARLETYCATP AKSE	
F26S, Y27L, V43L, F48T, R49S, S50I, A54R, L55R	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGSLFSRPA SRVSRRSRGILEECCTSICDLRRLETYCATPAK SE	26
Δ1-6, Y27L, K65R	TLCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRVSRR SRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSE	27

Последовательности внутренней посадки рибосомы

[0065] Нуклеиновые кислоты, кодирующие модифицированные полипептиды, представленные в данном документе, такие как нуклеиновые кислоты, кодирующие модифицированные полипептиды α-GAL и PP-1, в некоторых вариантах осуществления дополнительно содержат последовательность внутренней посадки рибосомы (IRES) для увеличения уровня экспрессии гена путем обхода "бутылочного горлышка" инициации трансляции. Подходящие последовательности внутренней посадки рибосомы для оптимизации экспрессии для генной терапии включают без ограничения IRES вируса паралича сверчка (CrPV), IRES пикорнавируса, IRES афтовируса, IRES герпесвируса, ассоциированного с саркомой Капоши, IRES вируса гепатита A, IRES вируса гепатита C, IRES пестивируса, IRES крипавируса, IRES вируса Rhopalosiphum padi, IRES вируса болезни Марека и другие подходящие последовательности IRES. В некоторых вариантах осуществления конструкция для генной терапии содержит IRES CrPV. В некоторых вариантах осуществления IRES CrPV имеет последовательность нуклеиновой кислоты CGGUGUCGAAGUAGAAUUUCUAUCUCGACACGCGGCCUUCCAAGCAGUUAGGGA AACCGACUUCUUUGAAGAAGAAAGCUGACUAUGUGAUCUUAUUAAAAUUAGGUU AAAUUUCGAGGUUAAAAAUAGUUUUAAUAUUGCUAUAGUCUUAGAGGUCUUGUA UAUUUAUACUUACCACACAAGAUGGACCGGAGCAGCCCUCCAAUAUCUAGUGUAC CCUCGUGCUCGCUCAAACAUUAAGUGGUGUUGUGCGAAAAGAAUCUCACUUCAA GAA (SEQ ID NO: 28).

Сигнальная последовательность

[0066] В данном документе предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие модифицированные полипептиды, такие как модифицированные полипептиды α-GAL или модифицированные полипептиды PPT-1, где молекулы нуклеиновой кислоты дополнительно содержат сигнальный пептид, который

улучшает секрецию терапевтического белка из клетки, трансдуцированной конструкцией для генной терапии. Сигнальный пептид в некоторых вариантах осуществления обеспечивает улучшение процессинга терапевтических белков, и облегчение транслокации появляющегося комплекса полипептид-рибосома в ER, и обеспечивает правильные ко-трансляционные и посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид расположен (i) в положении выше сигнальной последовательности инициации трансляции, (ii) между последовательностью инициации трансляции и терапевтическим белком или (iii) в положении ниже терапевтического белка. Сигнальные пептиды, применимые в конструкциях для генной терапии, включают без ограничения сигнальный пептид белка, связывающего иммуноглобулины (BiP), из семейства белков HSP70 (например, HSPA5, представитель 5 семейства А белков теплового шока) и его варианты. Эти сигнальные пептиды характеризуются сверхвысокой аффинностью к частице распознавания сигнала. Примеры аминокислотных последовательностей BiP представлены в таблице 6 ниже. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 29-33. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид отличается от последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 29-33, на 5 или меньше, 4 или меньше, 3 или меньше, 2 или меньше или 1 аминокислоту.

Таблица 6. Сигнальные последовательности

Сигнальная последовательность	**Аминокислотная последовательность**	**SEQ ID NO:**
Нативный Bip человека	MKLSLVAAMLLLLSAARA	29
Модифицированный Bip-1	MKLSLVAAMLLLLSLVAAMLLLLSAARA	30
Модифицированный Bip-2	MKLSLVAAMLLLLWVALLLLSAARA	31
Модифицированный Bip-3	MKLSLVAAMLLLLSLVALLLLSAARA	32
Модифицированный Bip-4	MKLSLVAAMLLLLALVALLLLSAARA	33

Последовательность Козак

[0067] В настоящем документе предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие модифицированные полипептиды, такие как модифицированные полипептиды α-GAL или модифицированные полипептиды PPT-1, где молекулы нуклеиновой кислоты дополнительно содержат нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность Козак, которая помогает в инициации трансляции мРНК. Последовательности Козак, предполагаемые в данном документе, содержат консенсусную последовательность gccRccAUGG (SEQ ID NO: 34), где строчная буква обозначает наиболее распространенное основание в данном положении, и основание варьирует, прописные буквы указывают на высококонсервативные основания, которые очень редко меняются. R указывает, что пурин (аденин или гуанин) всегда присутствует в этом положении. Последовательность в скобках (gcc) имеет неопределенное значение.

Терапевтический белок

[0068] Предусмотренные в данном документе конструкции для генной терапии содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую стабилизированную форму белка для лечения генетического нарушения. Терапевтический белок, экспрессируемый с конструкции для генной терапии, заменяет отсутствующий или дефектный белок. Следовательно, терапевтические белки выбирают на основе генетического дефекта, требующего лечения у индивидуума. Стабилизированные формы, представленные в данном документе, содержат один или несколько ненативных цистеиновых остатков, которые образуют дисульфидный мостик между ненативными остатками цистеина в белке или между ненативными остатками цистеина двух мономеров белка.

[0069] В некоторых вариантах осуществления конструкции для генной терапии, представленные в данном документе, кодируют фермент, такой как фермент, характеризующийся генетическим дефектом у индивидуума с лизосомным нарушением накопления. В некоторых вариантах осуществления ферменты, кодируемые конструкциями для генной терапии, предусмотренными в данном документе, включают без ограничения альфа-галактозидазу А, β-глюкоцереброзидазу, глюкоцереброзидазу, лизосомную кислую липазу, гликозаминогликан-альфа-L-идуронидазу, альфа-L-идуронидазу, N-сульфоглюкозаминсульфогидролазу (SGSH), N-ацетил-альфа-глюкозаминидазу (NAGLU), идуронат-2-сульфатазу, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазу, гликозаминогликан-N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазу, альфа-глюкозидазу, трипептидилпептидазу 1 (TPP1), пальмитоилпротеинтиоэстеразы, белки, ассоциированные с развитием восковидного липофусциноза нейронов 1, восковидного

липофусциноза нейронов 2, восковидного липофусциноза нейронов 3, восковидного липофусциноза 4, восковидного липофусциноза нейронов 5, восковидного липофусциноза нейронов 6, восковидного липофусциноза нейронов 7, восковидного липофусциноза нейронов 8, восковидного липофусциноза нейронов 9, восковидного липофусциноза нейронов 10, восковидного липофусциноза нейронов 11, восковидного липофусциноза нейронов 12, восковидного липофусциноза нейронов 13, восковидного липофусциноза нейронов 14, восковидного липофусциноза нейронов 15, восковидного липофусциноза нейронов 16, и циклинзависимый киназоподобный белок 5.

Векторы для генной терапии и композиции

[0070] В данном документе предусмотрены векторы для генной терапии, содержащие конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую стабилизированную форму белка для лечения неврологического или генетического нарушения, при этом стабилизированная форма содержит один или несколько ненативных цистеиновых остатков, которые образуют дисульфидный мостик между ненативными остатками цистеина в белке или между ненативными остатками цистеина двух мономеров белка. В некоторых вариантах осуществления стабилизированная форма включает модифицированный полипептид α-GAL или модифицированный полипептид PPT-1.

[0071] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный полипептид, клонируют в несколько типов векторов. Например, в некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту клонируют в вектор, включающий без ограничения плазмиду, фагмиду, производное фага, вирус животного и космиду. Векторы, представляющие особый интерес, включают векторы экспрессии, векторы репликации, векторы генерации зондов и векторы секвенирования.

[0072] Дополнительно, вектор экспрессии, кодирующий модифицированный полипептид, доставляют 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), а также в других руководствах по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, которые применимы в качестве векторов, включают без ограничения ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса и лентивирусы. В целом, подходящий вектор содержит точку начала репликации, функционирующую в по меньшей мере одном организме, промоторную последовательность, удобные сайты для рестрикционных эндонуклеаз и один или несколько селектируемых маркеров (например, WO 01/96584; WO 01/29058; и патент США № 6326193).

[0073] В данном документе также предусмотрены композиции и системы для переноса генов. Для переноса генов в клетки млекопитающих был разработан ряд систем на основе вирусов. Например, ретровирусы обеспечивают удобную платформу для систем доставки генов. В некоторых вариантах осуществления выбранный ген вставляют в вектор и упаковывают в ретровирусные частицы с применением подходящих методик. Затем рекомбинантный вирус выделяют и доставляют в клетки субъекта in vivo или ex vivo. Для генной терапии подходящим является ряд ретровирусных систем. В некоторых вариантах осуществления применяют векторы на основе аденовируса. Для генной терапии подходящим является ряд векторов на основе аденовируса. В некоторых вариантах осуществления применяют векторы на основе аденоассоциированного вируса. Для генной терапии подходящим является ряд аденоассоциированных вирусов. В одном варианте осуществления применяют векторы на основе лентивируса.

[0074] Конструкции для генной терапии, предусмотренные в данном документе, содержат вектор (или вектор экспрессии для генной терапии), в который клонирован представляющий интерес ген, или иначе, который содержит представляющий интерес ген таким образом, что нуклеотидные последовательности вектора обеспечивают возможность экспрессии (конститутивной или иначе регулируемой некоторым образом) представляющего интерес гена. Предусмотренные в данном документе 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.

[0075] В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), что обусловлено способностью векторов на основе AAV преодолевать гематоэнцефалический барьер и осуществлять трансдукцию в нервной ткани. В способах, предусмотренных в данном документе, предполагается применение AAV любого серотипа. Серотип вирусного вектора, используемого в определенных вариантах осуществления, выбран из группы, состоящей из вектора на основе AAV1, вектора на основе AAV2, вектора на основе AAV3, вектора на основе AAV4, вектора на основе AAV5, вектора на основе AAV6, вектора на основе AAV7, вектора на основе AAV8, вектора на основе AAV9, вектора на основе AAVrhS, вектора на основе AAVrh10, вектора на основе AAVrh33, вектора на основе AAVrh34, вектора на основе AAVrh74, вектора на основе AAV Anc80, вектора на основе AAVPHP.B, вектора на основе AAVhu68, вектора на основе AAV-DJ и других, подходящих для генной терапии.

[0076] Векторы на основе AAV представляют собой ДНК-содержащие парвовирусы, непатогенные для млекопитающих. Вкратце, в векторах на основе AAV удаляют вирусные гены rep и cap, 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.

[0077] Дополнительные варианты осуществления предусматривают использование капсидов других серотипов с получением вектора на основе AAV1, вектора на основе AAV2, вектора на основе AAV3, вектора на основе AAV4, вектора на основе AAV5, вектора на основе AAV6, вектора на основе AAV7, вектора на основе AAV8, вектора на основе AAV9, вектора на основе AAVrhS, вектора на основе AAVrh10, вектора на основе AAVrh33, вектора на основе AAVrh34, вектора на основе AAVrh74, вектора на основе AAV Anc80, вектора на основе AAVPHP.B, вектора на основе AAV-DJ и других, подходящих для генной терапии. Необязательно, вирусный капсид AAV представляет собой вирусный капсид AAV2/9, AAV9, AAVrhS, AAVrh10, AAVAnc80 или AAV PHP.B.

[0078] Дополнительные элементы промотора, например энхансеры, регулируют частоту инициации транскрипции. Как правило, они расположены в области, расположенной на 30-110 п. о. выше стартового сайта, хотя было показано, что ряд промоторов также содержат функциональные элементы, расположенные ниже стартового сайта. Интервал между элементами промотора часто является гибким, так что функция промотора сохраняется, если элементы инвертируются или перемещаются относительно друг друга. В промоторе тимидинкиназы (tk) интервал между элементами промотора часто увеличивается до 50 п. о., прежде чем активность начинает снижаться. В зависимости от промотора, по-видимому, отдельные элементы функционируют либо совместно, либо независимо, для активации транскрипции.

[0079] Примером промотора, который способен обеспечить экспрессию трансгена, представляющего собой стабилизированный белок, такой как модифицированный полипептид α-GAL или модифицированный полипептид PPT-1, в Т-клетке млекопитающего, представляет собой промотор EF1a. Нативный промотор EF1a запускает экспрессию альфа-субъединицы комплекса фактора элонгации-1, который отвечает за ферментативную доставку аминоацил-тРНК к рибосоме. Промотор EF1a широко используется в плазмидах экспрессии млекопитающих, и было показано, что он эффективен в управлении экспрессией с трансгенов, клонированных в лентивирусный вектор (см., например, Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009)). Другим примером промотора является последовательность немедленно-раннего промотора

цитомегаловируса (CMV). Эта промоторная последовательность представляет собой сильную конститутивную промоторную последовательность, способную запускать высокие уровни экспрессии любой полинуклеотидной последовательности, функционально связанной с ней. Однако иногда также используют другие конститутивные промоторные последовательности, включая без ограничения ранний промотор вируса обезьян 40 (SV40), промотор вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотор длинного концевого повтора (LTR) вируса иммунодефицита человека (HIV), промотор MoMuLV, промотор вируса лейкемии птиц, немедленно-ранний промотор вируса Эпштейна-Барр, промотор вируса саркомы Рауса, а также промоторы генов человека, такие как без ограничения промотор актина, промотор миозина, промотор фактора элонгации-1a, промотор гемоглобина и промотор креатинкиназы. Дополнительно, не предполагается, что векторы для генной терапии ограничиваются использованием конститутивных промоторов. В данном документе также предполагаются индуцируемые промоторы. Использование индуцируемого промотора обеспечивает молекулярный переключатель, способный включить экспрессию полинуклеотидной последовательности, с которой он функционально связан, когда такая экспрессия необходима, или выключить экспрессию, когда экспрессия нежелательна. Примеры индуцируемых промоторов включают без ограничения металлотионин-индуцируемый промотор, глюкокортикоид-индуцируемый промотор, прогестерон-индуцируемый промотор и промотор, регулируемый тетрациклином. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор α-GAL.

[0080] Для оценки экспрессии модифицированного полипептида, вектор экспрессии, который предназначен для введения в клетку, часто содержит либо селективный маркерный ген, либо репортерный ген, либо оба, для облегчения идентификации и отбора экспрессирующих клеток из популяции клеток, подлежащих трансфекции, или инфицированных вирусными векторами. В других аспектах селективный маркер часто находится на отдельном участке ДНК и используется в процедуре котрансфекции. Как селективные маркеры, так и репортерные гены иногда фланкируют соответствующими регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии в клетках-хозяевах. Применимые селективные маркеры включают, например, гены устойчивости к антибиотикам, такие как neo и т. п.

[0081] Способы введения и экспрессии генов в клетке являются подходящими для описанных в данном документе способов. В контексте вектора экспрессии вектор легко вводится в клетку-хозяина, например, в клетку млекопитающих, бактерий, дрожжей или

насекомых, любым способом, известным в данной области техники. Например, вектор экспрессии переносят в клетку-хозяина с помощью физических, химических или биологических средств.

[0082] Физические способы введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают осаждение фосфатом кальция, липофекцию, бомбардировку частицами, микроинъекцию, генную пушку, электропорацию и тому подобное. Способы получения клеток, содержащих векторы и/или экзогенные нуклеиновые кислоты, являются подходящими для описанных в данном документе 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-хозяина является трансфекция с использованием фосфата кальция.

[0083] Химические средства для введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают коллоидные дисперсионные системы, такие как комплексы макромолекул, нанокапсулы, микросферы, гранулы-микроносители и системы на основе липидов, включая эмульсии масло-в-воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Иллюстративной 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 помощью направленных наночастиц или другой подходящей системы доставки субмикронного размера.

[0084] В случае использования системы доставки, отличной от вирусной, иллюстративным средством доставки является липосома. Предполагается использование липидных составов для введения нуклеиновых кислот в клетку-хозяина (in vitro, ex vivo или in vivo). В другом аспекте нуклеиновая кислота ассоциирована с липидом. Нуклеиновая кислота, ассоциированная с липидом, в некоторых вариантах осуществления, инкапсулирована во внутренней водной части липосомы, вкраплена в липидный бислой липосомы, присоединена к липосоме посредством присоединяющей молекулы, которая ассоциирована как с липосомой, так и с олигонуклеотидом, заключена в липосоме, находится в комплексе с липосомой, диспергирована в растворе, содержащем липид, смешана с липидом, комбинирована с липидом, содержится в липиде в виде суспензии, содержится в мицелле или находится в комплексе с мицеллой или иным образом ассоциирована с липидом. Композиции, ассоциированные с липидом, липидом/ДНК или липидом/вектором экспрессии, не ограничиваются какой-либо конкретной структурой в растворе. Например, в некоторых вариантах осуществления

липосомы присутствуют в виде двухслойной структуры, такой как мицеллы, или со "сжатой" структурой. В качестве альтернативы липосомы просто вкраплены в раствор, возможно, образуя агрегаты, которые не являются однородными по размеру или форме. Липиды представляют собой жирные вещества, которые в некоторых вариантах осуществления являются встречающимися в естественных условиях или синтетическими липидами. Например, липиды включают жирные капли, которые в естественных условиях встречаются в цитоплазме, а также класс соединений, содержащих длинноцепочечные алифатические углеводороды и их производные, такие как жирные кислоты, спирты, амины, аминоспирты и альдегиды.

[0085] 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 (Плейнвью, 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 смеси хлороформ/метанол часто хранят при температуре приблизительно -20°C. Хлороформ используется в качестве единственного растворителя, поскольку он испаряется легче, чем метанол. "Липосома" – это общий термин, охватывающий множество одно- и многослойных липидных сред-носителей, образующихся путем получения 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 самоперестройке перед образованием замкнутых структур и захватывают воду и растворенные вещества между липидными бислоями (Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505-10). Однако настоящим изобретением также охватываются композиции, которые обладают структурой в растворе, отличной от нормальной везикулярной структуры. Например, в некоторых вариантах осуществления липиды приобретают мицеллярную структуру или просто существуют в виде неоднородных агрегатов липидных молекул. Также предполагаются комплексы липофектамин-нуклеиновая кислота.

[0086] Независимо от способа, используемого для введения экзогенных нуклеиновых кислот в клетку-хозяина, или иного воздействия на клетку модифицированным полипептидом α-GAL, для подтверждения присутствия последовательности рекомбинантной ДНК в клетке-хозяине, предполагается проведение множества анализов. Такие анализы включают, например, "молекулярно-биологические" анализы, подходящие для описанных в данном документе способов, такие как саузерн- и нозерн-блоттинг, ОТ-ПЦР и ПЦР; "биохимические" анализы, такие как обнаружение присутствия или отсутствия конкретного пептида, например, иммунологическими методами (ELISA и вестерн-блоттинг) или анализами, описанными в данном документе, для идентификации средств, попадающих в объем, представленный в данном документе.

[0087] Настоящее изобретение дополнительно предусматривает вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую модифицированный полипептид. В одном аспекте вектор терапевтического слитого белка может быть напрямую трансдуцирован в клетку. В одном аспекте вектор представляет собой вектор клонирования или экспрессии, например вектор, включающий без ограничения одну или несколько плазмид (например, плазмиды экспрессии, векторы клонирования, миникольца, минивекторы, двойные микрохромосомы), ретровирусные и лентивирусные векторные конструкции. В одном аспекте вектор способен обеспечивать экспрессию конструкции модифицированного полипептида в клетках млекопитающих. В одном аспекте клетка млекопитающего представляет собой клетку человека.

Фармацевтические композиции

[0088] В данном документе предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие модифицированный полипептид, стабилизированную форму белка для лечения генетического нарушения, при этом стабилизированная форма содержит один или несколько ненативных цистеиновых остатков, которые образуют дисульфидный мостик между ненативными остатками цистеина внутри белка или между ненативными остатками цистеина двух мономеров белка и (ii) фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид образует гомодимер. В некоторых вариантах осуществления гомодимер стабилизирован дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид демонстрирует увеличенный период полужизни при pH 7,4 по сравнению с полипептидом дикого типа.

[0089] Дополнительно в данном документе предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие (i) модифицированный полипептид α-GAL, где

модифицированный полипептид α-GAL содержит цистеиновые замены в последовательности полипептида α-GAL, и (ii) фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. Предполагаемые замены включают: (i) D233C и I359C и (ii) M51C и G360C. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид α-GAL содержит цистеиновые замены D233C и I359C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид α-GAL содержит цистеиновые замены M51C и G360C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид α-GAL образует гомодимер. В некоторых вариантах осуществления гомодимер стабилизирован дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид α-GAL демонстрирует увеличенный период полужизни при pH 7,4 по сравнению с полипептидом α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит шаперон. В некоторых вариантах осуществления шаперон представляет собой мигаластат.

[0090] Дополнительно в данном документе предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие (i) модифицированный полипептид PPT-1, где модифицированный полипептид PPT-1 содержит цистеиновые замены в последовательности полипептида PPT-1, и (ii) фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. Предполагаемые замены включают A171C и A183C. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид PPT-1 образует гомодимер. В некоторых вариантах осуществления гомодимер стабилизирован дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид PPT-1 демонстрирует увеличенный период полужизни при pH 7,4 по сравнению с полипептидом PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит шаперон.

[0091] Подходящие вспомогательные вещества для фармацевтических композиций, представленных в данном документе, включают без ограничения солевой раствор, малеиновую кислоту, винную кислоту, молочную кислоту, лимонную кислоту, уксусную кислоту, бикарбонат натрия, фосфат натрия, гистидин, глицин, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция, хлорид цинка, воду, декстрозу, N-метилпирролидон, диметилсульфоксид, N,N-диметилацетамид, этанол, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, моноэтиловый эфир диэтиленгликоля и поверхностно-активное вещество, представляющее собой моноолеат полиоксиэтиленсорбитана.

[0092] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, представленные в данном документе, содержат модифицированные полипептиды α-GAL, представленные в данном документе, характеризующиеся увеличенным периодом полужизни при pH 4,6 по сравнению с полипептидом α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 4,6 является на по меньшей мере 50% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 4,6 является на по меньшей мере 150% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 4,6 является на по меньшей мере 200% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 4,6 является на по меньшей мере 250% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 4,6 является на по меньшей мере 300% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 4,6 является на по меньшей мере 350% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 4,6 является на по меньшей мере 400% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа.

[0093] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, представленные в данном документе, содержат модифицированные полипептиды PPT-1, представленные в данном документе, характеризующиеся увеличенным периодом полужизни при pH 4,6 по сравнению с полипептидом PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 4,6 является на по меньшей мере 50% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 4,6 является на по меньшей мере 150% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 4,6 является на по меньшей мере 200% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 4,6 является на по меньшей мере 250% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 4,6 является на по меньшей мере 300% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 4,6 является на по меньшей мере 350% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 4,6 является на по меньшей мере 400% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа.

[0094] В некоторых вариантах осуществления в данном документе фармацевтические композиции содержат модифицированные полипептиды α-GAL, характеризующиеся увеличенным периодом полужизни при pH 7,4. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 7,4 является на по меньшей мере 50% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 7,4 является на по меньшей мере 150% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 7,4 является на по меньшей мере 200% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 7,4 является на по меньшей мере 250% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 7,4 является на по меньшей мере 300% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 7,4 является на по меньшей мере 350% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 7,4 является на по меньшей мере 400% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 7,4 является на по меньшей мере 500% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 7,4 является на по меньшей мере 600% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 7,4 является на по меньшей мере 700% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 7,4 является на по меньшей мере 800% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 7,4 является на по меньшей мере 900% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 7,4 является на по меньшей мере 1000% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа.

[0095] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, представленные в данном документе, содержат модифицированные полипептиды PPT-1, характеризующиеся увеличенным периодом полужизни при pH 7,4. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 7,4 является на по меньшей мере 50% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 7,4 является на по меньшей мере 150% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период

полужизни при pH 7,4 является на по меньшей мере 200% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 7,4 является на по меньшей мере 250% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 7,4 является на по меньшей мере 300% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 7,4 является на по меньшей мере 350% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 7,4 является на по меньшей мере 400% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 7,4 является на по меньшей мере 500% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 7,4 является на по меньшей мере 600% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 7,4 является на по меньшей мере 700% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 7,4 является на по меньшей мере 800% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 7,4 является на по меньшей мере 900% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни при pH 7,4 является на по меньшей мере 1000% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа.

Способы лечения

Способы генной терапии

[0096] В данном документе также предусмотрены способы уменьшения интенсивности по меньшей мере одного симптома генетического заболевания у субъекта, нуждающегося в этом. Некоторые такие способы включают введение по меньшей мере одной дозы композиции, содержащей нуклеиновую кислоту для генной терапии, кодирующую стабилизированную форму белка для лечения генетического нарушения, при этом стабилизированная форма содержит один или несколько ненативных цистеиновых остатков, которые образуют дисульфидный мостик между ненативными остатками цистеина в белке или между ненативными остатками цистеина двух мономеров белка. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который образует гомодимер. В некоторых вариантах осуществления гомодимер стабилизирован дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота

кодирует полипептид, характеризующийся увеличенным период полужизни при pH 7,4 по сравнению с полипептидом дикого типа. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой конститутивный промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой тканеспецифический промотор. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит по меньшей мере часть таковой вируса. В некоторых вариантах осуществления вирус выбран исходя из того, что вирус включает ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, лентивирус или вирус герпеса. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота упакована внутри вирусного капсидного белка. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один симптом выбран из одного или нескольких из боли, изменения цвета кожи, неспособности к потоотделению, помутнения глаза, нарушения функции желудочно-кишечного тракта, шума в ушах, потери слуха, пролапса митрального клапана, заболевания сердца, боли в суставах, почечной недостаточности и нарушения функции почки. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один симптом уменьшается при однократном введении конструкции нуклеиновой кислоты для генной терапии. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает измерение активности в ткани, полученной от субъекта после лечения.

[0097] В некоторых вариантах осуществления вектор для генной терапии или фармацевтическую композицию вводят в спинномозговую жидкость. В некоторых вариантах осуществления вектор для генной терапии или фармацевтическую композицию доставляют посредством интратекальной, интрацеребровентрикулярной, интрапаренхимальной или внутривенной инъекции или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления вектор для генной терапии или фармацевтическую композицию вводят путем интратекальной инъекции. В некоторых вариантах осуществления вектор для генной терапии или фармацевтическую композицию вводят посредством внутривенной инъекции.

[0098] В некоторых вариантах осуществления генетическое нарушение представляет собой неврологическое расстройство. В некоторых вариантах осуществления генетическое нарушение представляет собой лизосомное нарушение накопления. В некоторых вариантах осуществления генетическое нарушение выбрано из группы, состоящей из аспартилглюкозаминурии, болезни Баттена, цистиноза, болезни Фабри, болезни Гоше типа I, болезни Гоше типа II, болезни Гоше типа III, болезни Помпе, болезни Тея-Сакса, болезни Сандхоффа, метахроматической лейкодистрофии, муколипидоза типа I, муколипидоза типа II, муколипидоза типа III, 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, тяжелого комбинированного иммунодефицита аденозиндезаминазы (ADA-SCID), хронической гранулематозной болезни (CGD), инфантильной, ювенильной и зрелой форм восковидного липофусциноза нейронов и болезни, связанной с дефицитом CDKL5.

[0099] В данном документе также предусмотрены способы уменьшения интенсивности по меньшей мере одного симптома болезни Фабри у субъекта, нуждающегося в этом. Некоторые такие способы включают введение по меньшей мере одной дозы композиции, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты для генной терапии, которая содержит по меньшей мере один промотор и нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный полипептид α-GAL, содержащий цистеиновые замены в последовательности полипептида α-GAL. Предполагается, что модифицированные полипептиды α-GAL содержат цистеиновые замены, включающие (i) R49C и G361C; (ii) R49C и G360C; (iii) D233C и I359C; (iv) M51C и G360C; и (v) S276C. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий цистеиновые замены в последовательности полипептида α-GAL, выбранные из группы, состоящей из (i) D233C и I359C и (ii) M51C и G360C. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий цистеиновые замены D233C и I359C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий цистеиновые замены M51C и G360C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который образует гомодимер. В некоторых вариантах осуществления гомодимер стабилизирован дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует модифицированный полипептид α-GAL, характеризующийся увеличенным периодом полужизни при pH 7,4 по сравнению с полипептидом α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой конститутивный промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой тканеспецифический промотор. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит по меньшей мере часть таковой вируса. В некоторых вариантах осуществления вирус выбран исходя из того, что вирус включает ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, лентивирус или вирус герпеса. В

некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота упакована внутри вирусного капсидного белка. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один симптом выбран из одного или нескольких из боли, изменения цвета кожи, неспособности к потоотделению, помутнения глаза, нарушения функции желудочно-кишечного тракта, шума в ушах, потери слуха, пролапса митрального клапана, заболевания сердца, боли в суставах, почечной недостаточности и нарушения функции почки. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один симптом уменьшается при однократном введении конструкции нуклеиновой кислоты для генной терапии. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает измерение активности α-GAL в ткани, полученной от субъекта после лечения. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение шаперона. В некоторых вариантах осуществления шаперон представляет собой мигаластат.

[00100] В данном документе также предусмотрены способы уменьшения интенсивности по меньшей мере одного симптома болезни CLN1 у субъекта, нуждающегося в этом. Некоторые такие способы включают введение по меньшей мере одной дозы композиции, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты для генной терапии, которая содержит по меньшей мере один промотор и нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный полипептид PPT-1, содержащий цистеиновые замены в последовательности полипептида PPT-1. Предполагается, что модифицированные полипептиды PPT-1 содержат цистеиновые замены, включая A171C и A183C. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который образует гомодимер. В некоторых вариантах осуществления гомодимер стабилизирован дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует модифицированный полипептид PPT-1, характеризующийся увеличенным периодом полужизни при pH 7,4 по сравнению с полипептидом PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой конститутивный промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой тканеспецифический промотор. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит по меньшей мере часть таковой вируса. В некоторых вариантах осуществления вирус выбран исходя из того, что вирус включает ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, лентивирус или вирус герпеса. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота упакована внутри вирусного капсидного белка. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один симптом выбран из одного или нескольких из боли, изменения цвета кожи, неспособности к потоотделению, помутнения глаза, нарушения функции желудочно-кишечного тракта,

шума в ушах, потери слуха, пролапса митрального клапана, заболевания сердца, боли в суставах, почечной недостаточности и нарушения функции почки. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один симптом уменьшается при однократном введении конструкции нуклеиновой кислоты для генной терапии. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает измерение активности PPT-1 в ткани, полученной от субъекта после лечения. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение шаперона. В некоторых вариантах осуществления шаперон представляет собой мигаластат.

[00101] В некоторых вариантах осуществления при лечении с помощью описанных в данном документе способов осуществляют доставку гена, кодирующего терапевтический белок, в клетку, для которой необходим данный терапевтический белок. В некоторых вариантах осуществления при лечении осуществляют доставку гена ко всем соматическим клеткам индивидуума. В некоторых вариантах осуществления лечение обеспечивает замену гена в клетках-мишенях. В некоторых вариантах осуществления индивидууму доставляют клетки, обработанные ex vivo с обеспечением экспрессии терапевтического белка.

[00102] В некоторых вариантах осуществления виды лечения на основе генной терапии, представленные в данном документе, включают введение нуклеиновой кислоты, кодирующей модифицированные полипептиды α-GAL, представленные в данном документе, характеризующиеся периодом полужизни внутри клетки, который увеличен в по меньшей мере приблизительно 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 раз по сравнению с периодом полужизни человеческого α-GAL дикого типа.

Способы заместительной ферментной терапии

[00103] Также предусмотрен способ уменьшения интенсивности по меньшей мере одного симптома генетического заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение по меньшей мере одной дозы композиции, содержащей стабилизированную форму белка для лечения генетического нарушения, где стабилизированная форма содержит один или несколько ненативных цистеиновых остатков, которые образуют дисульфидный мостик между ненативными остатками цистеина в белке или между ненативными остатками цистеина двух мономеров белка. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид образует гомодимер. В некоторых вариантах осуществления гомодимер стабилизирован дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид демонстрирует увеличенный период полужизни при pH 7,4 по сравнению с

полипептидом дикого типа. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один симптом выбран из одного или нескольких из психического нарушения, судорог, потери речи и потери моторных навыков. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение шаперона. В некоторых вариантах осуществления шаперон представляет собой мигаластат.

[00104] В некоторых вариантах осуществления композицию вводят путем интратекальной, интрацеребровентрикулярной, интрапаренхимальной, подкожной, внутримышечной, глазной, внутривенной инъекции или их комбинации.

[00105] В некоторых вариантах осуществления генетическое нарушение представляет собой неврологическое расстройство. В некоторых вариантах осуществления генетическое нарушение представляет собой лизосомное нарушение накопления. В некоторых вариантах осуществления генетическое нарушение выбрано из группы, состоящей из аспартилглюкозаминурии, болезни Баттена, цистиноза, болезни Фабри, болезни Гоше типа I, болезни Гоше типа II, болезни Гоше типа III, болезни Помпе, болезни Тея-Сакса, болезни Сандхоффа, метахроматической лейкодистрофии, муколипидоза типа I, муколипидоза типа II, муколипидоза типа III, 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, тяжелого комбинированного иммунодефицита аденозиндезаминазы (ADA-SCID), хронической гранулематозной болезни (CGD), инфантильной, ювенильной и зрелой форм восковидного липофусциноза нейронов и болезни, связанной с дефицитом CDKL5.

[00106] Также предусмотрен способ уменьшения интенсивности по меньшей мере одного симптома болезни Фабри у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение по меньшей мере одной дозы композиции, содержащей модифицированный полипептид α-GAL, где модифицированный полипептид α-GAL содержит цистеиновые замены в последовательности полипептида α-GAL. Предполагаемые цистеиновые замены включают (i) D233C и I359C и (ii) M51C и G360C. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид α-GAL предусматривает цистеиновые замены D233C и I359C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид α-GAL предусматривает цистеиновые замены M51C и G360C в последовательности полипептида α-GAL. В некоторых вариантах осуществления

модифицированный полипептид α-GAL образует гомодимер. В некоторых вариантах осуществления гомодимер стабилизирован дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид α-GAL демонстрирует увеличенный период полужизни при pH 7,4 по сравнению с полипептидом α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один симптом выбран из одного или нескольких из боли, изменения цвета кожи, неспособности к потоотделению, помутнения глаза, нарушения функции желудочно-кишечного тракта, шума в ушах, потери слуха, пролапса митрального клапана, заболевания сердца, боли в суставах, почечной недостаточности и нарушения функции почки. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение шаперона. В некоторых вариантах осуществления шаперон представляет собой мигаластат.

[00107] Также предусмотрен способ уменьшения интенсивности по меньшей мере одного симптома болезни CLN-1 у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение по меньшей мере одной дозы композиции, содержащей модифицированный полипептид PPT-1, где полипептид PPT-1 содержит один или несколько ненативных цистеиновых остатков, которые образуют дисульфидный мостик между ненативными остатками цистеина в белке или между ненативными остатками цистеина двух мономеров белка. Предполагаемые цистеиновые замены включают A171C и A183C. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид PPT-1 образует гомодимер. В некоторых вариантах осуществления гомодимер стабилизирован дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид PPT-1 демонстрирует увеличенный период полужизни при pH 7,4 по сравнению с полипептидом PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один симптом выбран из одного или нескольких из психического нарушения, судорог, потери речи и потери моторных навыков. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение шаперона. В некоторых вариантах осуществления шаперон представляет собой мигаластат.

[00108] В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в данном документе, включают введение модифицированных полипептидов, представленных в данном документе, характеризующихся увеличенным периодом полужизни по сравнению с полипептидом дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни является на по меньшей мере 50% большим, чем у полипептида дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни является на по меньшей мере 150% большим, чем у полипептида дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период

полужизни является на по меньшей мере 200% большим, чем у полипептида дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни является на по меньшей мере 250% большим, чем у полипептида дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни является на по меньшей мере 300% большим, чем у полипептида дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни является на по меньшей мере 350% большим, чем у полипептида дикого типа.

[00109] В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в данном документе, включают введение модифицированных полипептидов α-GAL, представленных в данном документе, характеризующихся увеличенным периодом полужизни по сравнению с полипептидом α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни является на по меньшей мере 50% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни является на по меньшей мере 150% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни является на по меньшей мере 200% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни является на по меньшей мере 250% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни является на по меньшей мере 300% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни является на по меньшей мере 350% большим, чем у полипептида α-GAL дикого типа.

[00110] В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в данном документе, включают введение модифицированных полипептидов PPT-1, представленных в данном документе, характеризующихся увеличенным периодом полужизни по сравнению с полипептидом PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни является на по меньшей мере 50% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни является на по меньшей мере 150% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни является на по меньшей мере 200% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни является на по меньшей мере 250% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни является на по меньшей мере 300% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления период полужизни является на по меньшей мере 350% большим, чем у полипептида PPT-1 дикого типа.

Определения

[00111] Термин "стабилизированный", применяемый в данном документе по отношению к белку, относится к модифицированному белку (например, модифицированному таким образом, чтобы он содержал ненативные цистеиновые остатки), который сохраняет один или несколько видов своей биологической активности в течение периода времени, более длительного, чем соответствующий белок без модификации. В некоторых вариантах осуществления стабилизированные белки сохраняют биологическую активность в течение периода времени, который является на приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% , 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450% или 500% более продолжительным, чем у соответствующего белка без модификации. В некоторых вариантах осуществления стабилизированные белки сохраняют биологическую активность в течение периода времени, который является на по меньшей мере 10% более продолжительным, на по меньшей мере 20% более продолжительным, на по меньшей мере 30% более продолжительным, на по меньшей мере 40% более продолжительным, на по меньшей мере 50% более продолжительным, на по меньшей мере 60% более продолжительным, на по меньшей мере 70% более продолжительным, на по меньшей мере 80% более продолжительным, на по меньшей мере 90% более продолжительным, на по меньшей мере 100% более продолжительным, на по меньшей мере 150% более продолжительным, на по меньшей мере 200% более продолжительным, на по меньшей мере 250% более продолжительным, на по меньшей мере 300% более продолжительным, на по меньшей мере 350% более продолжительным, на по меньшей мере 400% более продолжительным, на по меньшей мере 450% более продолжительным, на по меньшей мере 500% более продолжительным, чем у соответствующего белка без модификации. В некоторых вариантах осуществления стабилизированный белок характеризуется более длительным периодом полужизни по сравнению с соответствующим белком без ненативных остатков цистеина. В некоторых вариантах осуществления стабилизированный белок характеризуется более длительным периодом полужизни при pH 4,0 - 8,0, или pH 4,0 - 6,0, или pH 6,0 - 8,0 по сравнению с соответствующим белком без ненативных остатков цистеина. В некоторых вариантах осуществления стабилизированный белок характеризуется более длительным периодом полужизни при pH 4,5 - 5,0 или 7,0 - 7,5 по сравнению с соответствующим белком без ненативных остатков цистеина. В некоторых вариантах осуществления стабилизированный белок характеризуется более длительным периодом полужизни при pH 7,4 по сравнению с

соответствующим белком без ненативных остатков цистеина. В некоторых вариантах осуществления стабилизированный белок характеризуется более длительным периодом полужизни при pH 4,6 по сравнению с соответствующим белком без ненативных остатков цистеина.

[00112] Применяемый в данном документе термин "генная терапия ex vivo" относится к способам, при которых клетки пациента генетически модифицируют вне организма субъекта, например, с обеспечением экспрессии терапевтического гена. Затем клетки с новой генетической информацией возвращают субъекту, от которого они были получены.

[00113] Применяемый в данном документе термин "генная терапия in vivo" относится к способам, при которых вектор, несущий терапевтический ген(гены), непосредственно вводят субъекту.

[00114] Применяемые в данном документе термины "слитый белок" и "терапевтический слитый белок" используются в данном описании взаимозаменяемо и относятся к терапевтическому белку, обладающему по меньшей мере одним дополнительным белком, пептидом или полипептидом, присоединенным к нему. В некоторых случаях слитые белки представляют собой одну белковую молекулу, содержащую два или более белков или их фрагментов, ковалентно соединенных пептидной связью в пределах их соответствующих пептидных цепей, без химических линкеров. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит терапевтический белок и сигнальный пептид, пептид, обеспечивающий увеличение уровня эндоцитоза слитого белка, или и то, и другое. В некоторых вариантах осуществления пептид, обеспечивающий увеличение уровня эндоцитоза, представляет собой пептид, который связывает CI-MPR.

[00115] Применяемый в данном документе термин "плазмида" относится к кольцевой двухцепочечной единице ДНК, которая реплицируется в клетке независимо от хромосомной ДНК.

[00116] Применяемый в данном документе термин "промотор" относится к сайту на ДНК, с которым связывается фермент РНК-полимераза и инициирует транскрипцию ДНК в РНК.

[00117] Применяемый в данном документе термин "соматическая терапия" относится к способам, при которых манипулирование экспрессией генов в клетках будет корректировать состояние пациента, но не наследоваться следующим поколением. Соматические клетки включают все клетки организма человека, отличные от репродуктивных.

[00118] Применяемый в данном документе термин "соматические клетки" относится ко всем клеткам организма, кроме репродуктивных клеток.

[00119] Применяемый в данном документе термин "тропизм" относится к предпочтению определенного типа клеток или ткани вектором, таким как вирус. Различные факторы определяют способность вектора инфицировать конкретную клетку. Вирусы, например, должны связываться со специфическими рецепторами клеточной поверхности, чтобы проникнуть в клетку. Вирусы, как правило, не способны инфицировать клетку, если она не экспрессирует необходимые рецепторы.

[00120] Применяемые в данном документе термины "вектор" или "вектор для генной терапии", используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к средам-носителям или носителям для доставки в генной терапии, с помощью которых доставляют терапевтические гены в клетки. Вектор для генной терапии представляет собой любой вектор, пригодный для использования в генной терапии, например любой вектор, подходящий для терапевтической доставки полимеров нуклеиновой кислоты (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 являться вектором любого типа, например, он может являться плазмидным вектором или миникольцевой ДНК. Как правило, вектор представляет собой вирусный вектор. К ним относятся как генетически поврежденные вирусы, такие как аденовирус, так и невирусные векторы, такие как липосомы. Вирусный вектор можно получить, например, из аденоассоциированного вируса (AAV), ретровируса, лентивируса, вируса простого герпеса или аденовируса. Векторы, полученные из AAV. Вектор может содержать геном AAV или его производное.

[00121] Применяемый в данном документе 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.

[00122] Термин "трансдукция" используется для обозначения введения/доставки нуклеиновой кислоты, кодирующей терапевтический белок, в клетку-мишень *in vivo* или *in vitro* посредством дефектного по репликации rAAV по настоящему изобретению, что приводит к экспрессии функционального полипептида клеткой-реципиентом. Трансдукция клеток вектором для генной терапии, таким как rAAV по настоящему

изобретению, приводит к устойчивой экспрессии полипептида или РНК, кодируемых rAAV. Таким образом, настоящее изобретение предусматривает способы введения/доставки субъекту вектора для генной терапии, такого как rAAV, кодирующего терапевтический белок, интратекальным, интраретинальным, внутриглазным, интравитреальным, интрацеребровентрикулярным, интрапарехимальным или внутривенным путем или любой их комбинацией. "Интратекальная" доставка относится к доставке в пространство под паутинной оболочкой головного мозга или спинного мозга. В некоторых вариантах осуществления интратекальное введение осуществляют путем интрацистернального введения.

[00123] Термины "реципиент", "индивидуум", "субъект", "хозяин" и "пациент" используются в данном документе взаимозаменяемо и в некоторых случаях относятся к любому субъекту-млекопитающему, которому необходимы постановка диагноза, лечение или терапия, в частности к людям. Термин "млекопитающее" в контексте лечения относится к любому животному, классифицируемому как млекопитающее, включая людей, одомашненных 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.

[00124] Применяемые в данном документе термины "лечение", "проведение лечения", "уменьшение интенсивности симптома" и т. п. в некоторых случаях относятся к введению средства 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 или клинически значимым образом. Термин "уменьшать интенсивность" или "проводить лечение" не указывает и не подразумевает излечение от основного состояния. Применяемые в данном документе термины "лечение" или "уменьшить интенсивность" (и т. п.) могут включать лечение млекопитающего, в частности человека, и включают: (a) предотвращение возникновения нарушения или симптома нарушения у субъекта, который может быть предрасположен к нарушению, но у которого еще не диагностировали наличие нарушения (например, включая нарушения, которые могут быть связаны с первичным нарушением или быть вызваны им; (b) подавление нарушения, т. е. остановка его развития; (c) облегчение нарушения, т. е. обусловливание регресса нарушения; и (d) обеспечение улучшения в отношении по меньшей мере одного симптома нарушения. Проведение лечения может относиться к любым признакам успеха в лечении, уменьшения

интенсивности или предотвращения нарушения, включая любой объективный или субъективный параметр, такой как ослабление выраженности; ремиссия; уменьшение выраженности симптомов или повышение переносимости состояния нарушения для пациента; замедление скорости дегенерации или ухудшения; или уменьшение изнурительности конечной точки ухудшения. Лечение или уменьшение интенсивности симптомов основано на одном или нескольких объективных или субъективных параметрах; в том числе результатах осмотра врачом. Соответственно, термин "проведение лечения" включает введение соединений или средств по настоящему изобретению для предотвращения или задержки, облегчения, или остановки, или подавления развития симптомов или состояний, ассоциированных с нарушением. Термин "терапевтический эффект" относится к уменьшению, устранению или предотвращению нарушения, симптомов нарушения или побочных эффектов нарушения у субъекта.

[00125] Термин "аффинность" относится к силе связывания между молекулой и ее партнером по связыванию или рецептором.

[00126] Применяемая в данном документе фраза "высокая аффинность" относится, например, к терапевтическому слитому продукту, содержащему такой пептид, который связывает CI-MPR, который обладает аффинностью к CI-MPR, которая является в приблизительно 100-1000 раз или в 500-1000 раз выше, чем таковая у терапевтического белка без пептида. В некоторых вариантах осуществления аффинность является в по меньшей мере 100, в по меньшей мере 500 или в по меньшей мере 1000 раз выше, чем без пептида. Например, если терапевтический белок и CI-MPR объединяют в относительно равных концентрациях, пептид с высокой аффинностью будет связываться с доступным CI-MPR с обеспечением смещения равновесия в сторону высокой концентрации получаемого в результате комплекса.

[00127] Применяемый в данном документе термин "секреция" относится к высвобождению белка из клетки, например, в кровоток, для переноса в представляющую интерес ткань или в место приложения действия терапевтического белка. Если продукт для генной терапии секретируется в интерстициальное пространство органа, секреция может обеспечить возможность перекрестной коррекции соседних клеток.

[00128] Применяемый в данном документе термин "доставка" означает доставку лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления процесс доставки означает транспортировку лекарственного вещества (например, терапевтического белка или слитого белка, полученного с использованием вектора для генной терапии) за

пределы клетки (например, крови, ткани или интерстициального пространства) в клетку-мишень для проявления терапевтической активности лекарственного вещества.

[00129] Применяемый в данном документе термин "инженерия" или "белковая инженерия" относится к манипулированию структурами белка путем получения соответствующей последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, с получением требуемых свойств или синтезу белка с определенными структурами.

[00130] "Терапевтически эффективное количество" в некоторых случаях означает количество, которое при введении субъекту для лечения заболевания является достаточным для эффективного лечения этого заболевания.

[00131] Применяемый в данном документе термин "приблизительно" в отношении числа относится к диапазону от значения на 10% меньшего, чем это число, до значения на 10% большего, чем это число, и включая значения внутри диапазона, такие как само число.

[00132] Применяемый в данном документе термин "включающий" элемент или элементы в формуле изобретения относится к этим элементам, но не препятствует включению дополнительного элемента или элементов.

ПРИМЕРЫ

[00133] Следующие ниже примеры приведены с целью иллюстрации различных вариантов осуществления изобретения и не предназначены для ограничения настоящего изобретения каким-либо образом. Настоящие примеры вместе со способами, описанными в данном документе, в настоящее время представляют предпочтительные варианты осуществления, являются иллюстративными и не предназначены для ограничения объема изобретения. При этом изменения и другие варианты применения, которые охвачены сущностью изобретения, определенной объемом формулы изобретения, будут очевидны специалистам в данной области техники.

Пример 1. Идентификация аминокислотных остатков для цистеиновой замены в α-GAL дикого типа

[00134] Кристаллическую структуру димеризованной α-GAL (PDB ID 3HG3) исследовали для поиска потенциальных сайтов для замещения цистеиновыми остатками, образующими дополнительные дисульфидные связи для повышения стабильности (**фиг. 1A**). Для анализа использовали NAMD с силовыми полями CHARMM. На основании анализа мутантные варианты с цистеиновыми заменами, показанные в таблице 8, получали с использованием стандартных способов направленного мутагенеза.

Таблица 8. Мутантные варианты с	
Мутации	**SEQ ID NO**
R49C - G361C	2
R49C – G360C	3
M51C – G360C	4
D233C – I359C	5
S276C	6

[00135] См. также **фиг. 1B**. Аминокислотные последовательности представлены в таблице 1.

Пример 2. Димеризация и ферментативная активность модифицированной α-GAL

[00136] Образование димеров модифицированной α-GAL с дисульфидной связью исследовали в лизате клеток и культуральной среде (**фиг. 2A**). Клоны каждой конструкции α-GAL временно экспрессировали в клетке 293HEK. Лизаты клеток и культуральные среды подвергали электрофорезу в SDS-PAGE с градиентом 4-12% и переносили на нитроцеллюлозу. α-GAL обнаруживали с помощью вестерн-блоттинга, применяя моноклональные антитела к α-GAL кролика 1:2000 (abcam ab168341).

[00137] Восстановленные и невосстановленные образцы подвергали электрофорезу и вестерн-блоттингу. Как видно на фиг. 2, версии M51C-G360C и D233C-I359C α-GAL легко образовывали димеры α-GAL с дисульфидной связью.

[00138] Для получения образцов собирали 1x 10^6 клеток с временной экспрессией конструкций α-GAL. Клетки лизировали в 500 мкл 20 мМ натрий-фосфатного буфера, pH 6,5, 0,25% TX-100. Лизат клеток центрифугировали в течение 2 мин. при 10000 g и надосадочную жидкость переносили в новую пробирку. 40 мкл лизата клеток или культуральной среды переносили в новую пробирку и добавляли 16 мкл буфера для образцов LDS 4X с 6 мкл 10X восстанавливающего средства (для условий с восстановлением). Смесь образцов, полученную, как указано ниже, нагревали при 95°C в течение 5 минут. Для электрофореза использовали подвижный буфер 1x MOPS SDS.

[00139] Для проверки ферментативной активности лизат или культуральную среду инкубировали с субстратом, представляющим собой 4-метилумбеллиферон-α-D-галактопиранозид (4-MUG), в течение 1 часа. Затем ферментативную реакцию останавливали и измеряли ферментативную активность α-GAL с помощью флуоресценции при возбуждении при 360 нм и излучении при 450 нм. Как показано на **фиг. 2B**, оба дисульфидных мутанта α-GAL M51C-G360C и D233C-I359C были ферментативно активными. Поскольку удельную активность и количество α-GAL в

каждом образце не определяли количественно, на фиг. 2B не показано количественное сравнение активности между диким типом и мутантными версиями α-GAL.

Пример 3. Анализ стабильности модифицированной α-GAL в кислой среде с течением времени

[00140] Для проверки стабильности при различных значениях pH в течение 24 часов временно экспрессируемый мутантный вариант α-GAL и α-GAL дикого типа улавливали с применением аффинной адсорбции с использованием агарозы с конканавалином A (ConA) в соответствии со стандартными способами. Элюат с ConA разбавляли либо буфером с pH 4,6, либо буфером с pH 7,4. Образцы предварительно инкубировали при pH 4,6 или 7,4 в течение 0, 0,5, 1, 2, 4, 5 и 24 часов.

[00141] Для измерения активности фермента к каждому образцу добавляли буфер с pH 4,6 и проверяли его активность на субстрате 4-MUG. Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Реакцию останавливали добавлением 125 мкл останавливающего буфера (0,4 M глицин-NaOH, pH 10,8). Флуоресценцию считывали с помощью планшет-ридера Spectramax: Возб.: 360 нм, Излуч.: 450 нм. Результаты показаны на **фиг. 3A**.

[00142] *Для тестирования долговременной стабильности* временно экспрессируемые модифицированные α-GAL и α-GAL дикого типа выделяли из культуральной среды, обогащали и очищали с использованием агарозных гранул с ConA, как описано выше. Элюированную α-GAL инкубировали при pH 4,6 или pH 7,4 для экспериментов по изменению стабильности с течением времени. Моменты времени включали 0 ч., 0,5 ч., 1 ч., 2 ч., 4 ч., 5 ч., 24 ч., 2 дня, 5 дней, 6 дней и 7 дней. На **фиг. 3B** продемонстрировано, что α-GAL M51C-G360C более стабильна в течение 7 дней, чем контроль дикого типа при pH 4,6. Обе модифицированные α-GAL были значительно более стабильными, чем контроль дикого типа при pH 7,4 в течение 7 дней.

Пример 4. Захват α-GAL и ферментативный анализ с помощью фибробластов пациента с болезнью Фабри

Протокол захвата клеток

[00143] Для проведения анализа захвата в день 1 высевали 300000 фибробластов пациента с болезнью Фабри (R301Q) на лунку в 6-луночные планшеты. В день 2 среду заменяли на 1,8 мл среды для захвата и инкубировали в течение 1 часа при 37°C с 5% CO2. К клеткам добавляли дозу, составляющую 200 мкл 250 нМ фермента (фабразим, M51C-G360C, D233C-I359C и WT), полученного в среде для захвата, в 6-луночный планшет, полученный на этапе 2, в течение 16-18 часов. В день 3 добавляли 300 мкл 1 M Tris и

инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Добавляли 400 мкл 1 M NaH2SO4 и перемешивали. Планшеты с клетками дважды промывали с помощью 1 мл DPBS. В каждую лунку добавляли 500 мкл воды и клетки собирали с планшета. Matric-green добавляли перед замораживанием при -80°C в морозильной камере до анализа. Перед анализами ферментов и белков планшеты центрифугировали.

[00144] Анализ белка проводили путем добавления 20 мкл лизата клеток в 130 мкл воды. Добавляли 150 мкл рабочего реагента BCA и инкубировали при 37°C в течение 2 часов. Затем планшет считывали на Spectramax.

[00145] Ферментный анализ проводили путем добавления 5 мкл лизата клеток в 15 мкл аналитического буфера с последующим добавлением 50 мкл субстрата 4-MUG. Инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Добавляли 125 мкл останавливающего буфера и считывали на Spectramax.

[00146] В качестве контроля замороженные лизаты клеток размораживали при комнатной температуре и обрабатывали ультразвуком в течение 5 мин. 50 мкл переносили в силанизированные стеклянные пробирки объемом 13 мл. Добавляли 25 мкл глюкопсихозина (IS) (конц. 125 нг/мл). Добавляли 1 мл метанола и смесь обрабатывали ультразвуком в течение примерно 10 мин. Добавляли 500 мкл 1 н. HCl, перемешивали вихревым способом, затем обрабатывали ультразвуком в течение примерно 10 минут. Затем смесь встряхивали в течение примерно 30 минут при комнатной температуре. Образцы центрифугировали при 4000 об./мин. в течение 10 мин. при комнатной температуре. Надосадочную жидкость переносили на предварительно подготовленные картриджи SPE.

[00147] Образцы в виде твердого вещества получали путем кондиционирования картриджей SPE с помощью 1 мл метанола и 1 мл воды Millipore. Образцы загружали на картриджи SPE. Картриджи промывали с помощью 2 мл 0,1 н. HCl, а затем 2 мл MEOH. Образцы элюировали с помощью 2 мл 5% гидроксида аммония в метаноле в чистую силанизированную стеклянную емкость. Образцы выпаривали в атмосфере азота досуха при 40°C. К каждому экстракту добавляли 25 мкл DMSO и перемешивали вихревым способом. Добавляли 125 мкл (175 мкл использовали для анализа 03) подвижной фазы B и перемешивали вихревым способом. Образцы переносили в стеклянные флаконы. 10 мкл вводили в аналитическую колонку.

[00148] Фибробласты пациентов с болезнью Фабри культивировали и высевали в 6-луночные планшеты. Клетки, обработанные α-GAL дикого типа, использовали в качестве положительного контроля для захвата и последующих ферментативных исследований.

Фибробласты инкубировали в течение 16-18 ч. с α-GAL дикого типа, α-GAL M51C-G360C или α-GAL D233C-I359C. Затем клетки лизировали для ферментативного анализа α-GAL, что определяли по данным флуоресценции. На **фиг. 4A** показано, что как α-GAL M51C-G360C, так и α-GAL D233C-I359C были способны восстанавливать ферментативную активность α-GAL по меньшей мере так же хорошо, как α-GAL дикого типа. См. **фиг. 4B.** Глоботриаозилсфингозин (lyso-Gb3) является биомаркером болезни Фабри. Успешное лечение болезни Фабри приводит к значительному снижению уровня lyso-Gb3, что устанавливают с помощью LC-MS/MS.

Пример 5. Захват вариантов гомодимеров фибробластами пациента с болезнью Фабри FB-14 (R301Q)

[00149] Клетки фибробластов пациента с болезнью Фабри высевали в 6-луночный планшет для исследований захвата фабразима и α-GAL клетками. Клетки инкубировали в течение 16 ч. при 37°C в инкубаторе с 5% CO2 в среде для захвата, содержащей 7 нМ либо фабразима, либо α-GAL дикого типа, либо α-GAL M51C-G360C, либо α-GAL D233C-I359C. В день 1 клетки промывали и дополнительно выдерживали в обычной питательной среде в течение еще 5 дней. Клетки собирали в моменты времени, указанные на **фиг. 5**. Лизаты клеток использовали для определения активности фермента. Активность фермента α-GAL определяли и нормализовали по концентрации белка в лизате клеток, выраженной в виде нмоль/мг белка/ч. Установили, что варианты гомодимеров характеризуются в 2-3 раза более длительным периодом полужизни внутри клетки после захвата клеткой, чем дикий тип, и в 3-4 раза более длительным, чем фабразим (**фиг. 5**).

Пример 6. Генная терапия болезни Фабри на мышиной модели

[00150] Векторы на основе AAV разводили в стерильном PBS. Векторы на основе AAV включали: AAVhu68.CB7.hGLAnatural.rBG, AAVhu68.CB7.hGLAco.rBG и AAVhu68.CB7.hGLA-M51C-G360Cco.rBG.

[00151] *Получение вектора*

[00152] Для эталонной последовательности GLA и варианта с заменой метионина цистеином в положении 51 и заменой глицина цистеином в положении 360 осуществляли обратную трансляцию и нуклеотидную последовательность оптимизировали по кодонам с созданием цис-плазмиды для получения AAV с кассетой экспрессии под промотором CB7. Дополнительно заказали кДНК природной hGLA (эталонная последовательность) и клонировали в тот же AAV-цис-каркас для сравнения с оптимизированной по кодонам последовательностью. Векторы AAVhu68 получали и титровали, как описано ранее (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). Вкратце, клетки HEK293 подвергали тройной трансфекции, и надосадочную жидкость культуры собирали, концентрировали и очищали с помощью градиента йодиксанола. Очищенные векторы титровали с помощью цифровой капельной ПЦР с использованием праймеров, направленно взаимодействующих с последовательностью поли(A) бета-глобина кролика, как описано ранее (Lock M, R. Alvira, S. J. Chen and J. M. Wilson, "Absolute determination of single-stranded and self-complementary adeno-associated viral vector genome titers by droplet digital PCR." Hum Gene Ther Methods 25(2): 115-125 (2014)).

[00153] *Животные*

[00154] *Mus musculus,* мышей с болезнью Фабри с нокаутом Gla в фоновом генотипе основателей C57BL/6/129 приобрели в Jackson Labs (линия №003535 – также известная как "мыши α-Gal A KO"). Размножающуюся колонию поддерживали в центре содержания мышей барьерного типа, аккредитованном AAALAC, в рамках программы генной терапии, используя спаривание гетерозиготных животных для получения нулевых и WT-контролей в одних пометах. Мышь с нокаутом Gla представляет собой широко используемую модель болезни Фабри.

[00155] Мыши выглядят нормальными с клинической точки зрения, но у них наблюдается прогрессирующее накопление субстрата GLA, представляющего собой глоботриаозилсфингозин (также известный как lyso-GB3), в плазме крови и глоботриаозилцерамида (также известного как GL3, GB3) в печени, сердце, почках, коже, тонком и толстом кишечнике и центральной нервной системе. Небольшой размер, воспроизводимый фенотип и эффективное разведение позволяют проводить быстрые исследования, оптимальные для доклинических исследований кандидатов in vivo.

[00156] В помещениях для содержания животных поддерживали температуру в диапазоне 64-79°F (18-26°C) с диапазоном влажности 30-70%. Животных содержали вместе с их родителями и однопометниками до отъема, а затем в стандартной клетке по 2-5 животных на клетку в виварии лаборатории трансляционных исследований (TRL) GTP. Клетки, бутылки с водой и субстрат для подстилки обрабатывают в автоклаве в центре содержания барьерного типа. Поддерживали автоматически контролируемый 12-часовой цикл свет/темнота. Каждый период темноты начинался в 19:00 (± 30 минут). Питание обеспечивали ad libitum (Purina, LabDiet®, 5053, Irradiated, PicoLab®, Rodent Diet 20, 25lb). Для всех животных был обеспечен доступ к воде ad libitum с помощью индивидуально размещенных бутылок с водой в каждой клетке.

[00157] *Исследования in vivo и гистология*

[00158] Мышам вводили $5x10^{11}$ копий генома (примерно $2,5x10^{13}$ копий генома/кг) AAVhu68.CB7.hGLA (различные конструкции hGLA) в 0,1 мл через боковую хвостовую вену, у них отбирали кровь в день 7 и день 21 после введения вектора для выделения сыворотки крови и в заключение отбирали кровь (для выделения плазмы крови) и умерщвляли обескровливанием через 28 дней после инъекции. Ткани немедленно собирали, начиная с головного мозга.

[00159] Ткани для гистологии фиксировали формалином и заливали парафином, используя стандартные способы. Спинной мозг с DRG (в кости) фиксировали в ZF, декальцинировали в EDTA и обрабатывали в соответствии со стандартными процедурами GTP Morphology Core. Цинк-формалин применяют для обеспечения хорошей сохранности тканей и применяли для окрашивания накопления Gb3 с помощью IHC и для исследования морфологии (H&E).

[00160] Иммуноокрашивание на GL3 проводили на фиксированных формалином образцах, залитых парафином. Срезы депарафинизировали, блокировали с помощью 1% сыворотки крови осла в PBS + 0,2% Triton в течение 15 мин., а затем последовательно инкубировали с первичными (Amsbio AMS.A2506, моноклональные антитела к Gb3) и биотинилированными вторичными антителами, разведенными в блокирующем буфере; колориметрическую реакцию на основе HRP применяли для обнаружения сигнала. Анализ слайдов осуществлялся в слепом режиме сертифицированным ветеринарным патологом.

[00161] Контрольные группы мышей -/- с болезнью Фабри, получавшая в качестве среды-носителя PBS, демонстрировала существенные уровень накопления GL3 (темное окрашивание на срезах, окрашенных с помощью IHC). Мыши WT и все мыши, обработанные вектором, почти полностью или полностью освободились от накопления GL3 (**фиг. 6**).

[00162] *Активность GLA*

[00163] Плазму крови или надосадочную жидкость гомогенизированных тканей смешивали с 6 мМ 4-MU-α-галактопиранозида, pH 4,6, 90 мМ GalNAc, и инкубировали в течение трех часов при 37°C. Реакцию останавливали с помощью 0,4 М глицина, pH 10,8. Измерение в относительных единицах флуоресценции, RFU, осуществляли с использованием флуориметра Victor3, с возб. при 355 нм и излучением при 460 нм. Активность в единицах нмоль/мл/ч. рассчитывали путем интерполяции стандартной кривой 4-MU. Уровни активности в отдельных образцах ткани нормализовали по общему содержанию белка в надосадочной жидкости гомогената. Для образцов плазмы крови используют равные объемы.

[00164] Мыши -/- с болезнью Фабри демонстрировали полное отсутствие активности α-Gal A. Обработка мышей с болезнью Фабри вектором AAVhu68.CB7.hGLA-M51C-G360Cco.rBG GTx приводила к повышению активности GLA в почке более чем в 7 раз по сравнению с диким типом (**фиг. 7**).

[00165] *Количественное определение глоботриаозилцерамида (также известного как GL3, GB3) с помощью LC-MS/MS*

[00166] Субстрат GLA, GL3, в гомогенате ткани определяли количественно с помощью анализа LC-MS/MS. Вкратце, к образцам гомогената (50 мкл) добавляли внутренний стандарт, и образцы обрабатывали с использованием твердофазной экстракции на основе C18 (SPE). Стандартную кривую строили для известных концентраций GL3 (от 8,83 нМ до 4,41 мкМ) из исходных растворов, содержащих двенадцать форм церамидов. Отслеживаемые ответы от всех двенадцати изоформ подлежали суммированию, и в этом анализе получали значение отношения к внутреннему стандарту. Затем полученные отношения для исследуемых образцов сравнивали с полученной кривой для количественного определения GL3.

[00167] Мыши -/- с болезнью Фабри демонстрировали более чем 10-кратное накопление субстрата GLA, представляющего собой глоботриаозилцерамид (GL3). Обработка мышей с болезнью Фабри вектором AAVhu68.CB7.hGLA-M51C-G360Cco.rBG GTx приводила к полному снижению уровня GL3 в почке до уровня дикого типа (**фиг. 8**).

[00168] *Количественное определение глоботриаозилсфингозина (также известного как lyso-GB3) с помощью LC-MS/MS*

[00169] Субстрат GLA, lyso-GB3, в плазме крови определяют количественно с помощью анализа LC-MS/MS. Вкратце, стабильный внутренний стандарт, меченный C13, добавляют к образцам плазмы крови (50 мкл) и образцы обрабатывают с использованием C18/катионообменного смешанного режима твердофазной экстракции (SPE). Стандартную кривую получают для известных концентраций lyso-GB3 (от 0,254 нМ до 254 нМ), а затем сравнивают ответ для lyso-GB3 в исследуемых образцах с полученной кривой для количественного определения lyso-GB3.

[00170] *Сигнатурный пептид GLA по данным LC/MS*

[00171] Плазму крови осаждают в 100% метаноле и центрифугируют. Надосадочные жидкости удаляют. В осадок добавляют стабильный меченый изотопом пептид, уникальный для hGLA, в качестве внутреннего стандарта, ресуспендируют с трипсином и инкубируют при 37°C в течение двух часов. Расщепление останавливают с помощью 10% муравьиной кислоты. Пептиды разделяют с помощью хроматографии с обращенной фазой

C-18 и идентифицируют и количественно определяют с помощью масс-спектроскопии с использованием ESI. Общую концентрацию GLA в плазме крови рассчитывают по концентрации сигнатурного пептида.

[00172] *Анализ связывания рецептора клеточной поверхности*

[00173] 96-луночный планшет покрывают рецептором, промывают и блокируют с использованием BSA. Кондиционированную среду для культивирования CHO или плазму крови, обладающую равной активностью либо rhGLA, либо сконструированной GLA, подвергают серийному разведению в три раза с получением серии из девяти убывающих концентраций и инкубируют с совместно связанным рецептором. После инкубации планшет промывают для удаления не связавшихся GLA и 4-MU-α-галактопиранозида, добавленных на один час при 37°C. Реакцию останавливают с помощью 1,0 M глицина, pH 10,5, и считывают RFU с помощью флуориметра Spectramax; возб. при 370, излучение при 460. RFU для каждого образца преобразовывают в активность в нмоль/мл/ч путем интерполяции стандартной кривой 4-MU. Нелинейную регрессию выполняют с помощью GraphPad Prism.

Пример 7. Стабилизированные конструкции PPT-1

[00174] Стабилизированную конструкцию PPT-1 конструировали на основе кристаллической структуры (PDB ID 3GRO). Предполагается, что эти два остатка цистеина образуют дисульфидную связь, которая стабилизирует структуру и, как было обнаружено, продлевает период полужизни ферментативной функциональной единицы (см. данные ниже). Было обнаружено, что уровень экспрессии данной конструкции в HEG 293 близок к уровню экспрессии PPT-1 дикого типа.

[00175] *Повышенная стабильность и период полужизни фермента PPT-1*

[00176] Внутримолекулярный дисульфидный мостик сконструировали в PPT-1 для стабилизации фермента, что определяли путем измерения периода полужизни активного фермента. Подвергшиеся мутации остатки A171C/A183C были выбраны, поскольку эквивалентные остатки в гомологичном белке PPT-2 образуют дисульфидный мостик. Данную естественную вариацию в гомологичном белке использовали для разработки PPT-1.

[00177] *Испытание стабильности конструкции PPT-1*

[00178] Конструкцию PPT-1 временно экспрессировали в клетках HEK 293T и кондиционированную среду брали для анализа через пять дней после трансфекции. То же выполнили для PPT1 дикого типа. Анализы активности ферментов проводили на обоих наборах кондиционированных сред в течение 48 или 72 часов. Количество

ферментативной активности, сохраняющейся с течением времени, определяли для сравнения мутантного варианта с двойной цистеиновой заменой с WT. (**Фиг. 9**).

[00179] Период полужизни оценивали двумя способами, представляющими альфа- и бета-фазы, так как активность, по-видимому, характеризуется двухфазным выведением (см. логарифмический график рядом с таблицей данных PK ниже). Период полужизни альфа оценивали во время ранней терминальной фазы или фазы распределения, период полужизни бета оценивали во время терминальной фазы выведения. При анализах общего белка GAA ATB200 часто указывается альфа-фаза, поскольку она более значима для демонстрации эффекта AT2221 на связывание и стабилизацию ATB200 в крови во время распределения в ткани.

[00180] Фармакокинетика для конструкции PPT-1 приведена, включая C_0 и AUC. $AUC_{бесконечность}$ получили из той же константы скорости выведения, которую использовали для оценки периода полужизни бета**.**

Таблица. 9. Фармакокинетика PPT-1 (среднее по 5 дням)

Конструкция	**C_0**	**AUC_{0-t}**	**$AUC_{0-\infty}$**	**$t_{½\alpha}$**	**$t_{½\beta}$**
Дикий тип	1,46	15,9	21,0	1,7	23,1
Цис-мутант	3,40	65,6	80,3	2,8	28,2

[00181] В то время, как в данном документе были показаны и описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, специалистам 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 техники без отступления от настоящего изобретения. Следует понимать, что можно использовать различные альтернативы описанным в данном документе вариантам осуществления. Предполагается, что нижеследующая формула изобретения определяет объем настоящего изобретения и что способы и структуры в рамках данной формулы изобретения и их эквиваленты охвачены ею.

ОПУБЛИКОВАННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вектор для генной терапии, содержащий конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую стабилизированную форму белка для лечения генетического нарушения, при этом стабилизированная форма содержит один или несколько ненативных цистеиновых остатков, которые образуют дисульфидный мостик между ненативными остатками цистеина в белке или между ненативными остатками цистеина двух мономеров белка.

2. Вектор для генной терапии по п. 1, где белок выбран из группы, состоящей из альфа-галактозидазы A, β-глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидазы, лизосомной кислой липазы, гликозаминогликан-альфа-L-идуронидазы, альфа-L-идуронидазы, N-сульфоглюкозаминсульфогидролазы (SGSH), N-ацетил-альфа-глюкозаминидазы (NAGLU), идуронат-2-сульфатазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, гликозаминогликан-N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы, альфа-глюкозидазы, трипептидилпептидазы 1 (TPP1), пальмитоилпротеинтиоэстераз (PPT), белков, ассоциированных с развитием восковидного липофусциноза нейронов 4, восковидного липофусциноза нейронов 10 (катепсин D), восковидного липофусциноза нейронов 11 (програнулин), восковидного липофусциноза нейронов 13 (катепсин F), восковидного липофусциноза нейронов 14 (KCTD7), восковидного липофусциноза нейронов 15 (TBCK), и циклинзависимого киназоподобного белка 5.

3. Вектор для генной терапии по п. 1, где стабилизированный белок предусматривает лизосомный фермент.

4. Вектор для генной терапии по п. 1, где стабилизированный белок предусматривает стабилизированный белок α-галактозидазу (α-GAL).

5. Вектор для генной терапии по п. 4, где стабилизированный белок α-галактозидаза A (α-GAL) содержит один или несколько ненативных цистеиновых остатков, выбранных из группы, состоящей из (i) D233C и I359C и (ii) M51C и G360C.

6. Вектор для генной терапии по п. 1, где стабилизированный белок предусматривает стабилизированную пальмитоилпротеинтиоэстеразу 1 (PPT1).

7. Вектор для генной терапии по п. 6, где стабилизированный белок PPT1 содержит ненативные цистеиновые остатки A171C и A183C.

8. Вектор для генной терапии по любому из пп. 1-7, где стабилизированный белок характеризуется более длительным периодом полужизни при pH 7,4 по сравнению с соответствующим белком без ненативных остатков цистеина.

9. Вектор для генной терапии по п. 1, где стабилизированный белок может заменять белок, являющийся дефектным или дефицитным при определенном генетическом нарушении.

10. Вектор для генной терапии по п. 1, где стабилизированный белок может обеспечивать уменьшение выраженности или замедление развития одного или нескольких симптомов, ассоциированных с генетическим нарушением.

11. Вектор для генной терапии по п. 1, где стабилизированный белок является более эффективным в отношении уменьшения выраженности или замедления развития одного или нескольких симптомов генетического нарушения по сравнению с нестабилизированным белком.

12. Вектор для генной терапии по п. 1, где генетическое нарушение представляет собой неврологическое расстройство.

13. Вектор для генной терапии по п. 1, где генетическое нарушение представляет собой лизосомное нарушение накопления.

14. Вектор для генной терапии по п. 1, где генетическое нарушение выбрано из группы, состоящей из аспартилглюкозаминурии, болезни Баттена, цистиноза, болезни Фабри, болезни Гоше типа I, болезни Гоше типа II, болезни Гоше типа III, болезни Помпе, болезни Тея-Сакса, болезни Сандхоффа, метахроматической лейкодистрофии, муколипидоза типа I, муколипидоза типа II, муколипидоза типа III, 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, тяжелого комбинированного иммунодефицита аденозиндезаминазы (ADA-SCID), хронической гранулематозной болезни (CGD), инфантильной, ювенильной и зрелой форм восковидного липофусциноза нейронов и болезни, связанной с дефицитом CDKL5.

15. Вектор для генной терапии по п. 1, где вектор для генной терапии представляет собой вирусный вектор, выбранный из группы, состоящей из вектора на основе аденовируса, вектора на основе аденоассоциированного вируса, вектора на основе ретровируса, вектора на основе лентивируса и вектора на основе вируса герпеса.

16. Вектор для генной терапии по п. 1, где конструкция нуклеиновой кислоты включена в геном вирусного вектора.

17. Вектор для генной терапии по п. 16, где геном вирусного вектора предусматривает геном рекомбинантного AAV (rAAV).

18. Вектор для генной терапии по п. 16, где геном rAAV предусматривает самокомплементарный геном.

19. Вектор для генной терапии по п. 16, где геном rAAV предусматривает одноцепочечный геном.

20. Вектор для генной терапии по п. 16, где геном rAAV содержит первый инвертированный концевой повтор и второй инвертированный концевой повтор.

21. Вектор для генной терапии по п. 20, где инвертированные концевые повторы AAV представляют собой инвертированные концевые повторы AAV2.

22. Вектор для генной терапии по п. 16, где геном rAAV дополнительно содержит интрон SV40.

23. Вектор для генной терапии по п. 16, где геном rAAV дополнительно содержит последовательность полиаденилирования.

24. Вектор для генной терапии по п. 16, где конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок α-GAL, при этом последовательность нуклеиновой кислоты является на по меньшей мере 85% идентичной одной из последовательностей под SEQ ID NO: 7-12.

25. Вектор для генной терапии по п. 16, где конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок α-GAL, при этом последовательность нуклеиновой кислоты предусматривает последовательность под одним из SEQ ID NO: 8-12.

26. Вектор для генной терапии по п. 16, где конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок PPT1, при этом последовательность нуклеиновой кислоты является на по меньшей мере 85% идентичной одной из последовательностей под SEQ ID NO: 15-16.

27. Вектор для генной терапии по п. 16, где конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок PPT1, при этом последовательность нуклеиновой кислоты предусматривает последовательность под SEQ ID NO: 16.

28. Вектор для генной терапии по п. 16, где конструкция дополнительно содержит промоторную последовательность.

29. Вектор для генной терапии по п. 28, где промотор представляет собой конститутивный промотор.

30. Вектор для генной терапии по п. 28, где промотор представляет собой тканеспецифический промотор.

31. Вектор для генной терапии по п. 16, где конструкция дополнительно содержит одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты, выбранных из группы, состоящей из последовательности Козак, IRES CrPV, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей линкер, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей сигнальную последовательность, и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид IGF2.

32. Вектор для генной терапии по п. 1, где конструкция упакована в вирусный капсид.

33. Фармацевтическая композиция, содержащая вектор для генной терапии по любому из пп. 1-32 и фармацевтически приемлемые вспомогательное вещество, носитель или разбавитель.

34. Фармацевтическая композиция по п. 33, где вспомогательное вещество выбрано из группы, состоящей из солевого раствора, малеиновой кислоты, винной кислоты, молочной кислоты, лимонной кислоты, уксусной кислоты, бикарбоната натрия, фосфата натрия, гистидина, глицина, хлорида натрия, хлорида калия, хлорида кальция, хлорида цинка, воды, декстрозы, N-метилпирролидона, диметилсульфоксида, N,N-

диметилацетамида, этанола, пропиленгликоля, полиэтиленгликоля, моноэтилового эфира диэтиленгликоля и поверхностно-активного вещества, представляющего собой моноолеат полиоксиэтиленсорбитана.

35. Способ лечения генетического нарушения у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества вектора для генной терапии по любому из пп. 1-43 или фармацевтической композиции по любому из пп. 33-34 субъекту, нуждающемуся в этом.

36. Способ по п. 35, где вектор для генной терапии или фармацевтическую композицию доставляют посредством интратекальной, интрацеребровентрикулярной, интрапаренхимальной или внутривенной инъекции или их комбинации.

37. Способ по п. 35, где вектор для генной терапии или фармацевтическая композиция обеспечивают уменьшение выраженности или замедление развития одного или нескольких симптомов генетического нарушения у субъекта.

38. Способ по п. 35, где генетическое нарушение представляет собой лизосомное нарушение накопления.

39. Способ по п. 35, где генетическое нарушение выбрано из группы, состоящей из аспартилглюкозаминурии, болезни Баттена, цистиноза, болезни Фабри, болезни Гоше типа I, болезни Гоше типа II, болезни Гоше типа III, болезни Помпе, болезни Тея-Сакса, болезни Сандхоффа, метахроматической лейкодистрофии, муколипидоза типа I, муколипидоза типа II, муколипидоза типа III, 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, тяжелого комбинированного иммунодефицита аденозиндезаминазы (ADA-SCID), хронической гранулематозной болезни (CGD), восковидного липофусциноза нейронов и нарушения, связанного с дефицитом CDKL5.

40. Стабилизированный димер α-галактозидазы A (α-GAL) человека, содержащий один или несколько ненативных цистеиновых остатков, где один или несколько ненативных цистеиновых остатков образуют по меньшей мере одну межмолекулярную

дисульфидную связь, соединяющую первую субъединицу и вторую субъединицу димера α-GAL.

41. Стабилизированный димер α-GAL человека по п. 40, где один или несколько ненативных цистеиновых остатков выбраны из группы, состоящей из (i) D233C и I359C и (ii) M51C и G360C.

42. Стабилизированный димер α-GAL человека по п. 40 или п. 41, где один или несколько ненативных цистеиновых остатков предусматривают D233C и I359C.

43. Стабилизированный димер α-GAL человека по любому из пп. 40-42, где один или несколько ненативных цистеиновых остатков предусматривают M51C и G360C.

44. Стабилизированный димер α-GAL человека по любому из пп. 40-43, где один или несколько ненативных цистеиновых остатков предусматривают i) D233C и I359C и (ii) M51C и G360C.

45. Стабилизированный димер α-GAL человека по любому из пп. 40-44, где полипептид характеризуется последовательностью, которая на по меньшей мере 90% идентична одной из последовательностей под SEQ ID NO: 1-6.

46. Стабилизированный димер α-GAL человека по любому из пп. 40-45, где полипептид кодируется нуклеиновой кислотой, которая на по меньшей мере 85% идентична одной из последовательностей под SEQ ID NO: 7-12.

47. Стабилизированный димер α-GAL человека по любому из пп. 40-46, где полипептид демонстрирует увеличенный период полужизни при pH 7,4 по сравнению с полипептидом α-GAL дикого типа.

48. Стабилизированный димер α-GAL человека по любому из пп. 40-47, где полипептид дополнительно содержит вариант пептида IGF2 (vIGF2).

49. Фармацевтическая композиция, содержащая стабилизированный димер α-GAL человека по любому из пп. 40-48 и фармацевтически приемлемые вспомогательное вещество, носитель или разбавитель.

50. Фармацевтическая композиция по п. 49, где вспомогательное вещество выбрано из группы, состоящей из солевого раствора, малеиновой кислоты, винной кислоты,

молочной кислоты, лимонной кислоты, уксусной кислоты, бикарбоната натрия, фосфата натрия, гистидина, глицина, хлорида натрия, хлорида калия, хлорида кальция, хлорида цинка, воды, декстрозы, N-метилпирролидона, диметилсульфоксида, N,N-диметилацетамида, этанола, пропиленгликоля, полиэтиленгликоля, моноэтилового эфира диэтиленгликоля и поверхностно-активного вещества, представляющего собой моноолеат полиоксиэтиленсорбитана.

51. Способ лечения болезни Фабри у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества стабилизированного димера α-GAL человека по любому из пп. 40-48 или фармацевтической композиции по любому из пп. 49-50 субъекту, нуждающемуся в этом.

52. Способ по п. 51, где стабилизированный димер α-GAL человека или фармацевтическую композицию доставляют посредством интратекальной, интрацереброventрикулярной, интрапаренхимальной, подкожной, внутримышечной, глазной, внутривенной инъекции или их комбинации.

53. Способ по п. 51, где стабилизированный димер α-GAL человека или фармацевтическая композиция обеспечивают уменьшение выраженности или замедление развития одного или нескольких симптомов болезни Фабри у субъекта.

54. Стабилизированная молекула пальмитоилпротеинтиоэстеразы 1 (PPT1) человека, содержащая один или несколько ненативных цистеиновых остатков, где один или несколько ненативных цистеиновых остатков образуют по меньшей мере одну внутримолекулярную дисульфидную связь в молекуле PPT1.

55. Стабилизированный белок PPT1 по п. 54, содержащий ненативные цистеиновые остатки A171C и A183C.

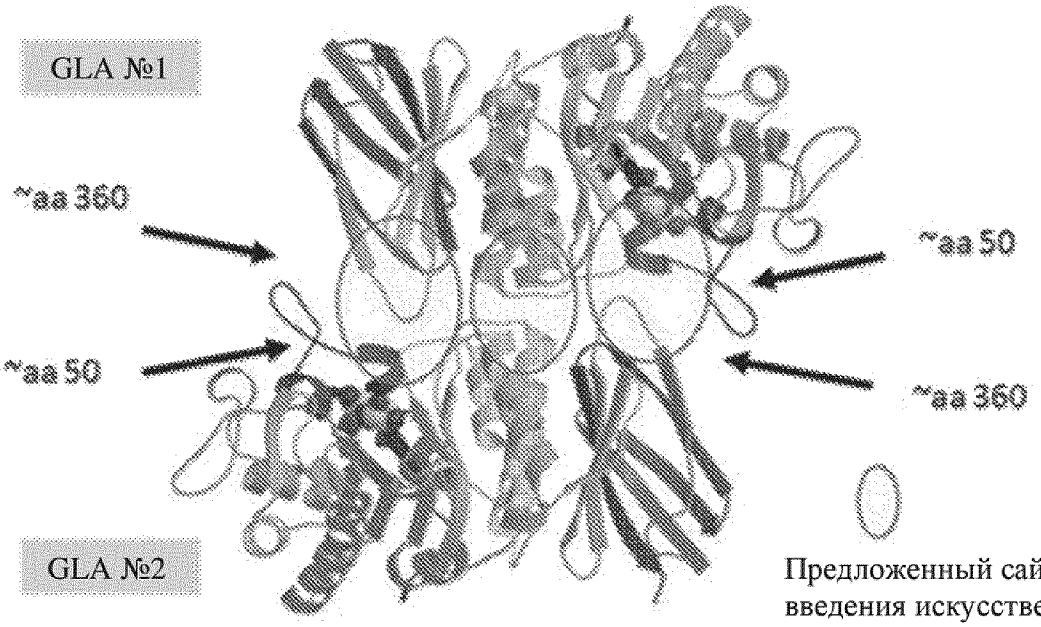
56. Фармацевтическая композиция, содержащая стабилизированный PPT1 человека по любому из пп. 54-55 и фармацевтически приемлемые вспомогательное вещество, носитель или разбавитель.

57. Фармацевтическая композиция по п. 56, где вспомогательное вещество выбрано из группы, состоящей из солевого раствора, малеиновой кислоты, винной кислоты, молочной кислоты, лимонной кислоты, уксусной кислоты, бикарбоната натрия, фосфата натрия, гистидина, глицина, хлорида натрия, хлорида калия, хлорида кальция,

хлорида цинка, воды, декстрозы, N-метилпирролидона, диметилсульфоксида, N,N-диметилацетамида, этанола, пропиленгликоля, полиэтиленгликоля, моноэтилового эфира диэтиленгликоля и поверхностно-активного вещества, представляющего собой моноолеат полиоксиэтиленсорбитана.

58. Способ лечения болезни CLN1 у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества стабилизированного PPT1 человека по любому из пп. 54-55 или фармацевтической композиции по любому из пп. 56-57 субъекту, нуждающемуся в этом.

59. Способ по п. 58, где модифицированный PPT1 человека или фармацевтическую композицию доставляют путем интратекальной, интрацеребровентрикулярной, интрапаренхимальной, подкожной, внутримышечной, глазной, внутривенной инъекции или их комбинации.



ФИГ. 1A

Фермент 1 – фермент 2

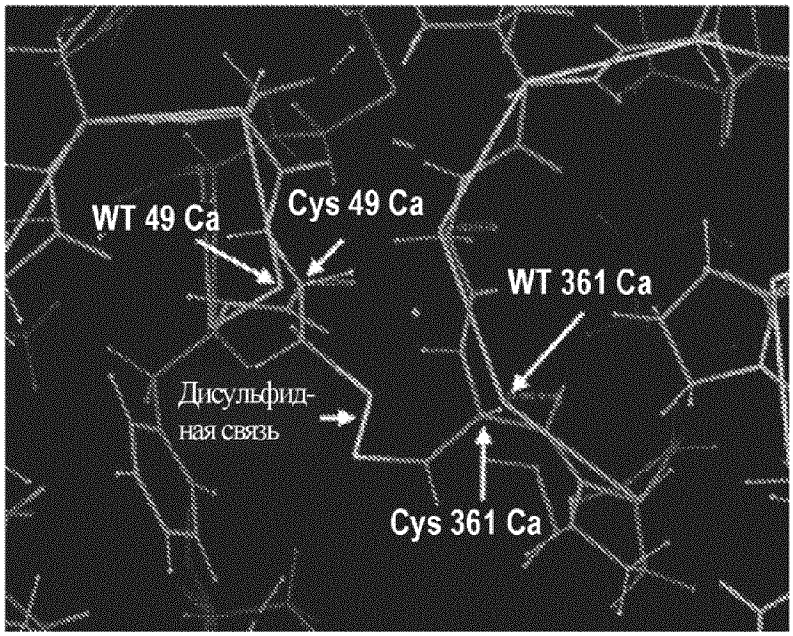
1) R**49**C – G**361**C

2) R**49**C – G**360**C

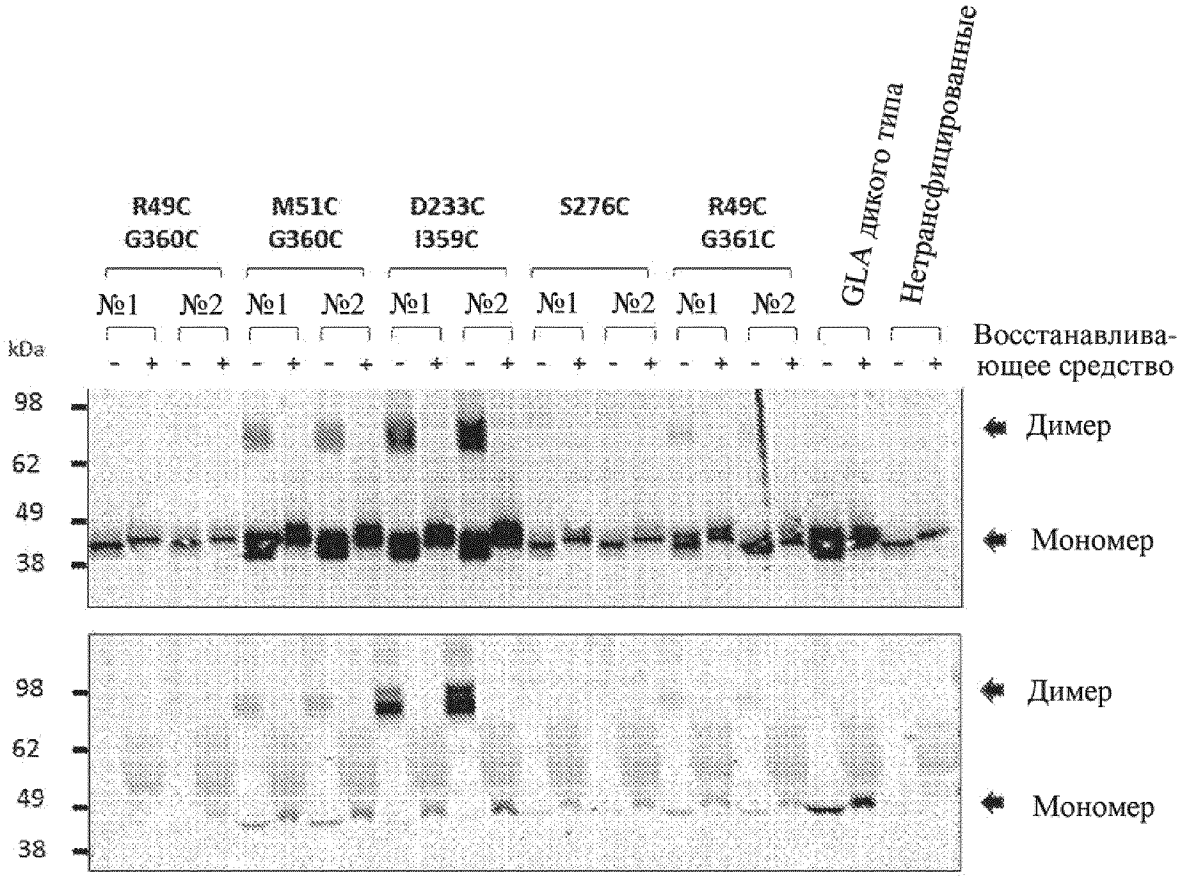
3) D**233**C – I**359**C

4) M**51**C – G**360**C

5) S**276**C – S**276**C



ФИГ. 1B


R49C G360C
M51C G360C
D233C I359C
S276C
R49C G361C
GLA дикого типа
Нетрансфицированные
№1 №2 №1 №2 №1 №2 №1 №2 №1 №2
kDa
- + - + - + - + - + - + - + - + - + - + - +
Восстанавливающее средство
98
62
49
38
Димер
Мономер
98
62
49
38
Димер
Мономер

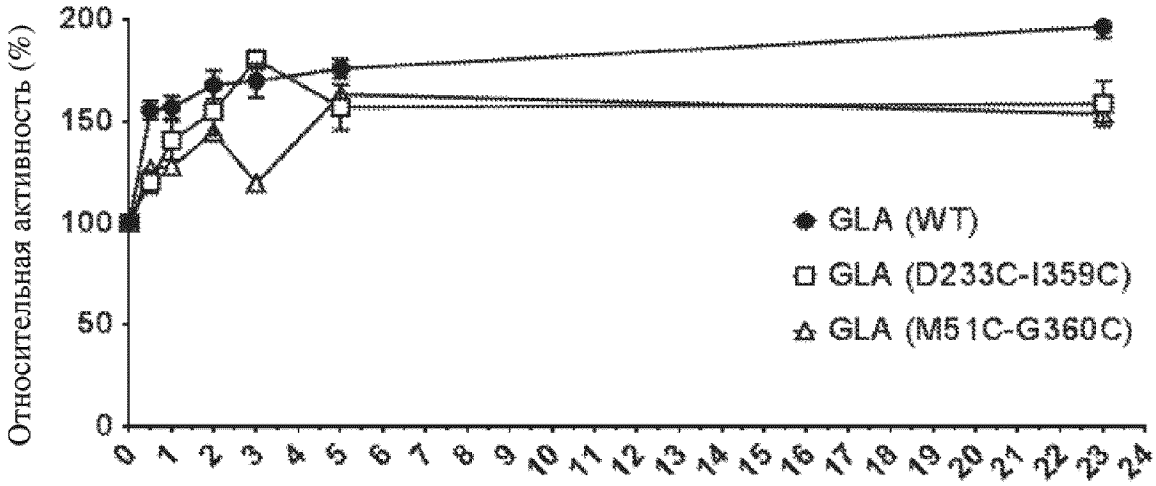
ФИГ. 2А

Активность конструкции, содержащей GLA с C-C, в лизате клеток
нм/мг белка/ч.
25000
20000
15000
10000
5000
0
R49C-G360C-1
R49C-G360C-2
M51C-G360C-1
M51C-G360C-2
D233C-I359C-1
D233C-I359C-2
S276C-S276C-1
S276C-S276C-2
R49C-G361C-1
R49C-G361C-2
GLA (WT)
Нетрансфици-рованные
Конструкции, содержащие GLA

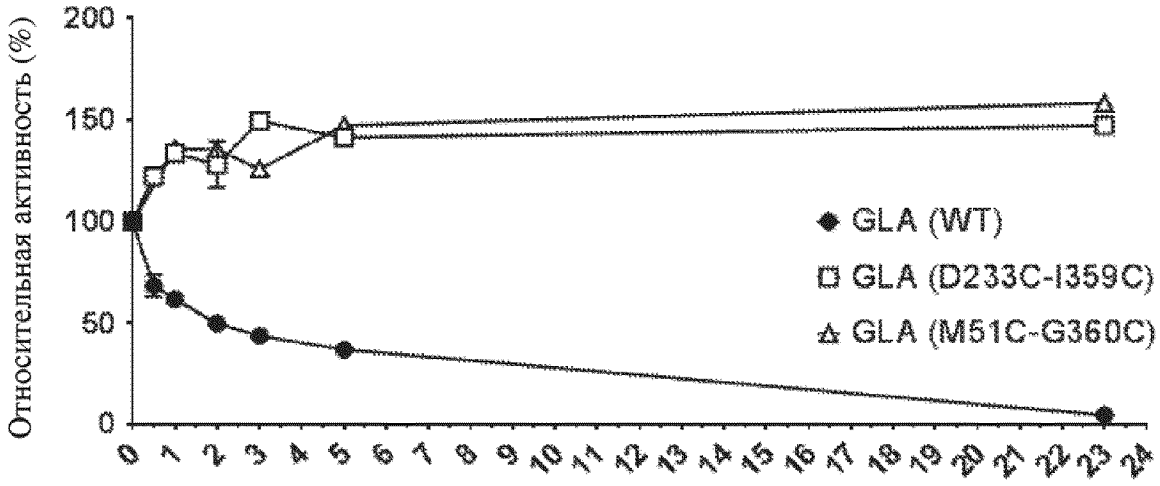
Активность конструкции, содержащей GLA с C-C, в культуральной среде
Необработанные данные флюоресценции, импульсы
250000
200000
150000
100000
50000
0
R49C-G360C-1
R49C-G360C-2
M51C-G360C-1
M51C-G360C-2
D233C-I359C-1
D233C-I359C-2
S276C-S276C-1
S276C-S276C-2
R49C-G361C-1
R49C-G361C-2
GLA (WT)
Нетрансфици-рованные
Конструкции, содержащие GLA

ФИГ. 2B

pH 4,6

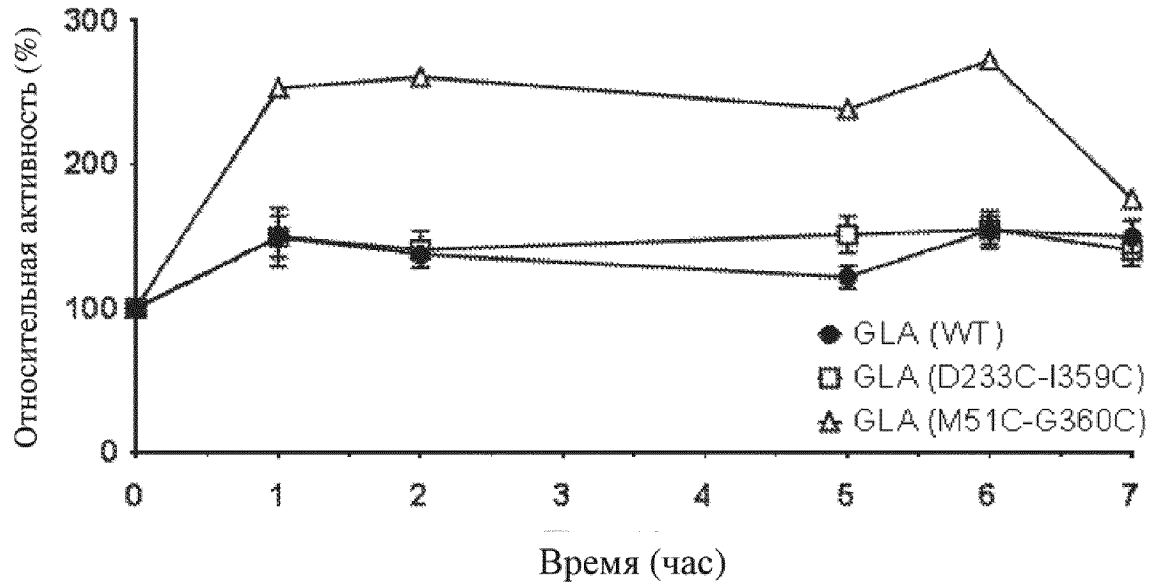


pH 7,4

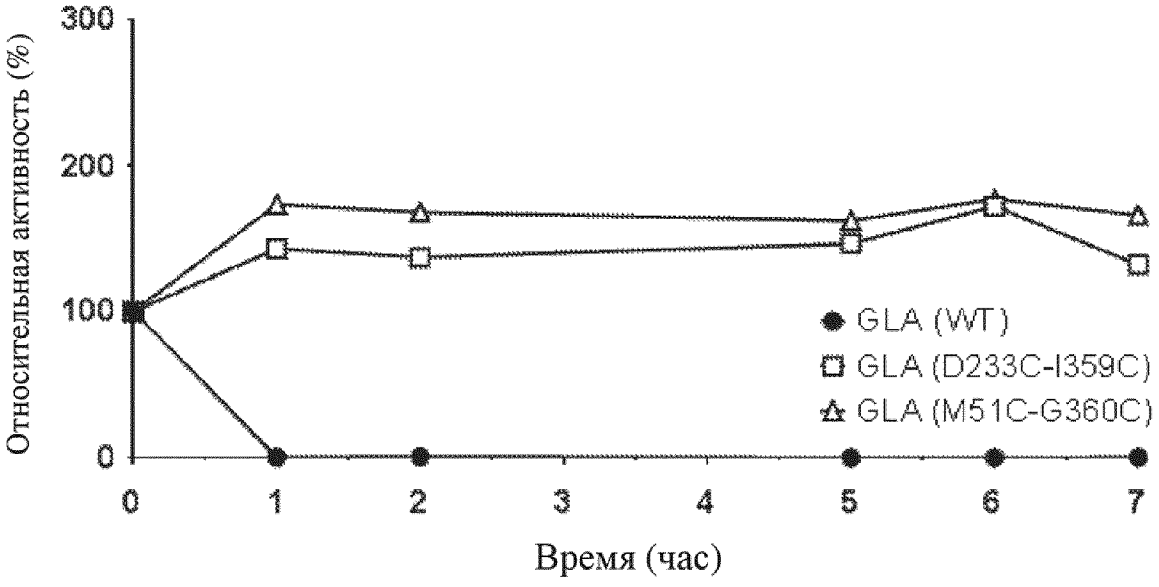


ФИГ. 3А

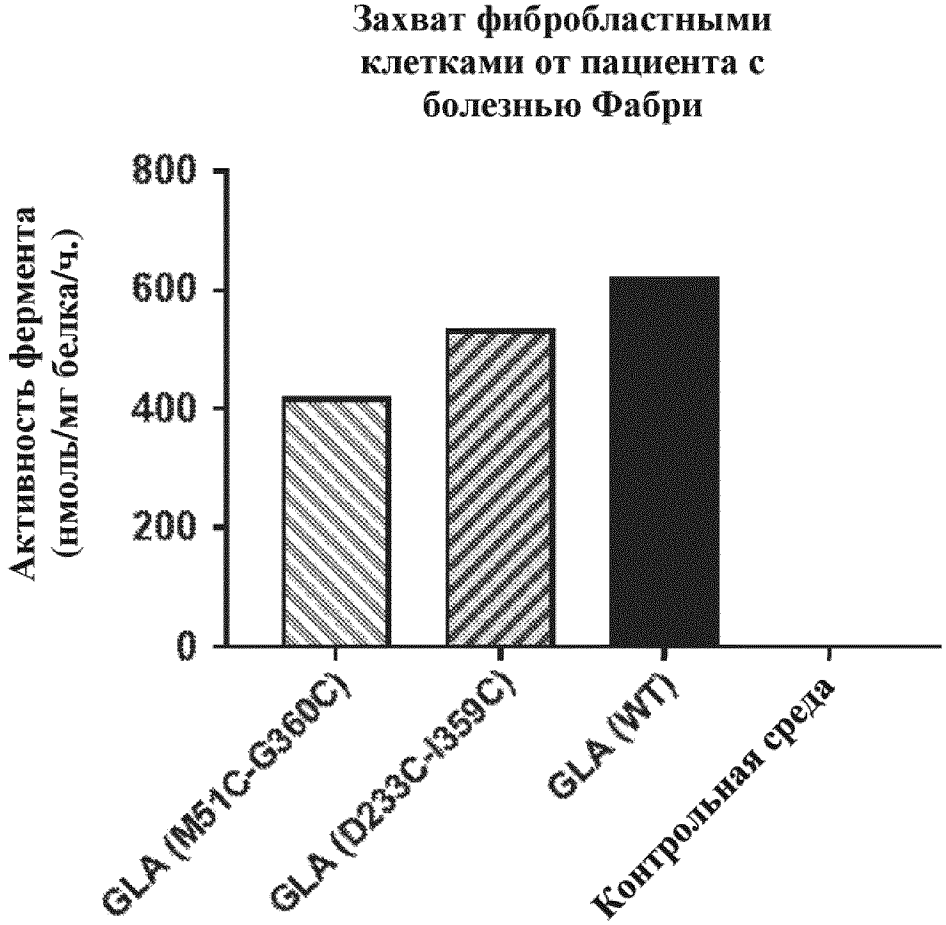
pH 4,6



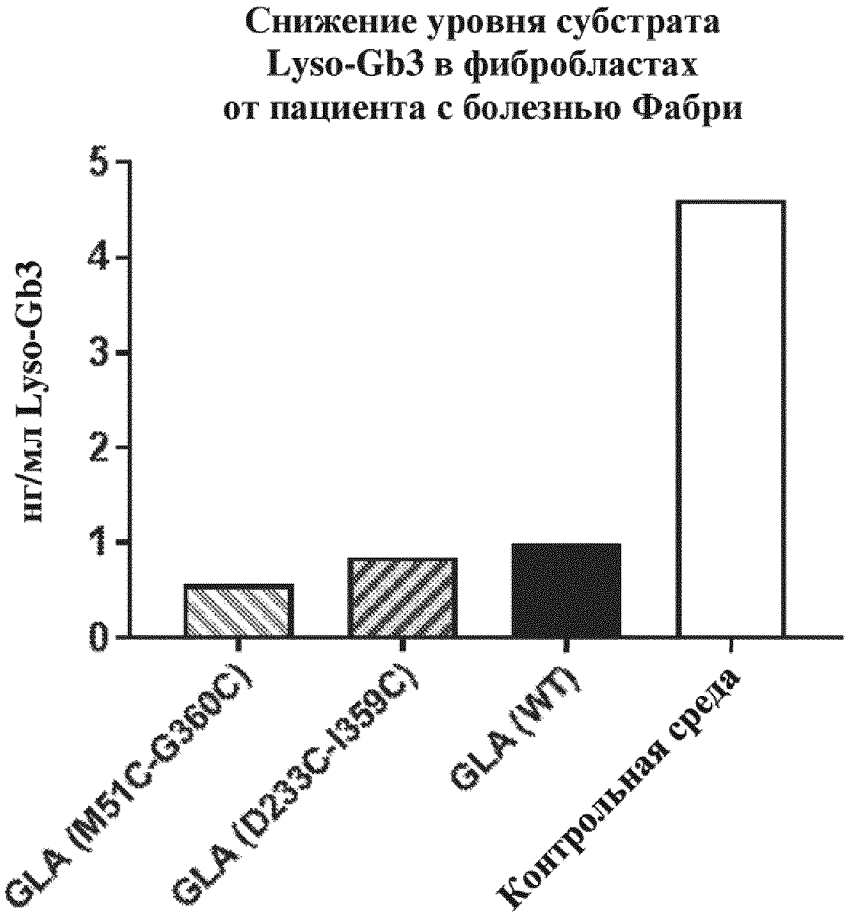
pH 7,4



ФИГ. 3В


Захват фибробластными клетками от пациента с болезнью Фабри
Активность фермента (нмоль/мг белка/ч.)
800
600
400
200
0
GLA (M51C-G360C)
GLA (D233C-I359C)
GLA (WT)
Контрольная среда

ФИГ. 4А

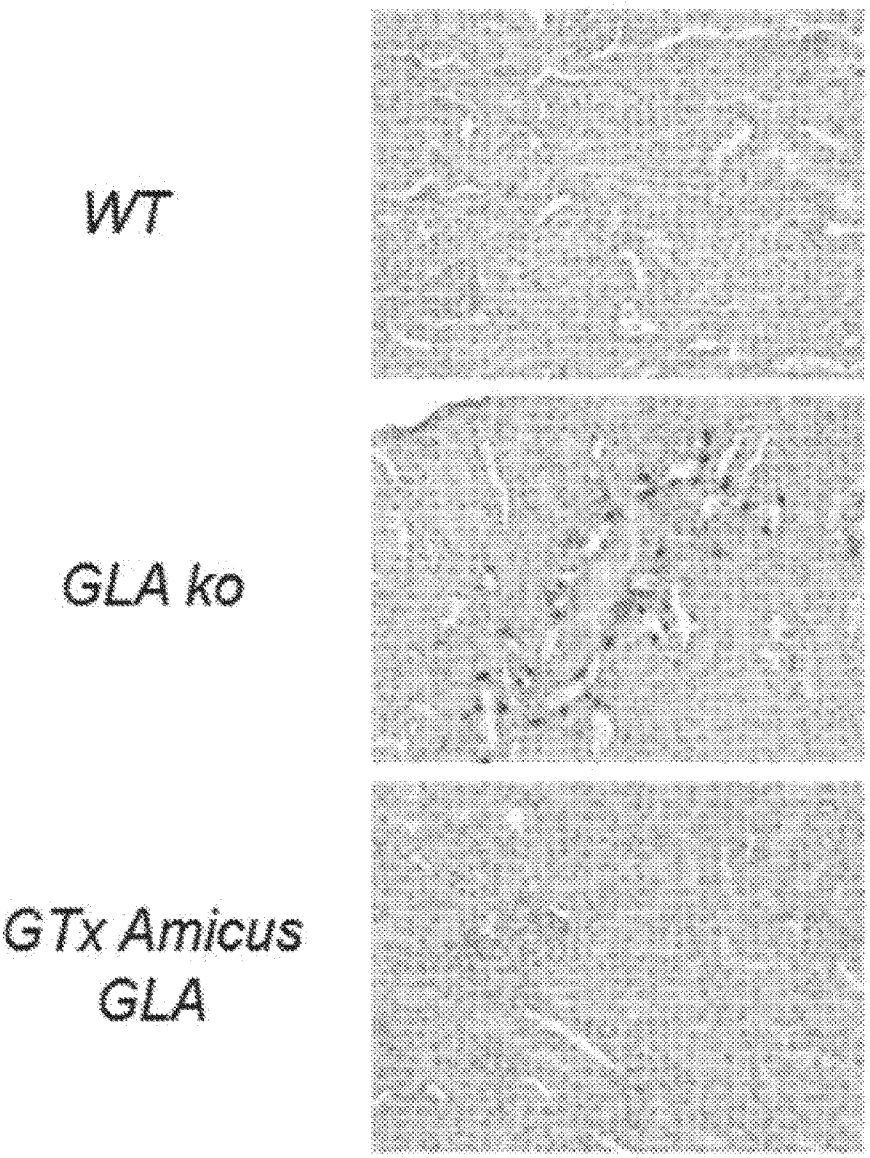

Снижение уровня субстрата
Lyso-Gb3 в фибробластах
от пациента с болезнью Фабри
нг/мл Lyso-Gb3
0
1
2
3
4
5
GLA (M51C-G360C)
GLA (D233C-I359C)
GLA (WT)
Контрольная среда

ФИГ. 4В

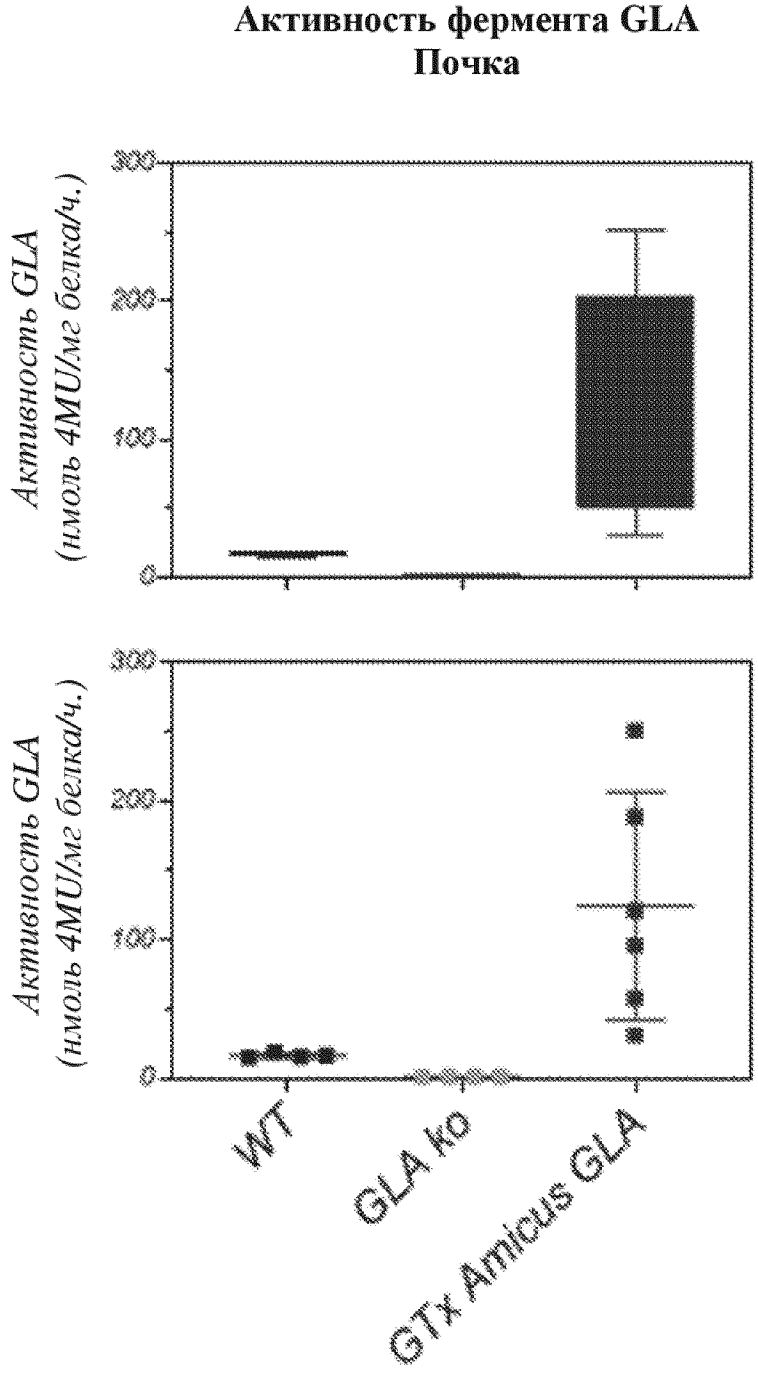
Фермент	Фабразим	GLA wt	GLA M51C-G360C	GLA D233C-I359C
Период полу-жизни в днях	1,095	1,392	3,235	5,258

ФИГ. 5

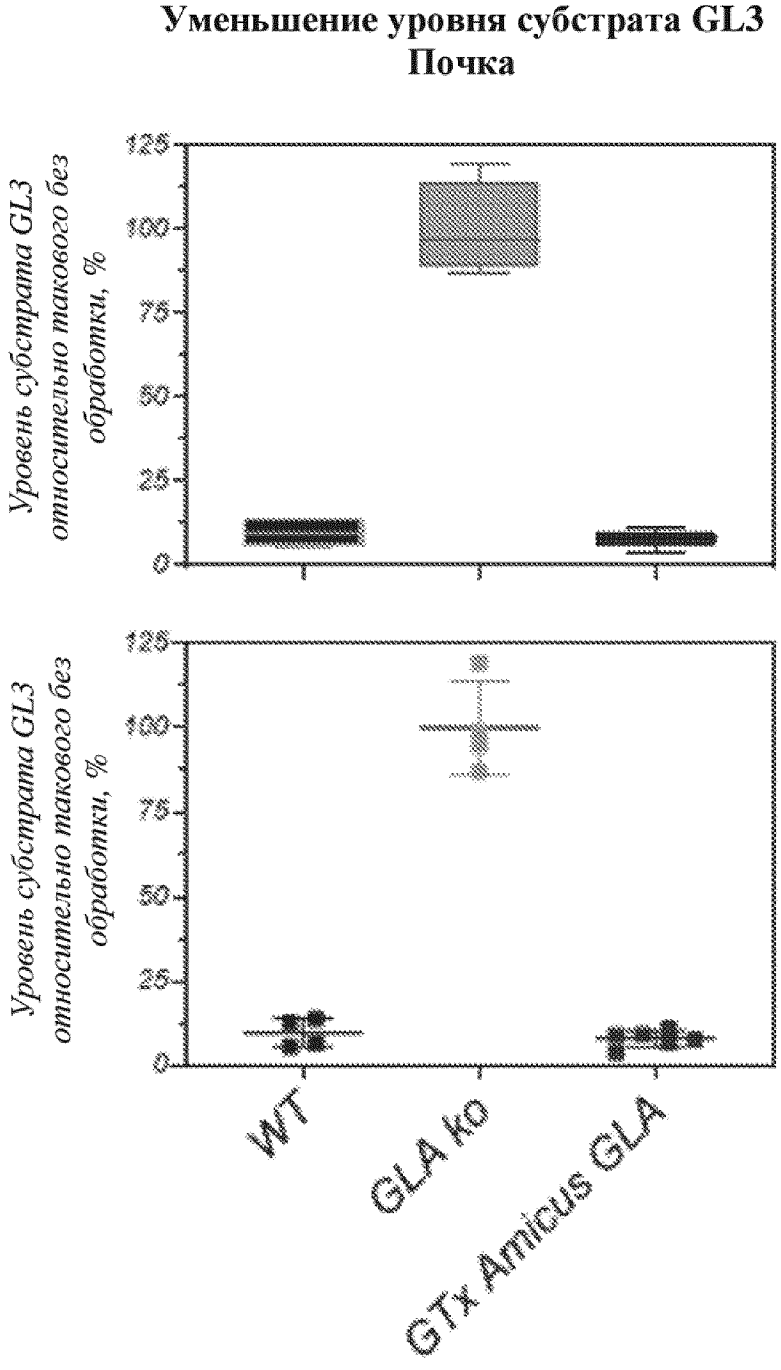
Гистологический анализ в отношении субстрата GB3 Почка



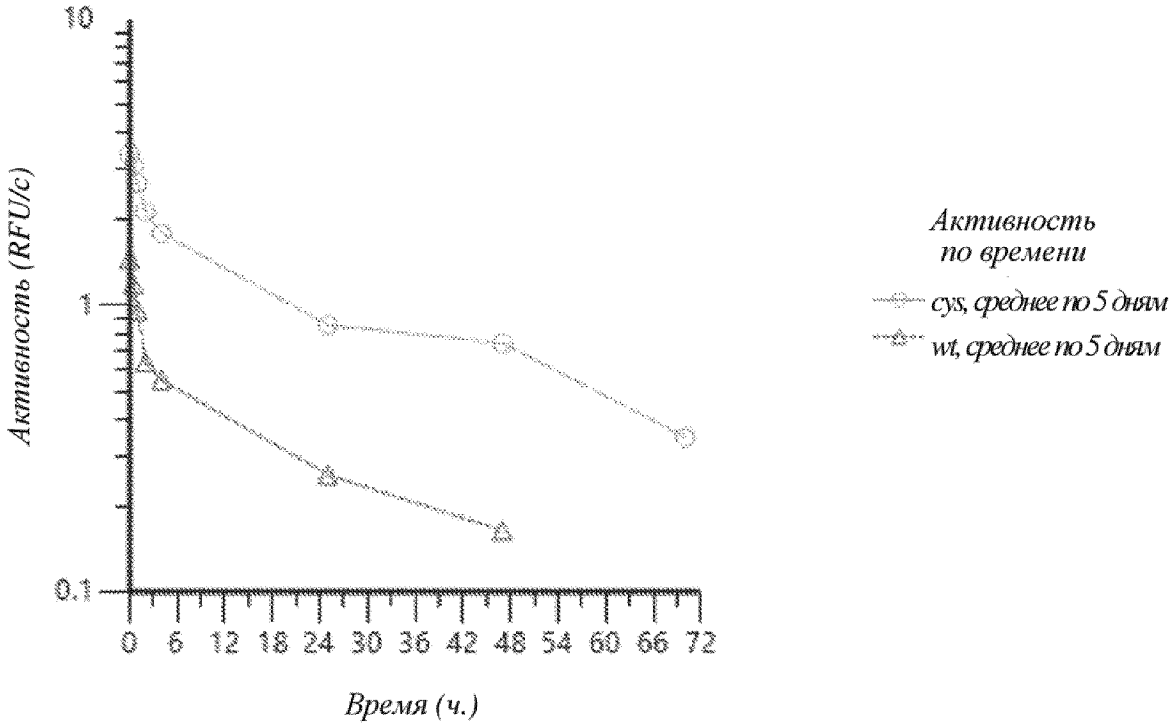
ФИГ. 6


Активность фермента GLA
Почка
Активность GLA
(нмоль 4MU/мг белка/ч.)
300
200
100
0
Активность GLA
(нмоль 4MU/мг белка/ч.)
300
200
100
0
WT
GLA ko
GTx Amicus GLA

ФИГ. 7


Уменьшение уровня субстрата GL3
Почка
Уровень субстрата GL3 относительно такового без обработки, %
125
100
75
50
25
0
WT
GLA ko
GTx Amicus GLA

ФИГ. 8


10
1
0.1
Активность (RFU/c)
0 6 12 18 24 30 36 42 48 54 60 66 72
Время (ч.)
Активность по времени
cys, среднее по 5 дням
wt, среднее по 5 дням

ФИГ. 9