

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046903**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.05.07

(51) Int. Cl. **C12N 9/00 (2006.01)**

(21) Номер заявки
202190475

(22) Дата подачи заявки
2019.08.06

(54) МИНИ-GDE ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЛИКОГЕНОЗА III ТИПА

(31) 18306088.8

(32) 2018.08.08

(33) EP

(43) 2021.04.16

(86) PCT/EP2019/071158

(87) WO 2020/030661 2020.02.13

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЖЕНЕТОН; ЭНСТИТЮ
НАСЪОНАЛЬ ДЕ ЛЯ САНТЕ Э
ДЕ ЛЯ РЕШЕРШ МЕДИКАЛЬ;
СОРБОНН ЮНИВЕРСИТЕ;
ЮНИВЕРСИТЕ Д'ЭВРИ ВАЛЬ
Д'ЭССОНН; АССОСИАСЬЕН
ЭНСТИТЮ ДЕ МИОЛОЖИ (FR)**

(72) Изобретатель:
**Ронцигги Джузеппе, Видаль Патрис
(FR), Мингоцци Федерико (US)**

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

(56) PATRICE VIDAL ET AL. "Rescue of GSDIII Phenotype with Gene Transfer Requires Liver- and Muscle-Targeted GDE Expression", MOLECULAR THERAPY: THE JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF GENE THERAPY, vol. 26, no. 3, 27 December 2017 (2017-12-27), pages 890-901, XP055485928, US ISSN: 1525-0016, DOI:10.1016/j.ymthe.2017.12.019 abstract; figure 4 page 896, left-hand column, paragraph 2 - page 897, right-hand column, paragraph 3

VIDAL P. ET AL. "Adeno associated vector-based gene therapy strategy for type 3 glycogen storage disease", NEUROMUSCULAR DISORDERS, vol. 27, 1 May 2017 (2017-05-01), XP085172746, ISSN: 0960-8966, DOI:10.1016/J.NMD.2017.06.544, abstract

BAODONG SUN ET AL. "Preclinical Development of New Therapy for Glycogen Storage Diseases", CURRENT GENE THERAPY, vol. 15, no. 4, 22 July 2015 (2015-07-22), pages 338-347, XP055397008, NL ISSN: 1566-5232, DOI:10.2174/1566523215666150630132253 abstract; table 1 page 342, left-hand column, line 4 - right-hand column, last line

KYLE CHAMBERLAIN ET AL. "Expressing Transgenes That Exceed the Packaging Capacity of Adeno-Associated Virus Capsids", HUMAN GENE THERAPY METHODS, vol. 27, no. 1, 1 February 2016 (2016-02-01), pages 1-12, XP055396908, ISSN: 1946-6536, DOI:10.1089/hgtb.2015.140 abstract page 3, left-hand column, paragraph 3 - page 4, left-hand column, paragraph 2

WO-A1-2014130722

(57) Изобретение относится к мини-GDE для лечения гликогеноза III типа.

B1

046903

046903 B1

Предпосылки создания изобретения

Мутации в гене AGL вызывают генетическую недостаточность гликоген-деветвящего фермента (GDE) или "амило-альфа-1,6-глюкозидазы, 4-альфа-глюкотрансферазы", фермента, вовлеченного в расщепление гликогена. GDE имеет две независимые каталитические активности, которые обусловлены разными участками на белке: 4-альфа-глюкотрансферазную активность и амило-1,6-глюкозидазную активность. При гликогенозе III типа (GSD III) генетическая недостаточность GDE приводит к неполному гликогенолизу, результатом чего является накопление аномального гликогена с короткой внешней цепью в различных органах, главным образом в печени и мышцах. Отличительными признаками заболевания являются гепатомегалия, гипогликемия, низкий рост, вариабельная миопатия и кардиомиопатия. Большинство пациентов имеют заболевание, при котором затронуты как печень, так и мышцы (IIIa типа), в то время как у некоторых пациентов (~15 процентов) затронута лишь печень (IIIb типа). Симптомы со стороны печени обычно проявляются в детстве. Для некоторых случаев описаны цирроз печени и печеночно-клеточная карцинома (Chen et al., 2009, *Scriber's Online Metabolic & Molecular Bases of inherited Disease*, New York: McGraw-Hill; Kishnani et al., 2010, *Genet Med* 12, 446-463). В детском возрасте может иметь место мышечная слабость. Она становится более выраженной у взрослых в начале третьего или четвертого десятка лет. Прогрессирующая мышечная слабость приводит к значительным клиническим проявлениям, и пациенты на более поздних стадиях могут стать прикованными к инвалидной коляске. У пациентов также может развиваться кардиомиопатия. Наблюдается значительная клиническая вариабельность в степени тяжести симптомов, которые развиваются у данных пациентов. Прогрессирующая миопатия и/или кардиомиопатия, и/или периферическая невропатия являются основными причинами клинических проявлений у взрослых (Kishnani et al., 2010, *Genet Med* 12, 446-463; Cornelio et al., 1984, *Arch Neurol* 41, 1027-1032; Coleman et al., 1992, *Ann Intern Med* 116, 896-900). От клиницистов, работающих с пациентами с GSDIII, поступают сообщения о возможных неврологических проявлениях, связанных с заболеванием, а именно, о неустойчивости внимания, недостатке способности к целенаправленной деятельности и нарушениях эмоциональных навыков (Michon et al., 2015, *J Inherit Metab Dis*, 38(3): 573-580). Соответственно, в модели заболевания на мышцах GDE/- было зарегистрировано обширное накопление гликогена во всей нервной системе (Pagliarani et al., 2014, *Biochim Biophys Acta*, 1842(11): 2318-2328; Liu et al., 2014, *Mol Genet Metab*, 111(4): 467-476), хотя тщательная характеристика фенотипа, связанного с накоплением гликогена, все еще отсутствует. Современное лечение является симптоматическим, и эффективная терапия для заболевания отсутствует. Гипогликемию можно контролировать с помощью частых приемов пищи с высоким содержанием углеводов с добавками кукурузного крахмала или ночными кормлениями через желудочный зонд. Пациентов с миопатией лечат диетой с высоким содержанием белка в дневное время плюс кишечная инфузия в течение ночи. У некоторых пациентов было отмечено временное ослабление симптомов, но нет системных исследований или долгосрочных данных, демонстрирующих, что диета с высоким содержанием белка предотвращает или лечит прогрессирующую миопатию (Kishnani et al., 2010, *Genet Med* 12, 446-463). Эти подходы малоэффективны для изменения долгосрочного течения и клинических проявлений данных заболеваний.

Таким образом, все еще существует потребность в методах долгосрочного лечения GSD III. Генная терапия, направленная на стабильную замену белка GDE в пораженных тканях, является потенциальным терапевтическим подходом. Однако большой размер трансгена GDE является серьезным препятствием, поскольку он не укладывается в границы допустимого размера для большинства генно-терапевтических векторов. Действительно, человеческий ген AGL имеет длину 85 т.п.н. и состоит из 35 экзонов, кодирующих 7,4-т.н. мРНК, которая включает 4596-т.н. кодирующую область и 2371-т.н. 3'-нетранслируемую последовательность для экспрессии 175-кДа белка GDE (Bao Y et al., 1996, *Genomics*, 38(2): 155-65). Это представляет собой реальную проблему, поскольку минимальный размер экспрессионной кассеты GDE (включающей, например, по меньшей мере промотор, кодирующую последовательность GDE, сигнал полиА и два ITR для AAV вектора) превысил бы 5 т.п.н., предел размера генома, который может быть упакован в генно-терапевтический AAV вектор для *in vivo* доставки гена. Авторы изобретения ранее предложили использование двойных AAV векторов для преодоления данного ограничения по размеру. В соответствии с данным подходом используют два вектора, каждый из которых содержит часть большой кодирующей последовательности трансгена, для трансдукции одной и той же клетки. Хотя использование двойных AAV векторов является многообещающим подходом, предпочтительно было бы иметь генно-терапевтическую стратегию с использованием только одного вирусного вектора, как из экономических, так и из практических, соображений.

Таким образом, существует потребность в новых стратегиях для усовершенствования генно-терапевтического подхода при лечении GSD III.

Сущность изобретения

Первый аспект изобретения относится к функциональному укороченному полипептиду GDE человека, который лишен по меньшей мере примерно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 90, 100, 125, 150, 175, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 или по меньшей мере примерно 525 аминокислот в сравнении с эталонной полноразмерной последовательностью GDE человека. В конкретном варианте осуществления эталонная полноразмерная последовательность GDE человека имеет аминокислотную

последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 41.

В конкретных вариантах осуществления:

(i) эталонная полноразмерная последовательность GDE человека имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, и указанный укороченный полипептид GDE человека содержит по меньшей мере аминокислотные остатки в положениях 429-666, 770-892, 1088-1194 и 1235-1532 применительно к SEQ ID NO: 1;

(ii) эталонная полноразмерная последовательность GDE человека имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 40, и указанный укороченный полипептид GDE человека содержит по меньшей мере аминокислотные остатки в положениях 412-649, 753-875, 1071-1177, 1218-1515 применительно к SEQ ID NO: 40; или

(iii) эталонная полноразмерная последовательность GDE человека имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 41, и указанный укороченный полипептид GDE человека содержит по меньшей мере аминокислотные остатки в положениях 413-650, 754-876, 1072-1178, 1219-1516 применительно к SEQ ID NO: 41.

В других вариантах осуществления:

(i) эталонная полноразмерная последовательность GDE человека имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, и удаленные аминокислоты представляют собой по меньшей мере одну аминокислоту в положениях 1-428, 668-769, 895-1087 и/или 1195-1232 применительно к SEQ ID NO: 1;

(ii) эталонная полноразмерная последовательность GDE человека имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 40, и удаленные аминокислоты представляют собой по меньшей мере одну аминокислоту в положениях 1-411, 651-752, 878-1070 и/или 1178-1215 применительно к SEQ ID NO: 40; или

(iii) эталонная полноразмерная последовательность GDE человека имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 41, и удаленные аминокислоты представляют собой по меньшей мере одну аминокислоту в положениях 1-412, 652-753, 879-1071 и/или 1179-1216 применительно к SEQ ID NO: 41.

В других вариантах осуществления:

(i) эталонная полноразмерная последовательность GDE человека имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, и указанный укороченный полипептид GDE человека лишен:

по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из аминокислот в положениях 1-428 применительно к SEQ ID NO: 1, предпочтительно по меньшей мере 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300, 350 или по меньшей мере 400 последовательных аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях 1-428 применительно к SEQ ID NO: 1; и/или

по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из аминокислот в положениях 668-769 применительно к SEQ ID NO: 1, предпочтительно по меньшей мере 10, 15, 20, 30, 40, 50, 80 или по меньшей мере 100 последовательных аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях 668-769 применительно к SEQ ID NO: 1; и/или

по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из аминокислот в положениях 895-1087 применительно к SEQ ID NO: 1, предпочтительно по меньшей мере 10, 15, 20, 30, 40, 50, 80, 100, 125, 150, 175 или по меньшей мере 200 последовательных аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях 895-1087 применительно к SEQ ID NO: 1; и/или

по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из аминокислот в положениях 1195-1232 применительно к SEQ ID NO: 1, предпочтительно по меньшей мере 10, 15, 20 или по меньшей мере 30 последовательных аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях 1195-1232 применительно к SEQ ID NO: 1; или

(ii) эталонная полноразмерная последовательность GDE человека имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 40, и указанный укороченный полипептид GDE человека лишен:

по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из аминокислот в положениях 1-411 применительно к SEQ ID NO: 40, предпочтительно по меньшей мере 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300, 350 или по меньшей мере 400 последовательных аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях 1-411 применительно к SEQ ID NO: 40; и/или

по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из аминокислот в положениях 651-752 применительно к SEQ ID NO: 40, предпочтительно по меньшей мере 10, 15, 20, 30, 40, 50, 80 или по меньшей мере 100 последовательных аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях 651-752 применительно к SEQ ID NO: 40; и/или

по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из аминокислот в положениях 878-1070 применительно к SEQ ID NO: 40, предпочтительно по меньшей мере 10, 15, 20, 30, 40, 50, 80, 100, 125, 150, 175 или по меньшей мере 200 последовательных аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях 878-1070 применительно к SEQ ID NO: 40; и/или

по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из аминокислот в положениях 1178-1215 приме-

нительно к SEQ ID NO: 40, предпочтительно по меньшей мере 10, 15, 20 или по меньшей мере 30 последовательных аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях 1178-1215 применительно к SEQ ID NO: 40; или

(iii) эталонная полноразмерная последовательность GDE человека имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 41, и указанный укороченный полипептид GDE человека лишен:

по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из аминокислот в положениях 1-412 применительно к SEQ ID NO: 41, предпочтительно по меньшей мере 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300, 350 или по меньшей мере 400 последовательных аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях 1-412 применительно к SEQ ID NO: 41; и/или

по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из аминокислот в положениях 652-753 применительно к SEQ ID NO: 41, предпочтительно по меньшей мере 10, 15, 20, 30, 40, 50, 80 или по меньшей мере 100 последовательных аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях 652-753 применительно к SEQ ID NO: 41; и/или

по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из аминокислот в положениях 879-1071 применительно к SEQ ID NO: 41, предпочтительно по меньшей мере 10, 15, 20, 30, 40, 50, 80, 100, 125, 150, 175 или по меньшей мере 200 последовательных аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях 879-1071 применительно к SEQ ID NO: 41; и/или

по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из аминокислот в положениях 1179-1216 применительно к SEQ ID NO: 41, предпочтительно по меньшей мере 10, 15, 20 или по меньшей мере 30 последовательных аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях 1179-1216 применительно к SEQ ID NO: 41.

В следующих вариантах осуществления:

(i) эталонная полноразмерная последовательность GDE человека имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, и функциональный укороченный полипептид GDE человека имеет по меньшей мере одну делецию в сравнении с SEQ ID NO: 1, при этом делецию выбирают из группы, состоящей из:

делеции аминокислот от положения 1 до 156 применительно к SEQ ID NO: 1;
 делеции аминокислот от положения 361 до 428 применительно к SEQ ID NO: 1;
 делеции аминокислот от положения 668 до 769 применительно к SEQ ID NO: 1;
 делеции аминокислот от положения 895 до 1087 применительно к SEQ ID NO: 1;
 делеции аминокислот от положения 1195 до 1232 применительно к SEQ ID NO: 1;
 делеции аминокислот от положения 223 до 320 применительно к SEQ ID NO: 1;
 делеции аминокислот от положения 360 до 428 применительно к SEQ ID NO: 1;
 делеции аминокислот от положения 669 до 720 применительно к SEQ ID NO: 1;
 делеции аминокислот от положения 1 до 280 применительно к SEQ ID NO: 1;
 делеции аминокислот от положения 1 до 425 применительно к SEQ ID NO: 1;
 делеции аминокислот от положения 1 до 230 применительно к SEQ ID NO: 1;
 делеции аминокислот от положения 1 до 15 применительно к SEQ ID NO: 1;
 делеции аминокислот от положения 1 до 30 применительно к SEQ ID NO: 1;
 делеции аминокислот от положения 1 до 81 применительно к SEQ ID NO: 1;
 делеции аминокислот от положения 1 до 103 применительно к SEQ ID NO: 1; и
 делеции аминокислот от положения 1 до 129 применительно к SEQ ID NO: 1; или

(ii) эталонная полноразмерная последовательность GDE человека имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 40, и функциональный укороченный полипептид GDE человека имеет по меньшей мере одну делецию в сравнении с SEQ ID NO: 40, при этом делецию выбирают из группы, состоящей из:

делеции аминокислот от положения 1 до 139 применительно к SEQ ID NO: 40;
 делеции аминокислот от положения 344 до 411 применительно к SEQ ID NO: 40;
 делеции аминокислот от положения 651 до 752 применительно к SEQ ID NO: 40;
 делеции аминокислот от положения 878 до 1070 применительно к SEQ ID NO: 40;
 делеции аминокислот от положения 1178 до 1215 применительно к SEQ ID NO: 40;
 делеции аминокислот от положения 206 до 303 применительно к SEQ ID NO: 40;
 делеции аминокислот от положения 343 до 411 применительно к SEQ ID NO: 40;
 делеции аминокислот от положения 652 до 703 применительно к SEQ ID NO: 40;
 делеции аминокислот от положения 1 до 263 применительно к SEQ ID NO: 40;
 делеции аминокислот от положения 1 до 408 применительно к SEQ ID NO: 40;
 делеции аминокислот от положения 1 до 213 применительно к SEQ ID NO: 40;
 делеции аминокислот от положения 1 до 13 применительно к SEQ ID NO: 40;
 делеции аминокислот от положения 1 до 64 применительно к SEQ ID NO: 40;
 делеции аминокислот от положения 1 до 86 применительно к SEQ ID NO: 40; и
 делеции аминокислот от положения 1 до 112 применительно к SEQ ID NO: 40; или

делеции аминокислот от положения 1 до 264 применительно к SEQ ID NO: 41;
 делеции аминокислот от положения 1 до 409 применительно к SEQ ID NO: 41; и
 делеции аминокислот от положения 1 до 214 применительно к SEQ ID NO: 41.

В другом конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека по изобретению имеет делецию или сочетание делеции, приведенных в табл. 2, ниже. В конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека имеет:

- (i) делецию или сочетание делеции, приведенных в табл. 2, ниже, и
- (ii) делецию или сочетание делеции, приведенных в табл. 3, ниже.

Такие функциональные укороченные полипептиды GDE человека включают, без ограничения, те, которые имеют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2-10 и SEQ ID NO: 48-52, в частности, из SEQ ID NO: 2-6. В конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека по изобретению имеет последовательность, содержащую или состоящую из последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2, 5 или 6. В следующем конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека по изобретению имеет последовательность, содержащую или состоящую из последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 5.

В другом аспекте изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональный укороченный полипептид GDE человека, раскрытый в настоящем документе.

В следующем аспекте изобретение относится к конструкту нуклеиновой кислоты, содержащему, предпочтительно в указанном порядке:

- промотор;
- необязательно, интрон;
- молекулу нуклеиновой кислоты, раскрытую в настоящем документе, кодирующую функциональный укороченный полипептид человека по изобретению; и
- сигнал полиаденилирования.

В другом аспекте изобретение относится к вектору, содержащему:

- молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению; или
- конструкт нуклеиновой кислоты по изобретению.

В конкретных вариантах осуществления вектор может представлять собой вирусный вектор.

В следующем аспекте изобретение относится к вирусному вектору, содержащему конструкт нуклеиновой кислоты, кодирующий функциональный не принадлежащий человеку полипептид GDE, при этом функциональный не принадлежащий человеку полипептид GDE содержит менее примерно 1500 аминокислот. Функциональный не принадлежащий человеку полипептид GDE может быть выбран, без ограничения, из группы, состоящей из: полипептида GDE лошади с SEQ ID NO: 11, полипептида GDE гориллы с SEQ ID NO: 12, полипептида GDE орангутана с SEQ ID NO: 13, полипептида GDE Pteropus alecto с SEQ ID NO: 14, полипептида GDE красноголового мангабея с SEQ ID NO: 15, полипептида GDE утконоса с SEQ ID NO: 16 и полипептида GDE утки с SEQ ID NO: 17. В конкретном варианте осуществления функциональный не принадлежащий человеку полипептид GDE представляет собой полипептида GDE гориллы с SEQ ID NO: 12.

В конкретных вариантах осуществления векторов по изобретению указанные векторы могут представлять собой AAV векторы или ретровирусные векторы, такие как лентивирусные векторы. В конкретном варианте осуществления вектор представляет собой AAV вектор, например, одноцепочечный или двухцепочечный самокомплементарный AAV вектор, предпочтительно AAV вектор с капсидом, полученным из AAV, например, AAV1, AAV2, варианта AAV2, AAV3, варианта AAV3, AAV3B, варианта AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, варианта AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV9P1, AAV10, например, AAVcy10 и AAVrh10, AAVrh74, AAVdj, AAV-Anc80, AAV-LK03, AAV2i8 и свиного AAV, например, капсидом AAVpo4 и AAVpo6, или с химерным капсидом. В конкретном варианте осуществления AAV вектор имеет капсид AAV9, AAV9P1 или AAV6.

В следующем аспекте изобретение относится к выделенной клетке, трансформированной молекулой нуклеиновой кислоты, конструктом нуклеиновой кислоты или вектором по изобретению. Клетка может представлять собой, например, клетку печени, мышечную клетку, клетку сердца или клетку ЦНС.

В другом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей, в фармацевтически приемлемом носителе, функциональный укороченный полипептид GDE человека, молекулу нуклеиновой кислоты, конструкт нуклеиновой кислоты, вектор или клетку по изобретению.

В конкретном аспекте изобретение также относится к функциональному укороченному полипептиду GDE человека, функциональному не принадлежащему человеку полипептиду GDE, молекуле нуклеиновой кислоты, конструкту нуклеиновой кислоты, вектору или клетке по изобретению для использования в качестве лекарственного препарата.

В следующем аспекте изобретение относится к функциональному укороченному полипептиду GDE человека, функциональному не принадлежащему человеку полипептиду GDE, молекуле нуклеиновой кислоты, конструкту нуклеиновой кислоты, вектору или клетке по изобретению для использования в способе лечения GSDIII (болезни Кори).

Настоящее изобретение также относится к полипептиду GDE гориллы с SEQ ID NO: 12 для исполь-

зования в способе лечения GSDIII (болезни Кори).

Подписи к фигурам

Фиг. 1. Уменьшенный размер последовательностей GDE млекопитающих, отличных от человека. Показан размер, выраженный в виде количества аминокислот, белков GDE разных млекопитающих (раGDE: последовательность GDE Pteropus alecto, оGDE: последовательность GDE орангутана, gGDE: последовательность GDE гориллы, hoGDE: последовательность GDE лошади, hGDE: последовательность изоформы 1 GDE человека).

Фиг. 2. Схематическое изображение разных укорочений в последовательности GDE человека. Показаны три разных укороченных варианта GDE человека, Δ1, Δ2-3 и Δ4.

Фиг. 3. Экспрессия белка gGDE. Мышам с нокаутом GDE (KO) вводили инъекцией 1×10^{12} вг/мышь одного AAV9 вектора, экспрессирующего GDE гориллы (gGDE). Через три месяца после инъекции вектора животных умерщвляли и обнаруживали GDE в сердце методом вестерн-блоттинга. Животных дикого типа (ДТ) и GDE-KO использовали в качестве положительного и отрицательного контролей, соответственно.

Фиг. 4. Вектор AAV9-gGDE обеспечивает эффективное удаление гликогена из четырехглавой мышцы. Мышам с нокаутом GDE (KO) вводили инъекцией 1×10^{12} вг/мышь одного AAV9 вектора, экспрессирующего GDE гориллы (AAV9-gGDE), или 2×10^{12} вг/мышь двух AAV9 векторов, экспрессирующих GDE человека (AAV9-GDEov). Через три месяца после инъекции вектора животных умерщвляли и измеряли накопление гликогена в четырехглавой мышце. Параллельно измеряли содержание гликогена у подобранных по возрасту животных дикого типа (ДТ) и животных с нокаутом GDE (KO). Статистический анализ проводили с использованием ANOVA (**=p<0,001, ***=p<0,0001, n/z=незначимо).

Фиг. 5. Вектор AAV9-gGDE восстанавливает мышечную функцию у мышей с GSDIII. Мышам с нокаутом GDE (KO) вводили инъекцией 1×10^{12} вг/мышь одного AAV9 вектора, экспрессирующего GDE гориллы (AAV9-gGDE), или 2×10^{12} вг/мышь двух AAV9 векторов, экспрессирующих GDE человека (AAV9-GDEov). Через три месяца после инъекции вектора мышечную функцию оценивали в баллах при помощи теста "вис на горизонтальной проволоке". На графике показаны результаты теста "вис на горизонтальной проволоке", полученные для подобранных по возрасту животных дикого типа (ДТ) и животных с нокаутом GDE (KO). Статистический анализ проводили с использованием ANOVA (***=p<0,0001, n/z=незначимо).

Фиг. 6. Измерение активности укороченных GDE in vitro. Клетки Nuh-7 трансфицировали плазмидами, экспрессирующими полноразмерный GDE человека (hGDE), один укороченный GDE человека (GDE A4) или GDE гориллы (gGDE) под контролем промотора CMV. Параллельно клетки трансфицировали GFP-экспрессирующей плазмидой в качестве контроля. Через 48 ч после трансфекции готовили цитозольные экстракты и измеряли активность GDE. На гистограмме показаны уровни активности GDE, выраженные в виде количества глюкозы, высвобожденной в результате расщепления предельного декстрина. Статистический анализ проводили с использованием ANOVA (*=p<0,05 против CMV-hGDE).

Фиг. 7. Укороченные GDE продуцируются in vivo. В передние большеберцовые (ТА) мышцы мышшей с нокаутом GDE вводили инъекцией 1×10^{11} вг/мышь AAV9 вектора, экспрессирующего укороченный GDE человека (AAV9-Δ1-GDE) или GDE гориллы (AAV9-gGDE), или 2×10^{11} вг/мышь двух AAV9 векторов, экспрессирующих полноразмерный GDE человека (AAV9-GDEov). Через 15 дней после инъекции ТА извлекали и обрабатывали для анализа экспрессии GDE методом вестерн-блоттинга. Актин использовали в качестве контроля нагрузки.

Фиг. 8. Укороченные GDE активны in vivo. В передние большеберцовые (ТА) мышцы мышшей с нокаутом GDE вводили инъекцией 1×10^{11} вг/мышь AAV9 вектора, экспрессирующего укороченные GDE человека (AAV9-Δ1-GDE, AAV9-Δ4-GDE, AAV9-Δ2/3-GDE), полученные из последовательности либо дикого типа (ДТ), либо кодон-оптимизированной (к/о) кодирующей последовательности GDE человека. Параллельно мышам вводили инъекцией 1×10^{11} вг/мышь AAV9 вектора, экспрессирующего кодон-оптимизированный GDE гориллы (AAV9-gGDE к/о), или PBS в качестве контроля. Через 15 дней после инъекции ТА извлекали и обрабатывали для анализа активности GDE.

Фиг. 9. Укороченные GDE продуцируются in vitro. Клетки HEK293T трансфицировали плазмидами, экспрессирующими GDE человека (Δ9+Δ2/3; Δ10+Δ2/3; Δ11+Δ2/3; Δ12+Δ2/3; Δ13+Δ2/3). GFP-трансфицированные клетки использовали в качестве контроля. Через 3 дня после трансфекции клетки собирали и обрабатывали для анализа экспрессии GDE методом вестерн-блоттинга.

Фиг. 10. Укороченные GDE продуцируются in vivo. В передние большеберцовые (ТА) мышцы мышшей с нокаутом GDE вводили инъекцией 2×10^{11} вг/мышь AAV9 вектора, экспрессирующего полноразмерный GDE (GDEfs) или 7 укороченных GDE человека (Δ2/3; Δ9+Δ2/3; Δ10+Δ2/3; Δ13+Δ2/3; и Δ1). Через 15 дней после инъекции ТА извлекали и обрабатывали для анализа экспрессии GDE методом вестерн-блоттинга.

Подробное описание изобретения

При использовании в настоящем документе применительно к любым раскрытым значениям или диапазонам термин "примерно" указывает на то, что приведенное числовое значение допускает неболь-

шую неточность, например, достаточно близко к значению, около него, например, плюс или минус 10%, в частности, например, плюс или минус 5%, от приведенных значений или диапазонов.

Несмотря на недостаток информации о трехмерной структуре белка GDE, авторы настоящего изобретения идентифицировали полипептиды GDE, кодирующие последовательности которых достаточно малы, чтобы быть упакованными в генно-терапевтический вектор, и которые сохраняют функциональные свойства GDE, в настоящем документе их называют "полипептиды мини-GDE".

Термин "генно-терапевтический вектор" означает любой вектор, подходящий для генной терапии. В частности, генно-терапевтический вектор может представлять собой плазмиду или рекомбинантный вирус, например, вирусный вектор, полученный из ретровируса или лентивируса. Предпочтительно, вирусный вектор представляет собой AAV вектор, такой как AAV вектор, подходящий для трансдукции печеночной ткани или мышечных клеток. Обширный опыт клинических испытаний и доклинических исследований на моделях мышечных заболеваний свидетельствует в пользу выбора аденоассоциированного вируса (AAV) в качестве вектора для *in vivo* генной терапии GSDIII. Эти векторы эффективно трансдуцируют печень и мышцы, их производство может быть масштабировано, и в сравнении с другими генно-терапевтическими векторами они имеют относительно низкий профиль иммуногенности. Однако одним из самых больших ограничений в использовании AAV для замены генов является их ограниченный размер инкапсидации (примерно 5 т.п.н.). Действительно, в процессе получения рекомбинантного AAV геномы размером более 5 т.п.н. инкапсидируются с низкой эффективностью, и полученный AAV может содержать фрагментированные геномы, что снижает эффективность переноса генов.

Как подробно описано ниже, в контексте настоящего изобретения выражение "полипептид мини-GDE" охватывает как (i) функциональные укороченные полипептиды GDE человека, так и (ii) функциональные не принадлежащие человеку полипептиды GDE.

Таким образом, первый аспект настоящего изобретения относится к функциональному полипептиду мини-GDE, кодирующая последовательность которого достаточно мала, чтобы быть эффективно упакованной в один AAV вектор.

Термин "функциональный" полипептид GDE означает полипептид, который сохраняет, по меньшей мере частично, по меньшей мере одну из ферментативных активностей белка GDE, предпочтительно все из ферментативных активностей белка GDE. Как следствие, функциональный полипептид GDE по настоящему изобретению способствует устранению накопления гликогена и сохранению мышечной силы *in vivo*. Как указано выше, ферментативные активности GDE представляют собой 4-альфа-глюкотрансферазную активность и амило-1,6-глюкозидазную активность, вовлеченную в расщепление гликогена. Трансферазная активность GDE приводит к перемещению трех глюкозных единиц гликогена с одной цепи на другую. В результате в точке ветвления остается одна единица глюкозы, которая впоследствии высвобождается в виде глюкозы за счет активности глюкозидазы. В конкретном варианте осуществления функциональный полипептид мини-GDE по изобретению имеет такие же функциональные свойства, как и полноразмерный полипептид GDE, в частности, как полноразмерный полипептид GDE человека. Например, функциональный полипептид мини-GDE по изобретению может иметь активность, составляющую по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или по меньшей мере 99% от одной, предпочтительно обеих ферментативных активностей, описанных выше, или по меньшей мере 100%, в сравнении с полноразмерным белком GDE человека, в частности полноразмерным белком GDE человека с SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 41. Активность мини-белка GDE по изобретению может даже превышать 100%, например, составлять более 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 500%, 700% или даже более 1000% от активности полноразмерного белка GDE человека, в частности, полноразмерного белка GDE человека с SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 41.

Квалифицированный специалист легко может определять, является ли полипептид функциональным полипептидом GDE. Соответствующие способы известны специалистам в данной области. Например, один подходящий *in vitro* способ включает встраивание нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, в вектор, такой как плаزمид или вирусный вектор, проведение трансфекции или трансдукции клеток-хозяев, например, клеток 293T или HeLa, или других клеток, таких как Huh7, вектором и анализ активности GDE. Подходящие способы описаны более подробно ниже, в экспериментальном разделе. Например, активность GDE можно определять путем измерения количества глюкозы, образующейся после инкубации гомогенизированных тканей мышцей с предельным декстрином. Другие способы включают тестирование активности GDE путем определения экспрессии GDE в тканях GDE KO животного, например, методом вестерн-блоттинга, путем отслеживания глюкозы, образующейся из расщепленного гликогенфосфорилазой гликогена, путем оценки мышечной силы GDE-KO животных методом виса на горизонтальной проволоке после введения им векторов, например, через один, два или три месяца после введения, или путем оценки устранения накопления гликогена в мышечной и/или сердечной ткани.

В первом варианте осуществления первого аспекта изобретения полипептид мини-GDE представляет собой функциональный укороченный полипептид GDE человека, который укорочен в сравнении с эталонной полноразмерной последовательностью GDE человека.

Термин "укороченный полипептид GDE человека" охватывает любой полипептид GDE человека, который становится короче в результате делеции аминокислот в сравнении с эталонной полноразмерной

последовательностью GDE человека, из которой получен укороченный GDE человека. В частности, функциональный укороченный полипептид GDE человека лишен по меньшей мере 1 аминокислоты в сравнении с эталонной полноразмерной последовательностью GDE человека. Предпочтительно, функциональный укороченный полипептид GDE человека лишен по меньшей мере примерно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 90, 100, 125, 150, 175, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 или по меньшей мере примерно 525 аминокислот в сравнении с эталонной полноразмерной последовательностью GDE человека. В предпочтительном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека лишен по меньшей мере примерно 50, 100 или 150 аминокислот в сравнении с эталонной полноразмерной последовательностью GDE человека.

В конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека, который укорочен в сравнении с эталонной полноразмерной последовательностью GDE человека, может иметь одну или более дополнительных аминокислотных модификаций в сравнении с указанной эталонной полноразмерной последовательностью GDE человека. В частности, помимо делеции(й), которые дополнительно описаны ниже, функциональный укороченный полипептид GDE человека может иметь одну или более аминокислотных модификаций, таких как вставка, делеция и/или замена аминокислот, в сравнении с эталонной полноразмерной последовательностью GDE человека. Например, функциональный укороченный полипептид GDE человека может иметь от 1 до 10 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) дополнительных аминокислотных модификаций, в частности, от 1 до 5 (например, 1, 2, 3, 4 или 5) дополнительных аминокислотных модификаций, при условии, что функциональные свойства укороченного полипептида GDE человека сохраняются. В конкретном варианте осуществления, когда функциональный укороченный полипептид GDE человека имеет N-концевую делецию, на N-конце может быть добавлен метионин.

В контексте настоящего изобретения термин "эталонная полноразмерная последовательность GDE человека" охватывает все природные изоформы GDE человека. Bao с соавторами (Genomics, 1997, 38, 155-165) определили наличие шести вариантов транскрипта, кодирующих три изоформы белка GDE. Варианты транскрипта 1-4 кодируют один и тот же белок, а именно, изоформу 1 GDE. Варианты транскрипта 5 и 6 кодируют изоформы 2 и 3 GDE, соответственно.

Термин "эталонный полноразмерный полипептид GDE человека", таким образом, охватывает все природные изоформы GDE человека, включая форму предшественника, а также модифицированные или мутантные вследствие вставки(вставок), делеции(делеций) и/или замены(замен) белка GDE или их фрагменты, которые являются функциональными производными GDE. В частности, эталонную полноразмерную последовательность GDE человека выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 (соответствующей изоформе 1 GDE), SEQ ID NO: 40 (соответствующей изоформе 2 GDE) и SEQ ID NO: 41 (соответствующей изоформе 3 GDE).

В конкретном варианте осуществления эталонная полноразмерная последовательность GDE человека имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, которая соответствует изоформе 1 GDE.

В конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека по изобретению содержит по меньшей мере аминокислотные остатки в положениях 429-666, 770-892, 1088-1194, 1235-1532 применительно к SEQ ID NO: 1.

В конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека по изобретению содержит по меньшей мере аминокислотные остатки в положениях 429-667, 770-894, 1088-1194, 1233-1532 применительно к SEQ ID NO: 1.

В другом конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека по изобретению лишен по меньшей мере одной аминокислоты в сравнении с SEQ ID NO: 1, при этом удаленная аминокислота(ы) представляет собой по меньшей мере одну аминокислоту в положениях 1-428, 668-769, 895-1087 и/или 1195-1232 применительно к SEQ ID NO: 1. В следующем конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека лишен по меньшей мере примерно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 90, 100, 125, 150, 175, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 или по меньшей мере примерно 525 аминокислот, при этом удаленная аминокислота(ы) выбрана из любых аминокислот в положениях 1-428, 668-769, 895-1087 и/или 1195-1232 применительно к SEQ ID NO: 1. В данном варианте осуществления удаленные аминокислоты могут представлять собой последовательные аминокислоты или не последовательные аминокислоты при условии, что они выбраны из любых аминокислот в положениях 1-428, 668-769, 895-1087 и/или 1195-1232 применительно к SEQ ID NO: 1.

В конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека по изобретению лишен:

по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из аминокислот в положениях 1-428 применительно к SEQ ID NO: 1, предпочтительно по меньшей мере 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300, 350 или по меньшей мере 400 последовательных аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях 1-428 применительно к SEQ ID NO: 1; и/или

по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из аминокислот в положениях 668-769 примени-

Кроме того, функциональный укороченный полипептид GDE человека, имеющий, например: делецию аминокислот от положения 1 до 280 применительно к SEQ ID NO: 1; и делецию аминокислот от положения 223 до 320 применительно к SEQ ID NO: 1, соответствует полипептиду GDE с делецией всех последовательных аминокислот от положения 1 до 320, поскольку диапазон 1-280 перекрывается с диапазоном 223-320.

В другом варианте осуществления эталонная полноразмерная последовательность GDE человека имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 40, которая соответствует изоформе 2 GDE.

В конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека по изобретению содержит по меньшей мере аминокислотные остатки в положениях 412-649, 753-875, 1071-1177, 1218-1515 применительно к SEQ ID NO: 40.

В конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека по изобретению содержит по меньшей мере аминокислотные остатки в положениях 412-650, 753-877, 1071-1177, 1216-1515 применительно к SEQ ID NO: 40.

В другом конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека по изобретению лишен по меньшей мере одной аминокислоты применительно к SEQ ID NO: 40, при этом удаленная аминокислота(ы) представляет собой по меньшей мере одну аминокислоту в положениях 1-411, 651-752, 878-1070 и/или 1178-1215 применительно к SEQ ID NO: 40. В следующем конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека лишен по меньшей мере примерно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 90, 100, 125, 150, 175, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 или по меньшей мере примерно 525 аминокислот, при этом удаленная аминокислота(ы) выбрана из любых аминокислот в положениях 1-411, 651-752, 878-1070 и/или 1178-1215 применительно к SEQ ID NO: 40. В данном варианте осуществления удаленные аминокислоты могут представлять собой последовательные аминокислоты или не последовательные аминокислоты при условии, что они выбраны из любых аминокислот в положениях 1-411, 651-752, 878-1070 и/или 1178-1215 применительно к SEQ ID NO: 40.

В конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека по изобретению лишен:

по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из аминокислот в положениях 1-411 применительно к SEQ ID NO: 40, предпочтительно по меньшей мере 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300, 350 или по меньшей мере 400 последовательных аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях 1-411 применительно к SEQ ID NO: 40; и/или

по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из аминокислот в положениях 651-752 применительно к SEQ ID NO: 40, предпочтительно по меньшей мере 10, 15, 20, 30, 40, 50, 80 или по меньшей мере 100 последовательных аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях 651-752 применительно к SEQ ID NO: 40; и/или

по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из аминокислот в положениях 878-1070 применительно к SEQ ID NO: 40, предпочтительно по меньшей мере 10, 15, 20, 30, 40, 50, 80, 100, 125, 150, 175 или по меньшей мере 190 последовательных аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях 878-1070 применительно к SEQ ID NO: 40; и/или

по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из аминокислот в положениях 1178-1215 применительно к SEQ ID NO: 40, предпочтительно по меньшей мере 10, 15, 20 или по меньшей мере 30 последовательных аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях 1178-1215 применительно к SEQ ID NO: 40.

В конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека по изобретению лишен:

по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из аминокислот в положениях 1-139 применительно к SEQ ID NO: 40, предпочтительно по меньшей мере 15 последовательных аминокислот, по меньшей мере 50 последовательных аминокислот или по меньшей мере 100 последовательных аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях 1-139 применительно к SEQ ID NO: 40; и/или

по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из аминокислот в положениях 344-411 применительно к SEQ ID NO: 40, предпочтительно по меньшей мере 15 последовательных аминокислот или по меньшей мере 50 последовательных аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях 344-411 применительно к SEQ ID NO: 40; и/или

по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из аминокислот в положениях 651-752 применительно к SEQ ID NO: 40, предпочтительно по меньшей мере 15 последовательных аминокислот, по меньшей мере 50 последовательных аминокислот или по меньшей мере 100 последовательных аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях 651-752 применительно к SEQ ID NO: 40; и/или

по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из аминокислот в положениях 878-1070 применительно к SEQ ID NO: 40, предпочтительно по меньшей мере 15 последовательных аминокислот, по меньшей мере 50 последовательных аминокислот, по меньшей мере 100 последовательных аминокислот, по меньшей мере 150 последовательных аминокислот, по меньшей мере 175 последовательных аминокислот,

Для ясности, в данном варианте осуществления делеция означает делецию всех последовательных аминокислот в указанном диапазоне положений. Например, функциональный укороченный полипептид GDE человека, имеющий делецию аминокислот от положения 1 до 139 применительно к SEQ ID NO: 40, соответствует полипептиду GDE с делецией всех последовательных аминокислот от положения 1 до 139 применительно к SEQ ID NO: 40.

Также для ясности, функциональный укороченный полипептид GDE человека, имеющий, например:

делецию аминокислот от положения 1 до 139 применительно к SEQ ID NO: 40; и

делецию аминокислот от положения 1 до 263 применительно к SEQ ID NO: 40, соответствует полипептиду GDE с делецией всех последовательных аминокислот от положения 1 до 263, поскольку диапазон 1-139 входит в диапазон 1-263.

Кроме того, функциональный укороченный полипептид GDE человека, имеющий, например:

делецию аминокислот от положения 1 до 263 применительно к SEQ ID NO: 40; и

делецию аминокислот от положения 206 до 303 применительно к SEQ ID NO: 40, соответствует полипептиду GDE с делецией всех последовательных аминокислот от положения 1 до 303, поскольку диапазон 1-263 перекрывается с диапазоном 206-303.

В другом варианте осуществления эталонная полноразмерная последовательность GDE человека имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 41, которая соответствует изоформе 3 GDE.

В конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека по изобретению содержит по меньшей мере аминокислотные остатки в положениях 413-650, 754-876, 1072-1178, 1219-1516 применительно к SEQ ID NO: 41.

В конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека по изобретению содержит по меньшей мере аминокислотные остатки в положениях 413-651, 754-878, 1072-1178, 1217-1516 применительно к SEQ ID NO: 41.

В другом конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека по изобретению лишен по меньшей мере одной аминокислоты в сравнении с SEQ ID NO: 41, при этом удаленная аминокислота(ы) представляет собой по меньшей мере одну аминокислоту в положениях 1-412, 652-753, 879-1071 и/или 1179-1216 применительно к SEQ ID NO: 41. В следующем конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека лишен по меньшей мере примерно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 90, 100, 125, 150, 175, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 или по меньшей мере примерно 525 аминокислот, при этом удаленная аминокислота(ы) выбрана из любых аминокислот в положениях 1-412, 652-753, 879-1071 и/или 1179-1216 применительно к SEQ ID NO: 41. В данном варианте осуществления удаленные аминокислоты могут представлять собой последовательные аминокислоты или не последовательные аминокислоты при условии, что они выбраны из любых аминокислот в положениях 1-412, 652-753, 879-1071 и/или 1179-1216 применительно к SEQ ID NO: 41.

В конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека по изобретению лишен:

по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из аминокислот в положениях 1-412 применительно к SEQ ID NO: 41, предпочтительно по меньшей мере 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300, 350 или по меньшей мере 400 последовательных аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях 1-412 применительно к SEQ ID NO: 41; и/или

по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из аминокислот в положениях 652-753 применительно к SEQ ID NO: 41, предпочтительно по меньшей мере 10, 15, 20, 30, 40, 50, 80 или по меньшей мере 100 последовательных аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях 652-753 применительно к SEQ ID NO: 41; и/или

по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из аминокислот в положениях 879-1071 применительно к SEQ ID NO: 41, предпочтительно по меньшей мере 10, 15, 20, 30, 40, 50, 80, 100, 125, 150, 175 или по меньшей мере 190 последовательных аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях 879-1071 применительно к SEQ ID NO: 41; и/или

по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из аминокислот в положениях 1179-1216 применительно к SEQ ID NO: 41, предпочтительно по меньшей мере 10, 15, 20 или по меньшей мере 30 последовательных аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях 1179-1216 применительно к SEQ ID NO: 41.

В конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека по изобретению лишен:

по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из аминокислот в положениях 1-140 применительно к SEQ ID NO: 41, предпочтительно по меньшей мере 15 последовательных аминокислот, по меньшей мере 50 последовательных аминокислот или по меньшей мере 100 последовательных аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях 1-140 применительно к SEQ ID NO: 41; и/или

по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из аминокислот в положениях 345-412 примени-

делеции аминокислот от положения 1 до 140 применительно к SEQ ID NO: 41;
 делеции аминокислот от положения 345 до 412 применительно к SEQ ID NO: 41;
 делеции аминокислот от положения 652 до 753 применительно к SEQ ID NO: 41;
 делеции аминокислот от положения 879 до 1071 применительно к SEQ ID NO: 41;
 делеции аминокислот от положения 1179 до 1216 применительно к SEQ ID NO: 41;
 делеции аминокислот от положения 207 до 304 применительно к SEQ ID NO: 41;
 делеции аминокислот от положения 344 до 412 применительно к SEQ ID NO: 41;
 делеции аминокислот от положения 653 до 704 применительно к SEQ ID NO: 41;
 делеции аминокислот от положения 1 до 264 применительно к SEQ ID NO: 41;
 делеции аминокислот от положения 1 до 409 применительно к SEQ ID NO: 41; и
 делеции аминокислот от положения 1 до 214 применительно к SEQ ID NO: 41.

Для ясности, в данном варианте осуществления делеция означает делецию всех последовательных аминокислот в указанном диапазоне положений. Например, функциональный укороченный полипептид GDE человека, имеющий делецию аминокислот от положения 1 до 140 применительно к SEQ ID NO: 41, соответствует полипептиду GDE с делецией всех последовательных аминокислот от положения 1 до 140 применительно к SEQ ID NO: 41.

Также для ясности, функциональный укороченный полипептид GDE человека, имеющий, например:

делецию аминокислот от положения 1 до 140 применительно к SEQ ID NO: 41; и

делецию аминокислот от положения 1 до 264 применительно к SEQ ID NO: 41, соответствует полипептиду GDE с делецией всех последовательных аминокислот от положения 1 до 264, поскольку диапазон 1-140 входит в диапазон 1-264.

Кроме того, функциональный укороченный полипептид GDE человека, имеющий, например:

делецию аминокислот от положения 1 до 264 применительно к SEQ ID NO: 41; и

делецию аминокислот от положения 207 до 304 применительно к SEQ ID NO: 41, соответствует полипептиду GDE с делецией всех последовательных аминокислот от положения 1 до 304, поскольку диапазон 1-264 перекрывается с диапазоном 207-304.

В конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека по изобретению имеет делецию, или сочетание делеции, в сравнении с SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 41, при этом делецию(и) выбирают из любой делеции, обозначенной Δ1, Δ2, Δ3, Δ4, Δ5, Δ6, Δ7 и Δ8 в табл. 1:

Таблица 1

Делеция	Положение удаленной аминокислоты применительно к SEQ ID NO: 1	Положение удаленной аминокислоты применительно к SEQ ID NO: 40	Положение удаленной аминокислоты применительно к SEQ ID NO: 41
Δ1	1-156	1-139	1-140
Δ2	361-428	344-411	345-412
Δ3	668-769	651-752	652-753
Δ4	895-1087	878-1070	879-1071
Δ5	223-320	206-303	207-304
Δ6	360-428	343-411	344-412
Δ7	669-720	652-703	653-704
Δ8	1-280	1-263	1-264

В конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека по изобретению может иметь сочетание из 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 делеций, при этом делецию(и) выбирают из любой делеций, обозначенной Δ1, Δ2, Δ3, Δ4, Δ5, Δ6, Δ7 и Δ8 в табл. 1.

В конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека по изобретению может иметь делецию или сочетание делеций, приведенных в табл. 2, при этом делеция(и) соответствует(уют) приведенным в табл. 1.

Таблица 2

$\Delta 1$	$\Delta 2 + \Delta 8$	$\Delta 1 + \Delta 2 + \Delta 7$
$\Delta 2$	$\Delta 3 + \Delta 4$	$\Delta 1 + \Delta 2 + \Delta 8$
$\Delta 3$	$\Delta 3 + \Delta 5$	$\Delta 1 + \Delta 3 + \Delta 4$
$\Delta 4$	$\Delta 3 + \Delta 6$	$\Delta 1 + \Delta 3 + \Delta 5$
$\Delta 5$	$\Delta 3 + \Delta 7$	$\Delta 1 + \Delta 3 + \Delta 6$
$\Delta 6$	$\Delta 3 + \Delta 8$	$\Delta 1 + \Delta 3 + \Delta 7$
$\Delta 7$	$\Delta 4 + \Delta 5$	$\Delta 1 + \Delta 3 + \Delta 8$
$\Delta 8$	$\Delta 4 + \Delta 6$	$\Delta 1 + \Delta 4 + \Delta 5$
$\Delta 1 + \Delta 2$	$\Delta 4 + \Delta 7$	$\Delta 1 + \Delta 4 + \Delta 6$
$\Delta 1 + \Delta 3$	$\Delta 4 + \Delta 8$	$\Delta 1 + \Delta 4 + \Delta 7$
$\Delta 1 + \Delta 4$	$\Delta 5 + \Delta 6$	$\Delta 1 + \Delta 4 + \Delta 8$
$\Delta 1 + \Delta 5$	$\Delta 5 + \Delta 7$	$\Delta 1 + \Delta 5 + \Delta 6$
$\Delta 1 + \Delta 6$	$\Delta 5 + \Delta 8$	$\Delta 1 + \Delta 5 + \Delta 7$
$\Delta 1 + \Delta 7$	$\Delta 6 + \Delta 7$	$\Delta 1 + \Delta 5 + \Delta 8$
$\Delta 1 + \Delta 8$	$\Delta 6 + \Delta 8$	$\Delta 1 + \Delta 6 + \Delta 7$
$\Delta 2 + \Delta 3$	$\Delta 7 + \Delta 8$	$\Delta 1 + \Delta 6 + \Delta 8$
$\Delta 2 + \Delta 4$	$\Delta 1 + \Delta 2 + \Delta 3$	$\Delta 1 + \Delta 7 + \Delta 8$
$\Delta 2 + \Delta 5$	$\Delta 1 + \Delta 2 + \Delta 4$	$\Delta 2 + \Delta 3 + \Delta 4$
$\Delta 2 + \Delta 6$	$\Delta 1 + \Delta 2 + \Delta 5$	$\Delta 2 + \Delta 3 + \Delta 5$
$\Delta 2 + \Delta 7$	$\Delta 1 + \Delta 2 + \Delta 6$	$\Delta 2 + \Delta 3 + \Delta 6$
$\Delta 2 + \Delta 3 + \Delta 7$	$\Delta 1 + \Delta 2 + \Delta 3 + \Delta 5$	$\Delta 1 + \Delta 6 + \Delta 7 + \Delta 8$
$\Delta 2 + \Delta 3 + \Delta 8$	$\Delta 1 + \Delta 2 + \Delta 3 + \Delta 6$	$\Delta 2 + \Delta 3 + \Delta 4 + \Delta 5$
$\Delta 2 + \Delta 4 + \Delta 5$	$\Delta 1 + \Delta 2 + \Delta 3 + \Delta 7$	$\Delta 2 + \Delta 3 + \Delta 4 + \Delta 6$
$\Delta 2 + \Delta 4 + \Delta 6$	$\Delta 1 + \Delta 2 + \Delta 3 + \Delta 8$	$\Delta 2 + \Delta 3 + \Delta 4 + \Delta 7$
$\Delta 2 + \Delta 4 + \Delta 7$	$\Delta 1 + \Delta 2 + \Delta 4 + \Delta 5$	$\Delta 2 + \Delta 3 + \Delta 4 + \Delta 8$
$\Delta 2 + \Delta 4 + \Delta 8$	$\Delta 1 + \Delta 2 + \Delta 4 + \Delta 6$	$\Delta 2 + \Delta 3 + \Delta 5 + \Delta 6$
$\Delta 2 + \Delta 5 + \Delta 6$	$\Delta 1 + \Delta 2 + \Delta 4 + \Delta 7$	$\Delta 2 + \Delta 3 + \Delta 5 + \Delta 7$
$\Delta 2 + \Delta 5 + \Delta 7$	$\Delta 1 + \Delta 2 + \Delta 4 + \Delta 8$	$\Delta 2 + \Delta 3 + \Delta 5 + \Delta 8$
$\Delta 2 + \Delta 5 + \Delta 8$	$\Delta 1 + \Delta 2 + \Delta 5 + \Delta 6$	$\Delta 2 + \Delta 3 + \Delta 6 + \Delta 7$
$\Delta 2 + \Delta 6 + \Delta 7$	$\Delta 1 + \Delta 2 + \Delta 5 + \Delta 7$	$\Delta 2 + \Delta 3 + \Delta 6 + \Delta 8$
$\Delta 2 + \Delta 6 + \Delta 8$	$\Delta 1 + \Delta 2 + \Delta 5 + \Delta 8$	$\Delta 2 + \Delta 3 + \Delta 7 + \Delta 8$
$\Delta 2 + \Delta 7 + \Delta 8$	$\Delta 1 + \Delta 2 + \Delta 6 + \Delta 7$	$\Delta 2 + \Delta 4 + \Delta 5 + \Delta 6$

$\Delta 1+\Delta 2+\Delta 3+\Delta 6+\Delta 7$	$\Delta 2+\Delta 3+\Delta 4+\Delta 6+\Delta 8$	$\Delta 1+\Delta 3+\Delta 4+\Delta 5+\Delta 6+\Delta 7$
$\Delta 1+\Delta 2+\Delta 3+\Delta 6+\Delta 8$	$\Delta 2+\Delta 3+\Delta 4+\Delta 7+\Delta 8$	$\Delta 1+\Delta 3+\Delta 4+\Delta 5+\Delta 6+\Delta 8$
$\Delta 1+\Delta 2+\Delta 3+\Delta 7+\Delta 8$	$\Delta 2+\Delta 3+\Delta 5+\Delta 6+\Delta 7$	$\Delta 1+\Delta 3+\Delta 4+\Delta 5+\Delta 7+\Delta 8$
$\Delta 1+\Delta 2+\Delta 4+\Delta 5+\Delta 6$	$\Delta 2+\Delta 3+\Delta 5+\Delta 6+\Delta 8$	$\Delta 1+\Delta 3+\Delta 4+\Delta 6+\Delta 7+\Delta 8$
$\Delta 1+\Delta 2+\Delta 4+\Delta 5+\Delta 7$	$\Delta 2+\Delta 3+\Delta 5+\Delta 7+\Delta 8$	$\Delta 1+\Delta 3+\Delta 5+\Delta 6+\Delta 7+\Delta 8$
$\Delta 1+\Delta 2+\Delta 4+\Delta 5+\Delta 8$	$\Delta 2+\Delta 3+\Delta 6+\Delta 7+\Delta 8$	$\Delta 1+\Delta 4+\Delta 5+\Delta 6+\Delta 7+\Delta 8$
$\Delta 1+\Delta 2+\Delta 4+\Delta 6+\Delta 7$	$\Delta 2+\Delta 4+\Delta 5+\Delta 6+\Delta 7$	$\Delta 2+\Delta 3+\Delta 4+\Delta 5+\Delta 6+\Delta 7$
$\Delta 1+\Delta 2+\Delta 4+\Delta 6+\Delta 8$	$\Delta 2+\Delta 4+\Delta 5+\Delta 6+\Delta 8$	$\Delta 2+\Delta 3+\Delta 4+\Delta 5+\Delta 6+\Delta 8$
$\Delta 1+\Delta 2+\Delta 4+\Delta 7+\Delta 8$	$\Delta 2+\Delta 4+\Delta 5+\Delta 7+\Delta 8$	$\Delta 2+\Delta 3+\Delta 4+\Delta 5+\Delta 7+\Delta 8$
$\Delta 1+\Delta 2+\Delta 5+\Delta 6+\Delta 7$	$\Delta 2+\Delta 4+\Delta 6+\Delta 7+\Delta 8$	$\Delta 2+\Delta 3+\Delta 4+\Delta 6+\Delta 7+\Delta 8$
$\Delta 1+\Delta 2+\Delta 5+\Delta 6+\Delta 8$	$\Delta 2+\Delta 5+\Delta 6+\Delta 7+\Delta 8$	$\Delta 2+\Delta 3+\Delta 5+\Delta 6+\Delta 7+\Delta 8$
$\Delta 1+\Delta 2+\Delta 5+\Delta 7+\Delta 8$	$\Delta 3+\Delta 4+\Delta 5+\Delta 6+\Delta 7$	$\Delta 2+\Delta 4+\Delta 5+\Delta 6+\Delta 7+\Delta 8$
$\Delta 1+\Delta 2+\Delta 6+\Delta 7+\Delta 8$	$\Delta 3+\Delta 4+\Delta 5+\Delta 6+\Delta 8$	$\Delta 3+\Delta 4+\Delta 5+\Delta 6+\Delta 7+\Delta 8$
$\Delta 1+\Delta 3+\Delta 4+\Delta 5+\Delta 6$	$\Delta 3+\Delta 4+\Delta 5+\Delta 7+\Delta 8$	$\Delta 1+\Delta 2+\Delta 3+\Delta 4+\Delta 5+\Delta 6+\Delta 7$
$\Delta 1+\Delta 3+\Delta 4+\Delta 5+\Delta 7$	$\Delta 3+\Delta 4+\Delta 6+\Delta 7+\Delta 8$	$\Delta 1+\Delta 2+\Delta 3+\Delta 4+\Delta 5+\Delta 6+\Delta 8$
$\Delta 1+\Delta 3+\Delta 4+\Delta 5+\Delta 8$	$\Delta 3+\Delta 5+\Delta 6+\Delta 7+\Delta 8$	$\Delta 1+\Delta 2+\Delta 3+\Delta 4+\Delta 5+\Delta 7+\Delta 8$
$\Delta 1+\Delta 3+\Delta 4+\Delta 6+\Delta 7$	$\Delta 4+\Delta 5+\Delta 6+\Delta 7+\Delta 8$	$\Delta 1+\Delta 2+\Delta 3+\Delta 4+\Delta 6+\Delta 7+\Delta 8$
$\Delta 1+\Delta 3+\Delta 4+\Delta 6+\Delta 8$	$\Delta 1+\Delta 2+\Delta 3+\Delta 4+\Delta 5+\Delta 6$	$\Delta 1+\Delta 2+\Delta 3+\Delta 5+\Delta 6+\Delta 7+\Delta 8$
$\Delta 1+\Delta 3+\Delta 4+\Delta 7+\Delta 8$	$\Delta 1+\Delta 2+\Delta 3+\Delta 4+\Delta 5+\Delta 7$	$\Delta 1+\Delta 2+\Delta 4+\Delta 5+\Delta 6+\Delta 7+\Delta 8$
$\Delta 1+\Delta 3+\Delta 5+\Delta 6+\Delta 7$	$\Delta 1+\Delta 2+\Delta 3+\Delta 4+\Delta 5+\Delta 8$	$\Delta 1+\Delta 3+\Delta 4+\Delta 5+\Delta 6+\Delta 7+\Delta 8$
$\Delta 1+\Delta 3+\Delta 5+\Delta 6+\Delta 8$	$\Delta 1+\Delta 2+\Delta 3+\Delta 4+\Delta 6+\Delta 7$	$\Delta 2+\Delta 3+\Delta 4+\Delta 5+\Delta 6+\Delta 7+\Delta 8$
$\Delta 1+\Delta 3+\Delta 5+\Delta 7+\Delta 8$	$\Delta 1+\Delta 2+\Delta 3+\Delta 4+\Delta 6+\Delta 8$	$\Delta 1+\Delta 2+\Delta 3+\Delta 4+\Delta 5+\Delta 6+\Delta 7+\Delta 8$

Для ясности, табл. 2 следует понимать следующим образом. При использовании в качестве примера функционального укороченного полипептида GDE человека, имеющего следующее сочетание делеций: " $\Delta 1+\Delta 2+\Delta 3$ ", функциональный укороченный полипептид GDE человека имеет делеций $\Delta 1$, $\Delta 2$ и $\Delta 3$ в сравнении с SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 41, как указано в табл. 1. Иными словами, в данном примере, если эталонная полноразмерная последовательность GDE представляет собой SEQ ID NO: 1, функциональный укороченный полипептид GDE человека " $\Delta 1+\Delta 2+\Delta 3$ " соответствует функциональному укороченному полипептиду GDE человека, полученному из SEQ ID NO: 1, который лишен всех последовательных аминокислот от положения 1 до 156, от положения 361 до 428 и от положения 668 до 769 применительно к SEQ ID NO: 1. Соответственно, если эталонная полноразмерная последовательность GDE представляет собой SEQ ID NO: 40, функциональный укороченный полипептид GDE человека " $\Delta 1+\Delta 2+\Delta 3$ " соответствует функциональному укороченному полипептиду GDE человека, полученному из SEQ ID NO: 40, который лишен всех последовательных аминокислот от положения 1 до 139, от положения 344 до 411 и от положения 651 до 752 применительно к SEQ ID NO: 40.

В конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека по изобретению имеет делеции $\Delta 2$ и $\Delta 3$, приведенные в табл. 1. В конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека по изобретению имеет делеции $\Delta 2$ и $\Delta 3$, приведенные в табл. 1, и получен из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 41, в частности, из SEQ ID NO: 1.

В конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека получен из SEQ ID NO: 1 и имеет:

- (i) делецию или сочетание делеций согласно табл. 2 в сравнении с SEQ ID NO: 1 и
- (ii) N-концевую делецию по меньшей мере одной аминокислоты и не более 132 аминокислот, вы-

довательных аминокислот, по меньшей мере 60 последовательных аминокислот, по меньшей мере 64 последовательных аминокислот, по меньшей мере 75 последовательных аминокислот, по меньшей мере 80 последовательных аминокислот, по меньшей мере 85 последовательных аминокислот, по меньшей мере 86 последовательных аминокислот, по меньшей мере 100 последовательных аминокислот, по меньшей мере 110 последовательных аминокислот, по меньшей мере 112 последовательных аминокислот или по меньшей мере 115 последовательных аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях 1-115 применительно к SEQ ID NO: 40.

В конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека получен из SEQ ID NO: 41 и имеет:

(i) делеции $\Delta 2$ и $\Delta 3$ согласно табл. 1 в сравнении с SEQ ID NO: 41 и

(ii) N-концевую делецию по меньшей мере одной аминокислоты и не более 115 аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях 1-115 применительно к SEQ ID NO: 41.

В конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека получен из SEQ ID NO: 41 и имеет:

(i) делецию или сочетание делеции согласно табл. 2 в сравнении с SEQ ID NO: 41 и

(ii) N-концевую делецию по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из аминокислот в положениях 1-116 применительно к SEQ ID NO: 41, предпочтительно по меньшей мере 10 последовательных аминокислот, по меньшей мере 14 последовательных аминокислот, по меньшей мере 15 последовательных аминокислот, по меньшей мере 25 последовательных аминокислот, по меньшей мере 50 последовательных аминокислот, по меньшей мере 60 последовательных аминокислот, по меньшей мере 65 последовательных аминокислот, по меньшей мере 75 последовательных аминокислот, по меньшей мере 80 последовательных аминокислот, по меньшей мере 85 последовательных аминокислот, по меньшей мере 87 последовательных аминокислот, по меньшей мере 100 последовательных аминокислот, по меньшей мере 110 последовательных аминокислот, по меньшей мере 113 последовательных аминокислот или по меньшей мере 116 последовательных аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях 1-116 применительно к SEQ ID NO: 41.

В конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека получен из SEQ ID NO: 41 и имеет:

(i) делеции $\Delta 2$ и $\Delta 3$ согласно табл. 1 в сравнении с SEQ ID NO: 41 и

(ii) N-концевую делецию по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из аминокислот в положениях 1-116 применительно к SEQ ID NO: 41, предпочтительно по меньшей мере 10 последовательных аминокислот, по меньшей мере 14 последовательных аминокислот, по меньшей мере 15 последовательных аминокислот, по меньшей мере 25 последовательных аминокислот, по меньшей мере 50 последовательных аминокислот, по меньшей мере 60 последовательных аминокислот, по меньшей мере 65 последовательных аминокислот, по меньшей мере 75 последовательных аминокислот, по меньшей мере 80 последовательных аминокислот, по меньшей мере 85 последовательных аминокислот, по меньшей мере 87 последовательных аминокислот, по меньшей мере 100 последовательных аминокислот, по меньшей мере 110 последовательных аминокислот, по меньшей мере 113 последовательных аминокислот или по меньшей мере 116 последовательных аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях 1-116 применительно к SEQ ID NO: 41.

В конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека имеет:

(i) делецию или сочетание делеций согласно табл. 2 в сравнении с SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 41, и

(ii) делецию, или сочетание делеций, выбранных из любых делеций, обозначенных $\Delta 9$, $\Delta 10$, $\Delta 11$, $\Delta 12$ и $\Delta 13$ в табл. 3, в сравнении с SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 41.

Таблица 3

Делеция	Положение удаленной аминокислоты в сравнении с SEQ ID NO: 1	Положение удаленной аминокислоты в сравнении с SEQ ID NO: 40	Положение удаленной аминокислоты в сравнении с SEQ ID NO: 41
$\Delta 9$	1-15	-	-
$\Delta 10$	1-30	1-13	1-14
$\Delta 11$	1-81	1-64	1-65
$\Delta 12$	1-103	1-86	1-87
$\Delta 13$	1-129	1-112	1-113

аминокислот от положения 1 до 280 применительно к SEQ ID NO: 1;

SEQ ID NO: 9: функционального укороченного полипептида GDE человека, имеющего делецию аминокислот от положения 1 до 425 применительно к SEQ ID NO: 1;

SEQ ID NO: 10: функционального укороченного полипептида GDE человека, имеющего делецию аминокислот от положения 1 до 230 применительно к SEQ ID NO: 1;

SEQ ID NO: 48: функционального укороченного полипептида GDE человека, имеющего первую делецию аминокислот от положения 1 до 15, вторую делецию аминокислот от положения 361 до 428 и третью делецию аминокислот от положения 668 до 769 применительно к SEQ ID NO: 1;

SEQ ID NO: 49: функционального укороченного полипептида GDE человека, имеющего первую делецию аминокислот от положения 1 до 30, вторую делецию аминокислот от положения 361 до 428 и третью делецию аминокислот от положения 668 до 769 применительно к SEQ ID NO: 1;

SEQ ID NO: 50: функционального укороченного полипептида GDE человека, имеющего первую делецию аминокислот от положения 1 до 81, вторую делецию аминокислот от положения 361 до 428 и третью делецию аминокислот от положения 668 до 769 применительно к SEQ ID NO: 1;

SEQ ID NO: 51: функционального укороченного полипептида GDE человека, имеющего первую делецию аминокислот от положения 1 до 103, вторую делецию аминокислот от положения 361 до 428 и третью делецию аминокислот от положения 668 до 769 применительно к SEQ ID NO: 1; и

SEQ ID NO: 52: функционального укороченного полипептида GDE человека, имеющего первую делецию аминокислот от положения 1 до 129, вторую делецию аминокислот от положения 361 до 428 и третью делецию аминокислот от положения 668 до 769 применительно к SEQ ID NO: 1.

В следующем конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека по изобретению выбирают из группы, состоящей из:

SEQ ID NO: 2: функционального укороченного полипептида GDE человека, имеющего делецию аминокислот от положения 1 до 156 применительно к SEQ ID NO: 1;

SEQ ID NO: 3: функционального укороченного полипептида GDE человека, имеющего делецию аминокислот от положения 361 до 428 применительно к SEQ ID NO: 1;

SEQ ID NO: 4: функционального укороченного полипептида GDE человека, имеющего делецию аминокислот от положения 668 до 769 применительно к SEQ ID NO: 1;

SEQ ID NO: 5: функционального укороченного полипептида GDE человека, имеющего первую делецию аминокислот от положения 361 до 428 и вторую делецию аминокислот от положения 668 до 769 применительно к SEQ ID NO: 1;

SEQ ID NO: 6: функционального укороченного полипептида GDE человека, имеющего делецию аминокислот от положения 895 до 1087 применительно к SEQ ID NO: 1;

SEQ ID NO: 7: функционального укороченного полипептида GDE человека, имеющего первую делецию аминокислот от положения 223 до 320, вторую делецию аминокислот от положения 360 до 428 и третью делецию аминокислот от положения 669 до 720 применительно к SEQ ID NO: 1;

SEQ ID NO: 8: функционального укороченного полипептида GDE человека, имеющего делецию аминокислот от положения 1 до 280 применительно к SEQ ID NO: 1;

SEQ ID NO: 9: функционального укороченного полипептида GDE человека, имеющего делецию аминокислот от положения 1 до 425 применительно к SEQ ID NO: 1; и

SEQ ID NO: 10: функционального укороченного полипептида GDE человека, имеющего делецию аминокислот от положения 1 до 230 применительно к SEQ ID NO: 1.

Если делеция представляет собой N-концевую делецию, на N-конце последовательности может быть добавлен метионин. Например, SEQ ID NO: 9 имеет делецию аминокислот от положения 1 до 425 применительно к SEQ ID NO: 1 и добавленный метионин на N-конце последовательности вследствие данной делеции. В настоящей заявке раскрыты все функциональные укороченные формы GDE, конкретно описанные в настоящем документе, при этом указанные функциональные укороченные формы GDE имеют остаток метионина на их N-конце.

В следующем конкретном варианте осуществления функциональный укороченный полипептид GDE человека по изобретению содержит или состоит из последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2-10 и SEQ ID NO: 48-52, в частности, последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2-10, в частности, последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, более конкретно, SEQ ID NO: 5. Функциональный укороченный полипептид GDE человека может иметь одну или более аминокислотных модификаций, таких как вставка, делеция и/или замена аминокислот, в сравнении с SEQ ID NO: 2-10 и SEQ ID NO: 48-52, в частности, последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 2-10, в частности, последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, более конкретно SEQ ID NO: 5. В частности, функциональный укороченный полипептид GDE человека может иметь 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных модификаций в сравнении с SEQ ID NO: 2-10 и SEQ ID NO: 48-52, в частности, последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 2-10, в частности, последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, более конкретно SEQ ID NO: 5. В частности, функциональный укороченный полипептид GDE человека может иметь по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98

или по меньшей мере 99 процентную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2-10 и SEQ ID NO: 48-52, в частности, последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 2-10, в частности, последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, более конкретно SEQ ID NO: 5.

Во втором варианте осуществления первого аспекта изобретения мини-GDE представляет собой функциональный не принадлежащий человеку полипептид GDE.

Функциональный не принадлежащий человеку полипептид GDE по изобретению может представлять собой любой полипептид GDE, кодирующая последовательность которого достаточно мала, чтобы быть упакованной в генно-терапевтический вектор, в частности, в AAV вектор. Действительно, авторы настоящего изобретения показали, что не принадлежащие человеку полипептиды GDE, кодирующая последовательность которых короче, чем кодирующая последовательность природного GDE человека, могут быть использованы для лечения GSD III при помощи генно-терапевтических векторов. В конкретном варианте осуществления функциональный не принадлежащий человеку полипептид GDE содержит менее примерно 1500, 1480, 1460, 1440, 1420, 1400, 1380, 1360, 1340, 1320, 1300, 1280, 1260, 1240, 1220, 1200, 1180, 1160, 1140, 1120, 1100, 1080, 1060, 1040, 1020 или менее примерно 1000 аминокислот. В конкретном варианте осуществления функциональный не принадлежащий человеку полипептид GDE содержит примерно от 1000 до 1500 аминокислот, примерно от 1000 до 1300 аминокислот, примерно от 1300 до 1500 аминокислот или примерно от 1300 до 1400 аминокислот.

В соответствии с изобретением, функциональный не принадлежащий человеку полипептид GDE по изобретению сохраняет биологическую функцию полипептида GDE человека, описанную выше. В частности, не принадлежащий человеку полипептид GDE способен устранять накопление гликогена и восстанавливать мышечную силу *in vivo*.

Аминокислотная последовательность функционального не принадлежащего человеку полипептида GDE, или его кодирующая последовательность, могут быть получены из любого не являющегося человеком эукариотического источника, например, из дрожжей или не являющихся людьми животных, включая виды отличных от человека млекопитающих или птиц. В конкретном варианте осуществления функциональный не принадлежащий человеку полипептид GDE представляет собой полипептид GDE не являющегося человеком млекопитающего.

Кроме того, не принадлежащий человеку полипептид GDE может представлять собой функциональный вариант не принадлежащего человеку полипептида GDE дикого типа, имеющий одну или более аминокислотных модификаций, таких как вставка, делеция и/или замена аминокислот, в сравнении с эталонным природным полипептидом GDE. Например, не принадлежащий человеку полипептид GDE может представлять собой функциональное производное не принадлежащего человеку полипептида GDE, в частности, полипептид GDE животного, отличного от человека, например, полипептиды с SEQ ID NO: 11 - SEQ ID NO: 17, имеющие по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или по меньшей мере 99 процентную идентичность последовательности с этими полипептидами GDE животных.

В конкретном варианте осуществления функциональный не принадлежащий человеку полипептид GDE, или его кодирующую последовательность, получают от лошади, гориллы, орангутана, *Pteropus alecto*, красноголового мангабея, утконоса, утки или тасманийского дьявола.

В конкретном варианте осуществления не принадлежащий человеку полипептид GDE выбирают из группы, состоящей из: полипептида GDE лошади с SEQ ID NO: 11, полипептида GDE гориллы с SEQ ID NO: 12, полипептида GDE орангутана с SEQ ID NO: 13, полипептида GDE *Pteropus alecto* с SEQ ID NO: 14, полипептида GDE красноголового мангабея с SEQ ID NO: 15, полипептида GDE утконоса с SEQ ID NO: 16 и полипептида GDE утки с SEQ ID NO: 17.

В следующем конкретном варианте осуществления не принадлежащий человеку полипептид GDE представляет собой полипептид GDE гориллы, в частности, полипептид GDE гориллы с SEQ ID NO: 12.

В другом аспекте изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид мини-GDE по изобретению.

Термин "молекула нуклеиновой кислоты" (или нуклеотидная последовательность) относится к молекуле ДНК или РНК в одно- или двухцепочечной форме, в частности, ДНК, кодирующей функциональный укороченный полипептид GDE человека или функциональный не принадлежащий человеку полипептид GDE по изобретению.

В соответствии с настоящим изобретением, молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид мини-GDE, достаточно мала, чтобы быть упакованной в генно-терапевтический вектор, при этом генно-терапевтический вектор является таким, как описано выше. В предпочтительном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид мини-GDE, достаточно мала, чтобы быть упакованной в AAV вектор. Предпочтительно, размер молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид мини-GDE, составляет менее примерно 5, 4,7, 4,5, 4,2, 4,1, 4, 3,7, 3,5, 3,2, 3, 2,7, 2,5, 2,2, 2 или 1,5 т.п.н. Предпочтительно, молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид мини-GDE, имеет размер менее примерно 4,1 т.п.н.

Последовательность молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению, кодирующей полипептид мини-GDE, может быть оптимизирована для экспрессии полипептида GDE *in vivo*. Оптимизация после-

довательности может включать ряд изменений в нуклеотидной последовательности, включая оптимизацию кодонов, увеличение содержания GC, уменьшение числа островков CpG, уменьшение числа альтернативных открытых рамок считывания (ARF) и уменьшение числа сайтов донора сплайсинга и сайтов акцептора сплайсинга. Вследствие вырожденности генетического кода разные молекулы нуклеиновой кислоты могут кодировать один и тот же белок. Также хорошо известно, что генетические коды разных организмов часто имеют предрасположенность к использованию одного из нескольких кодонов, кодирующих одну и ту же аминокислоту, относительно других. За счет оптимизации кодонов в нуклеотидную последовательность вносят изменения с целью использования предрасположенности к использованию кодонов, существующей в конкретном клеточном контексте, так что полученная кодон-оптимизированная нуклеотидная последовательность с большей вероятностью экспрессируется в таком конкретном клеточном контексте на более высоком уровне в сравнении с не кодон-оптимизированной последовательностью. В предпочтительном варианте осуществления изобретения такая оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид мини-GDE, кодон-оптимизирована для повышения ее экспрессии в человеческих клетках в сравнении с не кодон-оптимизированными нуклеотидными последовательностями, кодирующими тот же полипептид мини-GDE, например, за счет использования специфической предрасположенности к использованию кодонов в организме человека. Нуклеотидная последовательность, кодирующая полноразмерную изоформу 1 GDE человека, приведена в SEQ ID NO: 37. Примеры соответствующей кодон-оптимизированной последовательности приведены в виде SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 39.

В конкретном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты по изобретению содержит или состоит из:

последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 18, кодирующей функциональный укороченный полипептид GDE человека, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2;

последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 20, кодирующей функциональный укороченный полипептид GDE человека, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3;

последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 21, кодирующей функциональный укороченный полипептид GDE человека, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4;

последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 22, кодирующей функциональный укороченный полипептид GDE человека, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5;

последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 24, кодирующей функциональный укороченный полипептид GDE человека, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6;

последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 26, кодирующей функциональный укороченный полипептид GDE человека, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7;

последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 27, кодирующей функциональный укороченный полипептид GDE человека, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8;

последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 28, кодирующей функциональный укороченный полипептид GDE человека, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9;

последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 29, кодирующей функциональный укороченный полипептид GDE человека, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10;

последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 59, кодирующей функциональный укороченный полипептид GDE человека, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 48;

последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 54 или SEQ ID NO: 60, кодирующей функциональный укороченный полипептид GDE человека, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 49;

последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 55 или SEQ ID NO: 61, кодирующей функциональный укороченный полипептид GDE человека, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 50;

последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 56 или SEQ ID NO: 62, кодирующей функциональный укороченный полипептид GDE человека, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 51; или

последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 57 или SEQ ID NO: 63, кодирующей функциональный укороченный полипептид GDE человека, имеющий аминокислотную последовательность, приве-

денную в SEQ ID NO: 52.

В следующем конкретном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты по изобретению содержит или состоит из:

последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 18, кодирующей функциональный укороченный полипептид GDE человека, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2;

последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 20, кодирующей функциональный укороченный полипептид GDE человека, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3;

последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 21, кодирующей функциональный укороченный полипептид GDE человека, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4;

последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 22, кодирующей функциональный укороченный полипептид GDE человека, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5;

последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 24, кодирующей функциональный укороченный полипептид GDE человека, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6;

последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 26, кодирующей функциональный укороченный полипептид GDE человека, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7;

последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 27, кодирующей функциональный укороченный полипептид GDE человека, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8;

последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 28, кодирующей функциональный укороченный полипептид GDE человека, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9; или

последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 29, кодирующей функциональный укороченный полипептид GDE человека, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10.

Как уже упомянуто, вышеприведенные последовательности могут быть кодон-оптимизированы. Последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 25, являются примерами кодон-оптимизированных последовательностей, соответствующих SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 24, соответственно.

В другом конкретном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты по изобретению содержит или состоит из:

последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 30, кодирующей не принадлежащий человеку полипептид GDE, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11;

последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 31, кодирующей не принадлежащий человеку полипептид GDE, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12;

последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 32, кодирующей не принадлежащий человеку полипептид GDE, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13;

последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 33, кодирующей не принадлежащий человеку полипептид GDE, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14;

последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 34, кодирующей не принадлежащий человеку полипептид GDE, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15;

последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 35, кодирующей не принадлежащий человеку полипептид GDE, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 16; или

последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 36, кодирующей не принадлежащий человеку полипептид GDE, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17.

Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид мини-GDE, описанный выше, может иметь по меньшей мере 90 или по меньшей мере 95-процентную идентичность с любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 18-26. В конкретном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид мини-GDE, описанный выше, может иметь по меньшей мере 90 или по меньшей мере 95-процентную идентичность с любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 18-36 и SEQ ID NO: 53-57. В конкретном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты по изобретению имеет по меньшей мере 95-процентную идентичность, например, по меньшей мере 96, 97, 98, 99 или 100-процентную идентичность с любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 18-36. В следующем конкретном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты по изобретению имеет по меньшей мере 95-процентную идентичность, например, по меньшей мере 96, 97, 98, 99 или 100-процентную идентичность с любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 18-36 и SEQ ID NO: 53-57.

Термин "идентичные", и его грамматические варианты, относится к идентичности последовательностей между двумя молекулами нуклеиновой кислоты или между двумя полипептидными молекулами. Если положение в обеих из двух сравниваемых последовательностей занято одним и тем же основанием или одной и той же аминокислотой, то молекулы идентичны в данном положении. Процентную идентичность между двумя последовательностями определяют как число совпадающих положений в двух последовательностях, деленное на число сравниваемых положений $\times 100$. Например, если 6 из 10 положений в двух последовательностях совпадают, то две последовательности идентичны на 60%. Как правило, сравнение производят, когда две последовательности выровнены для достижения максимальной идентичности. Для выравнивания нуклеотидных последовательностей могут быть использованы различные инструменты биоинформатики, известные специалистам в данной области, такие как BLAST или FASTA.

Изобретение также относится к конструкту нуклеиновой кислоты, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению. Конструкт нуклеиновой кислоты может представлять собой экспрессионную кассету, содержащую нуклеотидную последовательность по изобретению, функционально связанную с одной или более последовательностями контроля экспрессии и/или другими последовательностями, улучшающими экспрессию. Используемый в настоящем документе термин "функционально связанные" относится к связи полинуклеотидных элементов в функциональном отношении. Нуклеиновая кислота является "функционально связанной", когда она находится в функциональном взаимодействии с другой нуклеотидной последовательностью. Например, промотор, или другая последовательность регуляции транскрипции, функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию кодирующей последовательности. Такие последовательности контроля экспрессии известны в данной области, например, промоторы, энхансеры (такие как цис-регуляторные модули (CRM)), интроны, сигналы полиА и так далее.

В конкретном варианте осуществления экспрессионная кассета может включать промотор. Промотор может быть универсальным или специфичным для ткани промотором, в частности, промотором, способным стимулировать экспрессию в клетках или тканях, в которых экспрессия GDE желательна, например, в клетках или тканях, в которых экспрессия GDE желательная для пациентов с недостаточностью GDE.

В конкретном варианте осуществления промотор представляет собой мышечно-специфичный промотор. Неограничивающие примеры мышечно-специфичных промоторов включают промотор мышечной креатинкиназы (МСК). Неограничивающими примерами подходящих промоторов мышечной креатинкиназы являются промоторы мышечных креатинкиназ человека и промоторы укороченных мышечных креатинкиназ [промоторы (tMCK)] (Wang B et al., Construction and analysis of compact muscle-selective promoters for AAV vectors. *Gene Ther.* 2008 Nov; 15(22): 1489-99) (репрезентативный регистрационный № GenBank AF188002). Мышечная креатинкиназа человека имеет идентификационный геновый № 1158 (репрезентативный регистрационный № GenBank NC_000019.9, доступ 26 декабря 2012 г.). Другие примеры мышечно-специфичных промоторов включают синтетический промотор C5.12 (spC5.12, альтернативно называемый в настоящем документе "C5.12"), такой как промотор spC5.12 или spC5.12 (описанный в Wang et al., *Gene Therapy* volume 15, pages 1489-1499 (2008)), промотор МНСК7 (Salva et al. *Mol Ther.* 2007 Feb;15(2):320-9), промоторы легких цепей миозина (MLC), например, MLC2 (геновый № 4633; репрезентативный регистрационный № GenBank NG_007554.1, доступ 26 декабря 2012 г.); промоторы тяжелых цепей миозина (МНС), например, альфа-МНС (геновый № 4624; репрезентативный регистрационный № GenBank NG_023444.1, доступ 26 декабря 2012 г.); промоторы десмина (геновый № 1674; репрезентативный регистрационный № GenBank NG_008043.1, доступ 26 декабря 2012 г.); промоторы сердечного тропонина С (геновый № 7134; репрезентативный регистрационный № GenBank NG_008963.1, доступ 26 декабря 2012 г.); промоторы тропонина I (геновые №№ 7135, 7136 и 7137; репрезентативные регистрационные №№ GenBank NG_016649.1, NG_011621.1 и NG_007866.2, доступ 26 декабря 2012 г.); промоторы семейства генов myoD (Weintraub et al., *Science*, 251, 761 (1991); геновый № 4654; репрезентативный регистрационный № GenBank NM_002478, доступ 26 декабря 2012 г.); промоторы альфа-актина (геновые №№ 58, 59 и 70; репрезентативные регистрационные №№ GenBank NG_006672.1, NG_011541.1 и NG_007553.1, доступ 26 декабря 2012 г.); промоторы бета-актина (геновый № 60; репрезентативный регистрационный № GenBank NG_007992.1, доступ 26 декабря 2012 г.); промоторы гамма-актина (геновый № 71 и 72; репрезентативный регистрационный № GenBank NG_011433.1 и NM_001199893, доступ 26 декабря 2012 г.); мышечно-специфичные промоторы, находящиеся внутри интрона 1 глазной формы Pitx3 (геновый № 5309) (Coulon et al.; мышечно-избирательный промотор соответствует остаткам 11219-11527 для репрезентативного регистрационного № GenBank NG_008147, доступ 26 декабря 2012 г.); и промоторы, описанные в публикации патента США US 2003/0157064, а также промоторы СК6 (Wang et al., 2008 doi: 10.1038/gt.2008.104). В другом конкретном варианте осуществления мышечно-специфичный промотор представляет собой промотор E-Syn, описанный в Wang et al., *Gene Therapy* volume 15, pages 1489-1499 (2008), включающий сочетание энхансера из МСК и промотора spC5.12. В конкретном варианте осуществления изобретения мышечно-специфичный промотор выбирают из группы, состоящей из промотора spC5.12, промотора МНСК7, промотора E-syn, промотора мышечной креатинкиназы, промо-

тора легкой цепи миозина (MLC), промотора тяжелой цепи миозина (MHC), промотора сердечного тропонина С, промотора тропонина I, промотора семейства генов *myoD*, промотора альфа-актина, промотора бета-актина, промотора гамма-актина, мышечно-специфичного промотора, находящегося внутри интрона 1 глазной формы *Pitx3*, промотора СК6, промотора СК8 и промотора *Acta1*. В конкретном варианте осуществления мышечно-специфичный промотор выбирают из группы, состоящей из промоторов *spC5.12*, десмина и МСК. В следующем варианте осуществления мышечно-специфичный промотор выбирают из группы, состоящей из промоторов *spC5.12* и МСК. В конкретном варианте осуществления мышечно-специфичный промотор представляет собой промотор *spC5.12*.

В конкретном варианте осуществления промотор представляет собой печень-специфичный промотор. Неограничивающие примеры печень-специфичных промоторов включают промотор альфа-1-антитрипсина (*hAAT*), промотор транстиретиона, промотор альбумина, промотор тироксинсвязывающего глобулина (*TBG*), промотор *LSP* (включающий последовательность промотора тироксинсвязывающего глобулина, две копии последовательности энхансера альфа-1-микроглобулина/бикуннина и лидерную последовательность (Ill, C. R., et al. (1997). Optimization of the human factor VIII complementary DNA expression plasmid for gene therapy of hemophilia A. *Blood Coag. Fibrinol.* 8: S23-S30.) и так далее. Другие полезные печень-специфичные промоторы известны в данной области, например, те, которые перечислены в Базе данных печень-специфичных промоторов генов, собранной в Cold Spring Harbor Laboratory (<http://rulai.cshl.edu/LSPD/>). Предпочтительным печень-специфичным промотором в контексте изобретения является промотор *hAAT*.

В другом конкретном варианте осуществления промотор представляет собой нейрон-специфичный промотор. Неограничивающие примеры нейрон-специфичных промоторов включают, но без ограничения, следующие: промотор синапсина-1 (*Syn*), нейрон-специфичный промотор энолазы (*NSE*) (Andersen et al., *Cell. Mol. Neurobiol.*, 13:503-15 (1993)), промотор гена легкой цепи нервного волокна (Piccioli et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:5611-5 (1991)) и нейрон-специфичный промотор гена *vgf* (Piccioli et al. *Neuron*, 15:373- 84 (1995)), в числе прочих, как известно специалисту в данной области. В конкретном варианте осуществления нейрон-специфичный промотор представляет собой промотор *Syn*. Другие нейрон-специфичные промоторы включают, без ограничения: промотор синапсина-2, промотор тирозингидроксилазы, промотор дофамин-Р-гидроксилазы, промотор гипоксантин-фосфорибозилтрансферазы, промотор низкоаффинного рецептора *NGF* и промотор холинацетилтрансферазы (Bejanin et al., 1992; Carroll et al., 1995; Chin and Greengard, 1994; Foss-Petter et al., 1990; Harrington et al., 1987; Mercer et al., 1991; Patei et al., 1986). Репрезентативные промоторы, специфичные для двигательных нейронов, включают, без ограничения, промотор пептида, связанного с геном кальцитонина (*CGRP*), известного фактора двигательных нейронов. Другие промоторы, функциональные в двигательных нейронах, включают промоторы холинацетилтрансферазы (*ChAT*), нейрон-специфичной энолазы (*NSE*), синапсина и *Hb9*. Другие нейрон-специфичные промоторы, полезные по настоящему изобретению, включают, без ограничения: *GFAP* (для астроцитов), кальбиндина 2 (для интернейронов), *Mnx1* (двигательные нейроны), нестина (нейроны), парвальбумина, соматостатина и *P1p1* (олигодендроциты и шванновские клетки).

В другом конкретном варианте осуществления промотор представляет собой универсальный промотор. Репрезентативные универсальные промоторы включают энхансер цитомегаловируса/промотор куриного бета-актина (*CAG*), энхансер/промотор цитомегаловируса (*CMV*) (необязательно, с энхансером *CMV*) [смотри, например, Boshart et al., *Cell*, 41:521-530 (1985)], промотор *PGK*, ранний промотор *SV40*, ретровирусный *LTR* промотор вируса саркомы Рауса (*RSV*) (необязательно, с энхансером *RSV*), промотор дигидрофолатредуктазы, промотор β -актина, промотор фосфоглицеринкиназы (*PGK*) и промотор *EF1-альфа*.

Кроме того, промотор также может представлять собой эндогенный промотор, такой как промотор альбумина или промотор *GDE*.

В конкретном варианте осуществления промотор связан с последовательностью энхансера, такой как *cis*-регуляторный модуль (*CRM*) или искусственная последовательность энхансера. *CRM*, полезные при использовании на практике настоящего изобретения, включают те, которые описаны в Rincon et al., *Mol Ther.* 2015 Jan; 23(1):43-52, Chuah et al., *Mol Ther.* 2014 Sep;22(9): 1605-13 или Nair et al., *Blood.* 2014 May 15; 123(20):3195-9. Другими регуляторными элементами, которые, в частности, способны усиливать мышечно-специфичную экспрессию генов, в частности, экспрессию в сердечной мышце и/или скелетной мышце, являются те, которые раскрыты в WO2015110449. Конкретные примеры регуляторных элементов нуклеиновой кислоты, которые содержат искусственную последовательность, включают регуляторные элементы, полученные путем реаранжировки сайтов, связывающих фактор транскрипции (*TFBS*), которые присутствуют в последовательностях, раскрытых в WO2015110449. Указанная реаранжировка может включать изменение порядка *TFBS* и/или изменение положения одного или более *TFBS* относительно других *TFBS*, и/или изменение числа копий одного или более *TFBS*. Например, регуляторный элемент нуклеиновой кислоты для усиления мышечно-специфичной экспрессии гена, в частности, специфичной экспрессии гена в сердечной и скелетной мышце, может включать сайты связывания для *E2A*, *NNH 1*, *NF1*, *C/EBP*, *LRF*, *MyoD* и *SREBP*; или для *E2A*, *NF1*, *p53*, *C/EBP*, *LRF* и *SREBP*; или для *E2A*, *NNH 1*, *HNF3a*, *HNF3b*, *NF1*, *C/EBP*, *LRF*, *MyoD* и *SREBP*; или для *E2A*, *HNF3a*, *NF1*, *C/EBP*, *LRF*, *MyoD*

и SREBP; или для E2A, HNF3a, NF1, C/EBP, LRF, MyoD и SREBP; или для HNF4, NF1, RSRFC4, C/EBP, LRF и MyoD, или для NF1, PPAR, p53, C/EBP, LRF и MyoD. Например, регуляторный элемент нуклеиновой кислоты для усиления мышечно-специфичной экспрессии гена, в частности, специфичной экспрессии гена в скелетной мышце, также может включать сайты связывания для E2A, NF1, SRFC, p53, C/EBP, LRF и MyoD; или для E2A, NF1, C/EBP, LRF, MyoD и SREBP; или для E2A, HNF3a, C/EBP, LRF, MyoD, SEREBP и Ta11_b; или для E2A, SRF, p53, C/EBP, LRF, MyoD и SREBP; или для HNF4, NF1, RSRFC4, C/EBP, LRF и SREBP; или для E2A, HNF3a, HNF3b, NF1, SRF, C/EBP, LRF, MyoD и SREBP; или для E2A, C/EBP и MyoD. В других примерах эти регуляторные элементы нуклеиновой кислоты включают по меньшей мере две, например, 2, 3, 4 или более копий одного или более TFBS, перечисленных ранее. Другими регуляторными элементами, которые, в частности, способны усиливать печень-специфичную экспрессию генов, являются те, которые раскрыты в WO2009130208.

В другом конкретном варианте осуществления конструкт нуклеиновой кислоты содержит интрон, в частности, интрон, помещенный между промотором и кодирующей последовательностью GDE. Интрон может быть введен для повышения стабильности мРНК и продуцирования белка. В следующем варианте осуществления интрон представляет собой интрон человеческого бета-глобина b2 (или HBB2), интрон фактора коагуляции IX (FIX), интрон SV40, интрон A hCMV (hCMVI), интрон TPL (TPLI), интрон 1 гена CHEF1 (CHEFI), интрон MVM (Wu et al., 2008), укороченный интрон 1 FIX (Wu et al., 2008, Mol Ther, 16(2):280-289; Kurachi et al., 1995, J Biol Chem., 270(10):5276-5281), гибридный интрон β -глобина/тяжелой цепи иммуноглобулина (5'-донорский сайт из интрона человеческого β -глобина и 3'-акцепторный сайт из интрона вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина, Wu et al., 2008, Mol Ther, 16(2):280-289; Kurachi et al., 1995, J Biol Chem., 270(10):5276-5281), гибридный интрон, состоящий из аденовирусного донора сплайсинга и акцептора сплайсинга иммуноглобулина G (Wong et al., 1985, Chromosoma, 92(2): 124-135; Yew et al., 1997, Hum Gene Ther, 8(5):575-584; Choi T. et al., 1991, Mol Cell Biol, 11(6):3070-3074; Huang et al., 1990, Mol Cell Biol., 10(4):1805-1810), гибридный интрон 19S/16S SV40 (5'-донорский сайт из интрона 19S и 3'-акцепторный сайт из интрона 16S, Yew et al., 1997, Hum Gene Ther, 8(5):575-584) или интрон куриного бета-глобина. В следующем варианте осуществления интрон представляет собой модифицированный интрон (в частности, модифицированный интрон HBB2 или FIX), спроектированный для уменьшения числа, или полного удаления, альтернативных открытых рамок считывания (ARF), имеющихся в указанном интроне. Предпочтительно, удаляют ARF, длина которых превышает 50 п.н. и которые имеют стоп-кодон в рамке с иницирующим кодоном. ARF могут быть удалены путем модификации последовательности интрона. Например, модификацию можно осуществлять путем замены, вставки или делеции нуклеотидов, предпочтительно, путем замены нуклеотидов. В качестве иллюстрации, один или более нуклеотидов, в частности, один нуклеотид, в иницирующем кодоне ATG или GTG, имеющемся в последовательности интересующего интрона, может быть заменен, результатом чего является не иницирующий кодон. Например, ATG или GTG могут быть заменены на CTG, который не является иницирующим кодоном, в последовательности интересующего интрона.

Классический интрон HBB2 имеет последовательность SEQ ID NO: 42. Например, этот интрон HBB2 может быть модифицирован путем элиминации иницирующих кодонов (кодонов ATG и GTG) в указанном интроне. В конкретном варианте осуществления модифицированный интрон HBB2 имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 43. Классический интрон FIX получен из первого интрона FIX человека и имеет последовательность SEQ ID NO: 44. Интрон FIX может быть модифицирован путем элиминации иницирующих кодонов (кодонов ATG и GTG) в указанном интроне. В конкретном варианте осуществления модифицированный интрон FIX имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 45. Классический интрон куриного бета-глобина, используемый в конструктах нуклеиновых кислот, имеет последовательность SEQ ID NO: 46. Интрон куриного бета-глобина может быть модифицирован путем элиминации иницирующих кодонов (кодонов ATG и GTG) в указанном интроне. В конкретном варианте осуществления модифицированный интрон куриного бета-глобина имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 47.

Авторы изобретения ранее продемонстрировали в WO2015/162302, что такой модифицированный интрон, в частности, модифицированный интрон HBB2 или FIX, имеет преимущества и может значительно повышать экспрессию трансгена.

В конкретном варианте осуществления конструкт нуклеиновой кислоты по изобретению представляет собой экспрессионную кассету, содержащую, в 5'-3' ориентации, промотор, которому, необязательно, предшествует энхансер, кодирующую последовательность по изобретению (то есть, молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид мини-GDE) и сигнал полиаденилирования, такой как сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (bGH полиА), сигнал полиаденилирования SV40 или другой природный или искусственный сигнал полиаденилирования. В частности, сигнал полиаденилирования представляет собой bGH полиА. В предпочтительном варианте осуществления очень короткий сигнал полиА является предпочтительным. Например, очень короткий сигнал полиА, содержащий менее 20 нуклеотидов, является предпочтительным. В конкретном варианте осуществления сигнал полиадени-

лирования представляет собой сигнал полиаденилирования человеческого растворимого нейропилина-1 (sNRP) (sNRP полиА; SEQ ID NO: 58).

В конкретном варианте осуществления конструкт нуклеиновой кислоты по изобретению представляет собой экспрессионную кассету, содержащую, в 5'-3' ориентации, промотор, которому, необязательно, предшествует энхансер, интрон, кодирующую последовательность по изобретению и сигнал полиаденилирования. В другом варианте осуществления конструкт нуклеиновой кислоты по изобретению представляет собой экспрессионную кассету, содержащую, в 5'-3' ориентации, промотор, кодирующую последовательность по изобретению и сигнал полиаденилирования. В другом варианте осуществления конструкт нуклеиновой кислоты по изобретению представляет собой экспрессионную кассету, содержащую, в 5'-3' ориентации, энхансер, промотор, кодирующую последовательность по изобретению и сигнал полиаденилирования. В другом варианте осуществления конструкт нуклеиновой кислоты по изобретению представляет собой экспрессионную кассету, содержащую, в 5'-3' ориентации, промотор SpC5-12, кодирующую последовательность по изобретению и сигнал полиаденилирования (такой как bGH полиА или sNRP полиА, в частности, bGH полиА). В другом варианте осуществления конструкт нуклеиновой кислоты по изобретению представляет собой экспрессионную кассету, содержащую, в 5'-3' ориентации, энхансер, промотор SpC5-12, кодирующую последовательность по изобретению и сигнал полиаденилирования (такой как bGH полиА или sNRP полиА, в частности, bGH полиА). В следующем конкретном варианте осуществления конструкт нуклеиновой кислоты по изобретению представляет собой экспрессионную кассету, содержащую, в 5'-3' ориентации, энхансер, промотор, интрон, кодирующую последовательность по изобретению и сигнал полиА. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения экспрессионная кассета содержит, в 5'-3' ориентации, промотор, необязательно, интрон, кодирующую последовательность по изобретению и сигнал полиА. В следующем конкретном варианте осуществления экспрессионная кассета содержит, в 5'-3' ориентации: промотор SpC5-12; интрон SV40; последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 52, в частности, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, в частности, SEQ ID NO: 5; и bGH полиА. В следующем конкретном варианте осуществления конструкт нуклеиновой кислоты по изобретению представляет собой экспрессионную кассету, содержащую, в 5'-3' ориентации, промотор, кодирующую последовательность по изобретению и сигнал полиаденилирования. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения экспрессионная кассета содержит, в 5'-3' ориентации, энхансер, промотор, кодирующую последовательность по изобретению и сигнал полиА. В следующем конкретном варианте осуществления экспрессионная кассета содержит, в 5'-3' ориентации: промотор SpC5-12;

последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 52, в частности, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, в частности, SEQ ID NO: 5; и bGH полиА или sNRP полиА, в частности, bGH полиА. В другом варианте осуществления экспрессионная кассета содержит, в 5'-3' ориентации: промотор CMV; интрон SV40; последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 52, в частности, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, в частности, SEQ ID NO: 5; и bGH полиА. В другом варианте осуществления экспрессионная кассета содержит, в 5'-3' ориентации: промотор CMV; последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 52, в частности, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, в частности, SEQ ID NO: 5; и bGH полиА или sNRP полиА, в частности, bGH полиА. В следующем конкретном варианте осуществления экспрессионная кассета содержит, в 5'-3' ориентации: промотор SpC5-12; интрон SV40; последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; и bGH полиА. В следующем конкретном варианте осуществления экспрессионная кассета содержит, в 5'-3' ориентации: промотор SpC5-12; последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; и bGH полиА или sNRP полиА, в частности, bGH полиА. В другом варианте осуществления экспрессионная кассета содержит, в 5'-3' ориентации: промотор CMV; интрон SV40; последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; и bGH полиА. В другом варианте осуществления экспрессионная кассета содержит, в 5'-3' ориентации: промотор CMV; последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; и bGH полиА или sNRP полиА, в частности, bGH полиА.

При проектировании конструкта нуклеиновой кислоты по изобретению квалифицированный специалист в данной области будет учитывать ограничения по размеру вектора, используемого для доставки указанного конструкта в клетку или орган. В частности, квалифицированный специалист в данной области знает, что основным ограничением AAV вектора является размер его нагрузки, который может варьироваться от одного AAV серотипа к другому, но, как считают, ограничен примерно размером исходного

вирусного генома. Например, 5 т.п.н. является максимальным размером нагрузки, которая, как принято считать, может быть упакована в капсид AAV8 (Wu Z. et al., *Mol Ther.*, 2010, 18(1): 80-86; Lai Y. et al., *Mol Ther.*, 2010, 18(1): 75-79; Wang Y. et al., *Hum Gene Ther Methods*, 2012, 23(4): 225-33). Кроме того, в процессе рекомбинантного продуцирования AAV геномы размером более 5 т.п.н. инкапсидируются с низкой эффективностью, и полученный AAV может содержать фрагментированные геномы, что снижает эффективность переноса генов. Соответственно, специалисты в данной области при осуществлении на практике настоящего изобретения будут выбирать конструктор нуклеиновой кислоты по изобретению так, чтобы полученная нуклеотидная последовательность, включая последовательности, кодирующие 5'- и 3'- ITR AAV, предпочтительно не превышала 110% вместимости нагрузки используемого AAV вектора, в частности, предпочтительно не превышала 5 т.п.н. AAV векторы, имеющие более высокую вместимость нагрузки, также можно использовать в контексте настоящего изобретения. Например, показано, что AAV частицы, лишённые субъединицы Vp2, успешно упаковывают более крупные геномы (то есть, 6 т.п.н.) с сохранением целостности инкапсидированных геномов (Grieger et al., 2005, *J Virol.*, 79(15):9933-9944).

Настоящее изобретение также относится к вектору, содержащему молекулу или конструктор нуклеиновой кислоты, раскрытые в настоящем документе. В конкретном варианте осуществления вектор содержит молекулу или конструктор нуклеиновой кислоты, кодирующие функциональный укороченный полипептид GDE человека, описанный выше. В другом конкретном варианте осуществления вектор содержит молекулу или конструктор нуклеиновой кислоты, кодирующие функциональный не принадлежащий человеку полипептид GDE, описанный выше.

В частности, вектор по изобретению представляет собой вектор, подходящий для экспрессии белка, предпочтительно, используемого в генной терапии. В одном варианте осуществления вектор представляет собой плазмидный вектор. В другом варианте осуществления вектор представляет собой наночастицу, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению, в частности, матричную РНК, кодирующую полипептид мини-GDE по изобретению. В другом варианте осуществления вектор представляет собой систему на основе транспозонов, допускающую встраивание молекулы или конструктора нуклеиновой кислоты по изобретению в геном клетки-мишени, например гиперактивную систему транспозона *Sleeping Beauty* (SB100X) (Mates et al., 2009). В другом варианте осуществления вектор представляет собой вирусный вектор, подходящий для генной терапии, направленный на любую интересующую клетку, например, ткань или клетки печени, мышечные клетки, клетки ЦНС (такие как клетки головного мозга) или гемопоэтические стволовые клетки, такие как клетки эритроидной линии дифференцировки (например, эритроциты). В данном случае конструктор нуклеиновой кислоты по изобретению также содержит последовательности, подходящие для продуцирования эффективного вирусного вектора, как хорошо известно в данной области.

Вирусные векторы являются предпочтительными для доставки молекулы или конструктора нуклеиновой кислоты по изобретению, например, ретровирусный вектор, например, лентивирусный вектор, или непатогенный парвовирус, более предпочтительно, AAV вектор. Человеческий аденоассоциированный вирус (AAV) парвовирус представляет собой зависимый вирус, естественным образом дефектный по репликации, который способен встраиваться в геном инфицированной клетки, создавая латентную инфекцию.

Последнее качество, судя по всему, является уникальным для вирусов млекопитающих, поскольку встраивание происходит в конкретном участке генома человека, называемом AAVS1 и расположенном на хромосоме 19 (19q13.3-qter).

Вследствие этого, AAV векторы вызвали значительный интерес как потенциальные векторы для генной терапии человека. В число полезных свойств вируса входит отсутствие его связи с каким-либо заболеванием человека, его способность инфицировать как делящиеся, так и не делящиеся клетки, а также широкий диапазон линий клеток, полученных из разных тканей, которые могут быть инфицированы.

Среди серотипов AAV, выделенных из организма человека или приматов (NHP) и хорошо охарактеризованных, человеческий серотип 2 является первым AAV, который был разработан в качестве вектора для переноса генов. Другие используемые в настоящее время серотипы AAV включают варианты AAV-1, AAV-2 (например, четырёхжды мутантный капсид-оптимизированный AAV-2, имеющий генетически модифицированный капсид с изменениями Y44+500+730F+T491V, описанный в Ling et al., 2016 Jul 18, *Hum Gene Ther Methods*), варианты -3 и AAV-3 (например, вариант AAV3-ST, содержащий генетически модифицированный капсид AAV3 с двумя аминокислотными изменениями, S663V+T492V, описанный в Vercauteren et al., 2016, *Mol. Ther.* Vol. 24(6), p. 1042), варианты -3B и AAV-3B, варианты -4, -5, -6 и AAV-6 (например, вариант AAV6, содержащий трижды мутантную форму капсида AAV6 Y731F/Y705F/T492V, описанный в Rosario et al., 2016, *Mol Ther Methods Clin Dev.* 3, p. 16026), -7, -8, -9, -2G9, -10, например, cy10 и -rh10, -rh74, -dj, Anc80, LK03, AAV2i8, свиные серотипы AAV, такие как AAVp04 и AAVp06, а также серотипы AAV с капсидами, мутантными по тирозину, лизину и серину, и так далее. Кроме того, также могут быть полезны и другие природные генетически модифицированные варианты и химеры AAV.

AAV вирусы могут быть генетически модифицированы с использованием общепринятых методов молекулярной биологии, которые позволяют оптимизировать эти частицы для специфической для клеток

доставки последовательностей нуклеиновой кислоты, для минимизации иммуногенности, для настройки стабильности и времени жизни частицы, для эффективного распада, для точной доставки в ядро.

Желательные фрагменты AAV для сборки в векторы включают белки cap, в том числе vp1, vp2, vp3 и гипервариабельные области, белки гер, в том числе гер 78, гер 68, гер 52 и гер 40, и последовательности, кодирующие эти белки. Эти фрагменты могут быть с легкостью использованы в различных векторных системах и клетках-хозяевах.

Рекомбинантные векторы на основе AAV, лишённые белка Rep, встраиваются с низкой эффективностью в геном хозяина и в основном присутствуют в виде стабильных кольцевых эписом, которые могут оставаться годами в клетках-мишенях.

Альтернативно использованию природных серотипов AAV в контексте настоящего изобретения можно использовать искусственные серотипы AAV, включая, без ограничения, AAV с несуществующим в природе капсидным белком. Такой искусственный капсид может быть создан любым подходящим методом с использованием выбранной последовательности AAV (например, фрагмента капсидного белка vp1) в сочетании с гетерологичными последовательностями, которые могут быть получены из иного вирусного серотипа AAV, несмежных частей того же серотипа AAV, из вирусного источника, отличного от AAV, или из невирусного источника. Искусственный серотип AAV может иметь, без ограничения, химерный капсид AAV, рекомбинантный капсид AAV или "гуманизированный" капсид AAV.

В контексте настоящего изобретения AAV вектор включает капсид AAV, способный трансдуцировать интересующие клетки-мишени, то есть, клетки толерогенной ткани (например, гепатоциты) и клетки ткани(ей), представляющие терапевтический интерес, например, мышечные клетки, клетки ЦНС или клетки сердца.

В конкретном варианте осуществления AAV вектор представляет собой вектор вариантов AAV-1, -2, AAV-2 (например, четырёхжды мутантный капсид-оптимизированный AAV-2, имеющий генетически модифицированный капсид с изменениями Y44+500+730F+T491V, описанный в Ling et al., 2016 Jul 18, Hum Gene Ther Methods, [электронная публикация перед выходом печатного издания]), вариантов -3 и AAV-3 (например, вариант AAV3-ST, содержащий генетически модифицированный капсид AAV3 с двумя аминокислотными изменениями, S663V+T492V, описанный в Vercauteren et al., 2016, Mol. Ther. Vol. 24(6), p. 1042), вариантов -3B и AAV-3B, вариантов -4, -5, -6 и AAV-6 (например, вариант AAV6, содержащий трижды мутантную форму капсида AAV6 Y731F/Y705F/T492V, описанный в Rosario et al., 2016, Mol Ther Methods Clin Dev. 3, p. 16026), -7, -8, -9, -2G9, -10, например, cy10 и -rh10, -rh39, -rh43, -rh74, -dj, Anc80, LK03, AAV.PHP, AAV2i8, свинной AAV, такой как AAV_{rho4} и AAV_{rho6}, а также серотипы AAV с капсидами, мутантными по тирозину, лизину и серину. В конкретном варианте осуществления AAV вектор относится к серотипу AAV6, AAV8, AAV9, AAV9P1, AAVrh74 или AAV2i8 (то есть, AAV вектор имеет капсид серотипа AAV6, AAV8, AAV9, AAV9P1, AAVrh74 или AAV2i8). В следующем конкретном варианте осуществления AAV вектор представляет собой псевдотипированный вектор, то есть, его геном и капсид получены из AAV разных серотипов. Например, псевдотипированный AAV вектор может представлять собой вектор, геном которого получен из одного из вышеупомянутых серотипов AAV, и капсид которого получен из другого серотипа. Например, геном псевдотипированного вектора может иметь капсид, полученный из серотипа AAV6, AAV8, AAV9, AAV9P1, AAVrh74 или AAV2i8, а сам геном может быть получен из другого серотипа. В конкретном варианте осуществления AAV вектор имеет капсид серотипа AAV6, AAV8, AAV9 или AAVrh74, в частности, серотипа AAV6, AAV8, AAV9 или AAV9P1, более конкретно, серотипа AAV6, AAV9 или AAV9P1.

В конкретном варианте осуществления, в котором вектор будет использован для доставки терапевтического трансгена в мышечные клетки, AAV вектор может быть выбран, в числе прочего, из группы, состоящей из AAV8, AAV9 и AAVrh74.

В другом конкретном варианте осуществления, в котором вектор будет использован для доставки трансгена в клетки печени, AAV вектор может быть выбран, в числе прочего, из группы, состоящей из AAV1, AAV5, AAV8, AAV9, AAVrh10, AAVrh39, AAVrh43, AAVrh74, AAV-LK03, AAV2G9, AAV.PHP, AAV-Anc80 и AAV3B.

В следующем конкретном варианте осуществления, в котором вектор будет использован для доставки трансгена в ЦНС, AAV вектор может быть выбран, в числе прочего, из группы, состоящей из AAV9, AAV9P1, AAV10 и AAV2G9.

В другом варианте осуществления капсид представляет собой модифицированный капсид. В контексте настоящего изобретения "модифицированный капсид" может представлять собой химерный капсид или капсид, содержащий один или более вариантных капсидных белков VP, полученных из одного или более капсидных белков VP AAV дикого типа.

В конкретном варианте осуществления AAV вектор представляет собой химерный вектор, то есть, его капсид содержит капсидные белки VP, полученные из по меньшей мере двух разных серотипов AAV, или содержит по меньшей мере один химерный белок VP, объединяющий в себе области или домены белка VP, полученные из по меньшей мере двух серотипов AAV. Примеры таких химерных AAV векторов, используемых для трансдукции клеток печени, описаны в Shen et al., Molecular Therapy, 2007 и в Tenney et al., Virology, 2014. Например, химерный AAV вектор может быть получен из сочетания кап-

сидной последовательности AAV8 с последовательностью серотипа AAV, отличного от серотипа AAV8, такого как любой из тех, которые конкретно упомянуты выше. В другом варианте осуществления капсид AAV вектора содержит один или более вариантных капсидных белков VP, таких как те, которые описаны в WO2015013313, в частности, капсидные варианты RHM4-1, RHM15-1, RHM15-2, RHM15-3/RHM15-5, RHM15-4 и RHM15-6, которые отличаются высоким тропизмом для печени.

В другом варианте осуществления модифицированный капсид может быть получен также в результате модификаций капсида, внесенных методом ПЦР сниженной точности и/или за счет пептидной вставки (например, как описано в Bartel et al., 2011). В конкретном варианте осуществления модифицированный капсид имеет модификацию P1, описанную в PCT/EP2019/058560. Кроме того, капсидные варианты могут иметь изменения одиночной аминокислоты, например, тирозиновые мутанты (например, описанные в Zhong et al., 2008)

Кроме того, геном AAV вектора может представлять собой либо одноцепочечный, либо самокомплементарный двухцепочечный геном (McCarty et al., Gene Therapy, 2003). Самокомплементарные двухцепочечные AAV векторы создают делеции сайта концевой разрешии из одного из концевых повторов AAV. Эти модифицированные векторы, репликационный геном которых составляет половину длины генома AAV дикого типа, имеют тенденцию к упаковке димеров ДНК. В предпочтительном варианте осуществления AAV вектор, используемый на практике настоящего изобретения, имеет одноцепочечный геном и, кроме того, предпочтительно имеет капсид AAV8, AAV9, AAVrh74 или AAV2i8, в частности, капсид AAV8, AAV9 или AAVrh74, например, капсид AAV8 или AAV9, более конкретно, капсид AAV9.

AAV вектор, используемый для упаковки последовательности GDE по изобретению, также может быть модифицирован для увеличения его вместимости нагрузки. Например, AAV векторы, лишенные субъединицы Vr2, как показано, успешно упаковывают геномы большего размера (то есть, 6 т.п.н.) с сохранением целостности инкапсидированных геномов (Grieger et al., 2005).

Как известно в данной области, дополнительные соответствующие последовательности могут быть введены в конструктор нуклеиновой кислоты по изобретению для получения функционального вирусного вектора. Соответствующие последовательности включают ITR AAV.

В конкретном варианте осуществления AAV вектор содержит мышечно-специфичный промотор, описанный выше, в частности, мышечно-специфичный промотор, который обеспечивает некоторую утечку экспрессии в клетки печени.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения AAV вектор содержит печень-специфичный промотор, описанный выше. Протолерогенные и метаболические свойства печени успешно реализуются благодаря данному варианту осуществления с разработкой высокоэффективных и оптимизированных векторов для экспрессии GDE в гепатоцитах и индукции иммунной толерантности к белку.

Изобретение также относится к клетке, в частности, выделенной клетке, например, клетке печени, клетке сердца, клетке ЦНС или мышечной клетке, которая трансформирована или трансдуцирована молекулой нуклеиновой кислоты, конструктором или вектором по изобретению. В конкретном варианте осуществления клетка представляет собой выделенную человеческую клетку. В следующем конкретном варианте осуществления клетка не является человеческой эмбриональной стволовой клеткой. Клетка по изобретению экспрессирует полипептид мини-GDE. Клетки по изобретению могут быть доставлены в организм субъекта, который нуждается в этом, например, пациенту с недостаточностью GDE, соответствующим способом введения, например, путем инъекции в печень, в ЦНС, в сердце, в мышцу(ы) или в кровотоки указанного субъекта. В конкретном варианте осуществления изобретение включает трансдукцию печеночных или мышечных клеток, в частности, печеночных или мышечных клеток субъекта, который будет получать лечение, и введение указанных трансдуцированных печеночных и/или мышечных клеток, в которые введена нуклеиновая кислота, субъекту. В конкретном варианте осуществления печеночные клетки представляют собой печеночные клетки от пациента, который будет получать лечение, или представляют собой печеночные стволовые клетки, дополнительно трансформированные и дифференцированные *in vitro* в печеночные клетки для последующего введения пациенту. В другом варианте осуществления клетка представляет собой мышечную клетку от пациента, который будет получать лечение, или представляет собой мышечную стволовую клетку, дополнительно трансформированную и, обязательно, дифференцированную *in vitro* в мышечные клетки для последующего введения пациенту.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, конструктор нуклеиновой кислоты, вектор, полипептид мини-GDE или клетку по изобретению. Такие композиции могут содержать терапевтически эффективное количество терапевтического средства (молекулы нуклеиновой кислоты, конструктора нуклеиновой кислоты, вектора, полипептида мини-GDE или клетки по изобретению) и фармацевтически приемлемый носитель. В конкретном варианте осуществления термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный регулирующим органом Федерального правительства или правительства штата, упомянутый в фармакопее США, Европейской фармакопее или другой общепризнанной фармакопее как подходящий для животных и людей. Термин "носитель" означает разбавитель, адъювант, эксципиент или среду, с которыми вводят терапев-

тическое средство. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая те, которые получены из нефтепродуктов, животного, растительного или синтетического происхождения, например, арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и тому подобное. Вода является предпочтительным носителем, когда фармацевтическую композицию вводят внутривенно. Солевые растворы, а также водные растворы декстрозы и глицерина, также можно использовать в качестве жидких носителей, в частности, для инъекционных растворов. Подходящие фармацевтические эксципиенты включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, натрия стеарат, глицерина моностеарат, тальк, хлорид натрия, сухое снятое молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и тому подобное.

Композиция, при необходимости, также может содержать незначительные количества увлажнителей или эмульгаторов, или буферных средств для поддержания pH. Такие композиции могут иметь форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, препаратов с замедленным высвобождением и тому подобного. Пероральный препарат может включать стандартные носители, такие как маннит, лактоза, крахмал, магния стеарат, натрия сахарин, целлюлоза, магния карбонат категории "для фармацевтического применения" и так далее. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в "Remington's Pharmaceutical Sciences" под редакцией E. W. Martin. Такие композиции будут содержать терапевтически эффективное количество терапевтического средства, предпочтительно, в очищенной форме наряду с соответствующим количеством носителя, создающего форму для надлежащего введения субъекту. В конкретном варианте осуществления нуклеиновая кислота, вектор или клетка по изобретению сформулированы в композиции, содержащей фосфатно-солевой буфер и дополненной 0,25% человеческим сывороточным альбумином. В другом конкретном варианте осуществления нуклеиновая кислота, вектор или клетка по изобретению сформулированы в композиции, содержащей раствор Рингера лактат и неионный сурфактант, такой как плуроник F68, в конечной концентрации 0,01-0,0001%, например, в концентрации 0,001%, по массе от общей массы композиции. Препарат может дополнительно содержать сывороточный альбумин, в частности, человеческий сывороточный альбумин, например, человеческий сывороточный альбумин в концентрации 0,25%. Другие препараты, подходящие либо для хранения, либо для введения, известны в данной области, в частности из WO 2005/118792 или Allay et al., 2011.

В предпочтительном варианте осуществления композиция сформулирована в соответствии с рутинными методами в виде фармацевтической композиции, адаптированной для внутривенного введения людям. Как правило, композиции для внутривенного введения представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости, композиция также может включать солюбилизующее средство и местный анестетик, такой как лидокаин, для уменьшения боли в участке инъекции.

В одном из вариантов осуществления молекулу нуклеиновой кислоты, конструктор нуклеиновой кислоты, вектор, полипептид мини-GDE или клетку по изобретению можно доставлять в везикуле, в частности, липосоме. В другом варианте осуществления молекулу нуклеиновой кислоты, конструктор нуклеиновой кислоты, вектор, полипептид мини-GDE или клетку по изобретению можно доставлять в системе с контролируемым высвобождением.

В конкретном варианте осуществления молекулу нуклеиновой кислоты доставляют в виде мРНК, соответствующей транскрипту, кодирующему полипептид мини-GDE по изобретению. В частности, мРНК по изобретению может быть доставлена с использованием липосом, например, липидных наночастиц (LNP).

Способы введения молекулы нуклеиновой кислоты, конструктора нуклеиновой кислоты, вектора, полипептида мини-GDE или клетки по изобретению включают, но не ограничиваются ими, внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути введения. В конкретном варианте осуществления введение выполняют внутривенным или внутримышечным путем введения. Молекулу нуклеиновой кислоты, конструктор нуклеиновой кислоты, вектор, полипептид мини-GDE или клетку по изобретению, в векторе или без него, можно вводить любым удобным путем введения, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальные или слизистые оболочки (например, слизистую оболочку ротовой полости, слизистую оболочку прямой кишки и тонкой кишки и так далее), и можно вводить совместно с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или локальным.

В конкретном варианте осуществления может быть желательно вводить фармацевтические композиции по изобретению локально в область, которая нуждается в лечении, например, печень или мышцу. Это может быть достигнуто, например, за счет использования имплантата, при этом указанный имплантат состоит из пористого, непористого или студенистого материала и включает мембраны, например, силанические мембраны, или волокна.

В конкретном варианте осуществления полипептид мини-GDE по изобретению используют в ферментной заместительной терапии (ERT), в частности, для лечения GSDIII. Термин "ферментная заместительная терапия", или "ERT", как правило, означает введение очищенного фермента индивидууму, страдающему от недостаточности такого фермента. Введенный полипептид по изобретению может быть получен из природных источников, путем рекомбинантной экспрессии, продуцирован *in vitro* или очищен

из выделенной ткани или жидкости. В частности, при использовании в ERT полипептид по изобретению можно вводить парентерально, например, внутривенным, внутримышечным, внутрисосудистым (то есть, внутривенным или внутриартериальным) путем введения. В частности, полипептид вводят путем внутривенной инъекции. Указанное введение можно повторять часто, например, каждый день, каждую неделю, каждые две недели или каждый месяц, в частности, каждую неделю или каждые две недели.

Количество терапевтического средства (то есть, молекулы нуклеиновой кислоты, конструкта нуклеиновой кислоты, вектора, полипептида мини-GDE или клетки по изобретению) по изобретению, которое будет эффективным для лечения GSDIII, можно определять стандартными клиническими методами. Кроме того, можно, необязательно, использовать *in vivo* и/или *in vitro* анализы для прогнозирования оптимальных диапазонов доз. Точная доза препарата также будет зависеть от пути введения и степени тяжести заболевания, и должна быть определена в зависимости от решения лечащего врача и обстоятельств каждого пациента. Доза молекулы нуклеиновой кислоты, конструкта нуклеиновой кислоты, вектора, полипептида мини-GDE или клетки по изобретению, вводимая субъекту, который нуждается в этом, будет варьироваться в зависимости от нескольких факторов, включая, без ограничения, путь введения, конкретное заболевание, подвергаемое лечению, возраст субъекта или уровень экспрессии, необходимый для достижения терапевтического эффекта. Специалист в данной области сможет с легкостью определять, исходя из собственных знаний в данной области, необходимый диапазон доз на основании этих и других факторов. В случае лечения, включающего введение вирусного вектора, такого как AAV вектор, субъекту, типичные дозы вектора составляют по меньшей мере 1×10^{12} векторных геномов на килограмм массы тела (вг/кг), например, по меньшей мере 1×10^9 вг/кг, по меньшей мере 1×10^{10} вг/кг, по меньшей мере 1×10^{11} вг/кг, по меньшей мере 1×10^{12} вг/кг, по меньшей мере 1×10^{12} вг/кг или по меньшей мере 1×10^{12} вг/кг.

Изобретение также относится к способу лечения GSDIII, включающему этап доставки терапевтически эффективного количества молекулы нуклеиновой кислоты, конструкта нуклеиновой кислоты, вектора, полипептида мини-GDE, фармацевтической композиции или клетки по изобретению субъекту, который нуждается в этом.

У пациентов с GSD III также может развиваться цирроз и печеночно-клеточная карцинома. Таким образом, изобретение также относится к способу лечения цирроза и печеночно-клеточной карциномы у пациента с GSDIII, включающему этап доставки терапевтически эффективного количества молекулы нуклеиновой кислоты, конструкта нуклеиновой кислоты, вектора, полипептида мини-GDE, фармацевтической композиции или клетки по изобретению субъекту, который нуждается в этом.

Изобретение также относится к способу лечения GSD III, не вызывающему иммунный ответ на трансген (то есть, на полипептид мини-GDE, закодированный молекулой нуклеиновой кислоты), или вызывающему сниженный иммунный ответ на трансген, который включает этап доставки терапевтически эффективного количества молекулы нуклеиновой кислоты, конструкта нуклеиновой кислоты, вектора, полипептида мини-GDE, фармацевтической композиции или клетки по изобретению субъекту, который нуждается в этом. Изобретение также относится к способу лечения GSD III, включающему повторное введение терапевтически эффективного количества молекулы нуклеиновой кислоты, конструкта нуклеиновой кислоты, вектора, полипептида мини-GDE, фармацевтической композиции или клетки по изобретению субъекту, который нуждается в этом. В данном аспекте молекула нуклеиновой кислоты, конструкт нуклеиновой кислоты или вектор по изобретению содержит промотор, который является функциональным в клетках печени, что делает возможной иммунную толерантность к экспрессируемому полипептиду мини-GDE, продуцируемому в них. Также, в данном аспекте фармацевтическая композиция, используемая в данном аспекте, содержит молекулу нуклеиновой кислоты, конструкт нуклеиновой кислоты или вектор, содержащие промотор, который является функциональным в клетках печени. В случае доставки клеток, в частности, клеток печени, сердца, ЦНС или мышц, указанные клетки могут представлять собой клетки, ранее полученные от того же субъекта, который нуждается в лечении, и генетически модифицированные путем введения в них молекулы нуклеиновой кислоты, конструкта нуклеиновой кислоты или вектора по изобретению для придания им способности продуцировать полипептид мини-GDE. В соответствии с одним из вариантов осуществления в аспекте, включающем повторное введение, указанное введение может быть повторено по меньшей мере один раз или более, и может даже считаться выполняемым в соответствии с периодической схемой, например, один раз в неделю, в месяц или в год. Периодическая схема также может включать введение один раз каждые 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 лет, или более чем 10 лет. В другом конкретном варианте осуществления каждое введение вирусного вектора по изобретению выполняют с использованием разного вируса для каждого последующего введения, тем самым избегая уменьшения эффективности вследствие возможного иммунного ответа на ранее введенный вирусный вектор. Например, можно выполнять первое введение AAV вектора, содержащего капсид AAV8, с последующим введением вектора, содержащего капсид AAV9.

Лечение в соответствии с настоящим изобретением может включать лечебные, паллиативные или профилактические эффекты. Соответственно, терапевтическое и профилактическое лечение включает ослабление симптомов GSD III, либо предотвращение или иное снижение риска развития конкретного

гликогеноза. Термин "профилактическое" лечение может означать уменьшение степени тяжести или отсрочку начала развития конкретного состояния. "Профилактическое" лечение также включает предотвращение рецидива конкретного состояния у пациента с ранее диагностированным состоянием. "Терапевтическое" лечение также может приводить к уменьшению степени тяжести существующего состояния. Используемый в настоящем документе термин "лечение" относится к любому режиму, приносящему пользу животному, в частности, млекопитающему, более конкретно, человеку.

Изобретение также относится к *ex vivo* генно-терапевтическому способу лечения GSD III, включающему введение молекулы нуклеиновой кислоты, конструкта нуклеиновой кислоты или вектора по изобретению в выделенную клетку пациента, который нуждается в этом, например, выделенную гемопоэтическую стволовую клетку, и введение указанной клетки указанному пациенту, который нуждается в этом.

Изобретение также относится к молекуле нуклеиновой кислоты, конструкту нуклеиновой кислоты, вектору, полипептиду мини-GDE, клетке или фармацевтической композиции по изобретению для использования в качестве лекарственного препарата.

Изобретение также относится к молекуле нуклеиновой кислоты, конструкту нуклеиновой кислоты, вектору, полипептиду мини-GDE, клетке или фармацевтической композиции по изобретению для использования в способе лечения заболевания, вызываемого мутацией в гене GDE, в частности, в способе лечения GSDIII (болезни Кори).

Изобретение также относится к использованию молекулы нуклеиновой кислоты, конструкта нуклеиновой кислоты, вектора, полипептида мини-GDE, клетки или фармацевтической композиции по изобретению в производстве лекарственного препарата, полезного для лечения GSD III (болезни Кори).

Примеры

Далее изобретение описано подробно со ссылкой на следующие экспериментальные примеры и прилагаемые фигуры. Эти примеры приведены исключительно для целей иллюстрации и не должны быть ограничивающими.

Материалы и методы

Вестерн-блот анализ

Мышечные ткани гомогенизировали в не содержащей ДНКазу/РНКазу воде, и концентрацию белка определяли с использованием анализа на белок BCA. Электрофорез в SDS-ПААГ проводили в 4-15% градиентном полиакриламидном геле. После переноса мембрану блокировали и инкубировали с анти-GDE антителом и антителом против актина. Мембрану промывали, инкубировали с соответствующим вторичным антителом и визуализировали при помощи системы визуализации Odyssey.

Измерения ферментативной активности

Ткани гомогенизировали, как описано выше, и инкубировали 3-16 ч при 37°C с предельным декстрином, растворенным в фосфатном буфере, pH 6,9. Реакцию останавливали путем инкубации в течение 10 мин при 95°C, а затем центрифугировали 10 мин при 11000×g. Супернатанты использовали для измерения продуцируемой глюкозы при помощи коммерческого набора для анализа глюкозы. Реакцию останавливали концентрированной H₂SO₄, и поглощение измеряли на планшетном ридере EnSpire alpha (Perkin-Elmer, Waltham, MA) при 540 нм.

Измерение содержания гликогена

Содержание гликогена измеряли опосредованно в гомогенатах тканей как глюкозу, высвобожденную после полного расщепления амилоглюкозидазой *Aspergillus niger* (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO). Образцы инкубировали в течение 5 мин при 95°C, а затем охлаждали при 4°C; после чего в каждый образец добавляли 25 мкл амилоглюкозидазы, разведенной 1:50 в 0,1 М ацетате калия, pH 5,5. Для каждого образца готовили контрольную реакционную смесь без амилоглюкозидазы. Как экспериментальные, так и контрольные, реакционные смеси инкубировали при 37°C в течение 90 мин. Реакцию останавливали путем инкубации образцов в течение 5 мин при 95°C. Высвобожденную глюкозу количественно определяли с использованием коммерческого набора для анализа глюкозы (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO), и поглощение измеряли на планшетном ридере EnSpire alpha (Perkin-Elmer, Waltham, MA) при длине волны 540 нм.

Тесты на мышечную функцию

Для измерения среднего времени виса на проволоке проводили трехминутный тест виса на 4-мм проволоке. В начале теста каждому животному присваивают 10 баллов за "падение". Мышь держат за хвост и подносят к проволоке. Оператор подвешивает животное только за передние конечности. Как только животное правильно подвешено, запускают таймер на 180 с. Если животное падает, таймер останавливают, количество очков за падение уменьшают на 1 и записывают прошедшее время. Затем животное подвешивают за передние конечности, и таймер снова запускают. Тест останавливают либо когда истекает время на таймере, либо когда количество баллов за падение достигает 0. Результаты выражают в виде количества падений в минуту.

Результаты

AAV являются предпочтительными векторами для *in vivo* генной терапии. Одним из самых больших ограничений в использовании AAV для замены генов является то, что их размер инкапсидации ог-

раничен 5 т.п.н. Действительно, в процессе получения рекомбинантного AAV геномы размером более 5 т.п.н. инкапсидируются с низкой эффективностью, и полученный AAV может содержать фрагментированные геномы, что снижает эффективность переноса генов. Для преодоления этого ограничения были разработаны разные подходы. В частности, сообщалось об использовании двойных AAV векторов. В соответствии с данным подходом используют два вектора, каждый из которых содержит часть большой кодирующей последовательности трансгена, для трансдукции одной и той же клетки. Рекомбинация двух векторов может происходить за счет i) перекрытия последовательности, полученной из трансгена, ii) внутренних концевых повторов (ITR) в сочетании с донором и акцептором сплайсинга или iii) гетерологичной высокорекомбиногенной последовательности в сочетании с донором и акцептором сплайсинга. Однако, хотя двойные AAV векторы продемонстрировали эффективность в разных животных моделях, они имеют определенный недостаток. В настоящем документе авторы изобретения впервые приводят данные по использованию GDE гориллы, который помещается в один AAV и устраняет накопление гликогена, а также восстанавливает мышечную функцию у мышей с GSDIII с эффективностью, аналогичной эффективности двойных AAV векторов, в меньшей дозе.

На фиг. 1 представлены 4 разных белка GDE млекопитающих, отличных от человека, которые меньше, чем GDE человека (hGDE), это не является исчерпывающим.

На фиг. 2 представлены укороченные последовательности $\Delta 1$, $\Delta 2-3$ и $\Delta 4$ GDE человека (hGDE).

Во-первых, авторы изобретения оценили эффекты, вызываемые у мышей с GSDIII короткими GDE млекопитающего, отличного от человека. Экспрессионная кассета трансгена, состоящая из мышечно-специфичного промотора (SpC5-12), интрона SV40, кодирующей последовательности для GDE гориллы (gGDE) и bGH полиА (AAV9-gGDE, общий размер: 5,1 т.п.н.), была использована для получения вектора AAV9 путем тройной трансфекции и очистки в градиенте хлорида цезия.

Затем вектор AAV9-gGDE был введен инъекцией 3-месячным мышам с GSDIII в дозе 1×10^{12} вг/мышь параллельно с двойным AAV вектором, экспрессирующим GDE под трансляционным контролем промотора CMV, в дозе 2×10^{12} вг/мышь. Через три месяца после инъекции вектора мышей умерщвляли, и ткани анализировали для оценки биохимической коррекции GSDIII. Проведенный вестерн-блоттинг экстрактов сердца мышей, получавших лечение, как описано выше, с антителом, специфическим для GDE, показал, что инъекция AAV9-gGDE индуцировала экспрессию белка меньшего размера, чем GDE (предполагаемый размер ~ 130 кДа), и узнаваемого специфическим анти-GDE антителом (фиг. 3). Затем авторы изобретения оценили накопление гликогена в четырехглавой мышце животных GDE-KO, получавших инъекцию AAV9-gGDE, в сравнении с инъекцией двойного AAV9 вектора, экспрессирующего GDE под транскрипционным контролем CMV (двойной-GDE). На графике фиг. 4 показаны уровни гликогена, измеренные у получавших AAV животных и не получавших лечение животных дикого типа (ДТ) и КО. Введение одного вектора, экспрессирующего gGDE, устраняло накопление гликогена до уровней, сопоставимых с теми, которые наблюдаются при использовании двойных AAV векторов. Кроме того, измерение мышечной функции в тесте виса на проволоке показало, что оба подхода одинаково эффективны для восстановления мышечной функции (фиг. 5). В совокупности, эти данные свидетельствуют о том, что AAV-опосредуемая экспрессия gGDE в мышцах устраняет накопление гликогена и восстанавливает мышечную функцию у мышей с GSDIII.

Затем авторы изобретения оценили активность укороченных форм последовательности GDE человека как *in vitro*, так и *in vivo*. Сначала они трансфицировали клетки гепатомы печени (Huh-7) плазмидами, кодирующими одну укороченную форму, полученную из GDE человека, под транскрипционным контролем промотора CMV. Экспрессионная кассета также содержала интрон SV40 и сигнал полиаденилирования bGH. Через два дня после трансфекции измеряли активность в цитозольных экстрактах, полученных из этих клеток. Тест на активность, основанный на высвобождении глюкозы из предельного декстрина, позволял обнаруживать базовую активность в линейных клетках вследствие эндогенной экспрессии GDE. Избыточная экспрессия полноразмерного GDE человека приводила к повышенной активности GDE. Аналогичные результаты были получены с $\Delta 4$ укороченным GDE человека, но не с GDE гориллы (фиг. 6). Затем авторы изобретения получили результаты *in vivo* после внутримышечной инъекции AAV векторов, экспрессирующих GDE. Животным GDE-KO вводили внутримышечной инъекцией векторы AAV9, экспрессирующие человеческий укороченный GDE ($\Delta 1$), GDE гориллы, или двойной вектор, экспрессирующий человеческий полноразмерный GDE. Через 15 дней после инъекции переднюю большеберцовую мышцу иссекали и анализировали на экспрессию и активность GDE (фиг. 7). Вестерн-блот анализ с анти-GDE антителом четко продемонстрировал наличие полосы с молекулярной массой меньше, чем у полноразмерного GDE (фиг. 7).

Были получены AAV векторы, экспрессирующие три разных укороченных hGDE, либо дикого типа (дт), либо кодон-оптимизированных (к/о), под транскрипционным контролем промотора SpC5.12. Эти векторы были введены инъекцией непосредственно в правую переднюю большеберцовую (ТА) мышцу самкам мышей GDE-KO в дозе $1 \text{E}11$ вг/мышь. Через пятнадцать дней после инъекции была измерена активность GDE в экстрактах, полученных из ТА мышей, получавших инъекцию. Активность GDE, измеренная в левой ТА, не получавшей инъекцию, была использована в качестве контроля (Ag1/-).

КОНТР.). Белковые экстракты, полученные из ТА мышей, получавших одиночные векторы AAV, экспрессирующие укороченные формы GDE, продемонстрировали более высокие уровни активности GDE в сравнении с контролем (фиг. 8).

На фиг. 9 показана успешная экспрессия дополнительных человеческих укороченных GDE: $\Delta 9+\Delta 2/3$; $\Delta 10+\Delta 2/3$; $\Delta 11+\Delta 2/3$; $\Delta 12+\Delta 2/3$; $\Delta 13+\Delta 2/3$ при трансфекции в клетки HEK293.

На фиг. 10 также показана успешная экспрессия дополнительных человеческих укороченных GDE: $\Delta 2/3$; $\Delta 9+\Delta 2/3$; $\Delta 10+\Delta 2/3$; $\Delta 13+\Delta 2/3$ в передней большеберцовой мышце мышей GDE-KO через 15 дней после инъекции AAV9 векторов, экспрессирующих указанные человеческие укороченные GDE.

Приведенные данные четко демонстрируют, что более короткие формы GDE, либо укороченные формы GDE человека, либо не принадлежащие человеку GDE, могут экспрессироваться как *in vitro*, так и *in vivo*, в активной форме и могут быть использованы для расщепления гликогена, накопленного у мышей с GSDIII.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Функциональный укороченный полипептид GDE человека, который лишен, по меньшей мере, примерно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 90, 100, 125, 150, 175, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 или, по меньшей мере, примерно 525 аминокислот в сравнении с эталонной полноразмерной последовательностью GDE человека, при этом:

(i) эталонная полноразмерная последовательность GDE человека имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, и указанный укороченный полипептид GDE человека содержит по меньшей мере аминокислотные остатки в положениях 429-666, 770-892, 1088-1194 и 1235-1532 применительно к SEQ ID NO: 1;

(ii) эталонная полноразмерная последовательность GDE человека имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 40, и указанный укороченный полипептид GDE человека содержит по меньшей мере аминокислотные остатки в положениях 412-649, 753-875, 1071-1177, 1218-1515 применительно к SEQ ID NO: 40; или

(iii) эталонная полноразмерная последовательность GDE человека имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 41, и указанный укороченный полипептид GDE человека содержит по меньшей мере аминокислотные остатки в положениях 413-650, 754-876, 1072-1178, 1219-1516 применительно к SEQ ID NO: 41.

2. Функциональный укороченный полипептид GDE человека по п.1, имеющий делецию или сочетание делеций согласно табл. 2.

3. Функциональный укороченный полипептид GDE человека по любому из пп.1, 2, имеющий последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2-6 и SEQ ID NO: 48-52, или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности SEQ ID NO:2- 6 и SEQ ID NO:48-52.

4. Функциональный укороченный полипептид GDE человека по любому из пп.1-3, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 5, или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или, по меньшей мере, 99 % идентичность последовательности SEQ ID NO: 5.

5. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая функциональный укороченный полипептид GDE человека по любому из пп.1-4.

6. Генетическая конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая:
промотор;

молекулу нуклеиновой кислоты по п.5; и
сигнал полиаденилирования.

7. Генетическая конструкция нуклеиновой кислоты по п.6, дополнительно включающая интрон.

8. Вектор, содержащий:

молекулу нуклеиновой кислоты по п.5; или

генетическую конструкцию нуклеиновой кислоты по п.6 или 7.

9. Вектор по п.8, который представляет собой вирусный вектор.

10. Вирусный вектор, содержащий генетическую конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующий функциональный не принадлежащий человеку полипептид GDE, при этом функциональный не принадлежащий человеку полипептид GDE содержит примерно от 1000 до 1500 аминокислот, при этом функциональный не принадлежащий человеку полипептид GDE выбирают из группы, состоящей из: полипептида GDE лошади с SEQ ID NO: 11, полипептида GDE гориллы с SEQ ID NO: 12, полипептида GDE орангутана с SEQ ID NO: 13, полипептида GDE Pteropus alecto с SEQ ID NO: 14, полипептида GDE красноголового мангабея с SEQ ID NO: 15, полипептида GDE утконоса с SEQ ID NO: 16 и полипептида GDE утки с SEQ ID NO: 17 или его функционального варианта, имеющего, по меньшей мере, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности SEQ ID NO: 11-17.

11. Вирусный вектор по п.10, при этом функциональный не принадлежащий человеку полипептид

GDE представляет собой полипептид GDE гориллы с SEQ ID NO: 12 или его функциональный вариант, имеющий, по меньшей мере, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или, по меньшей мере, 99 % идентичность последовательности SEQ ID NO: 12.

12. Вектор по любому из пп.8-11, который представляет собой AAV вектор.

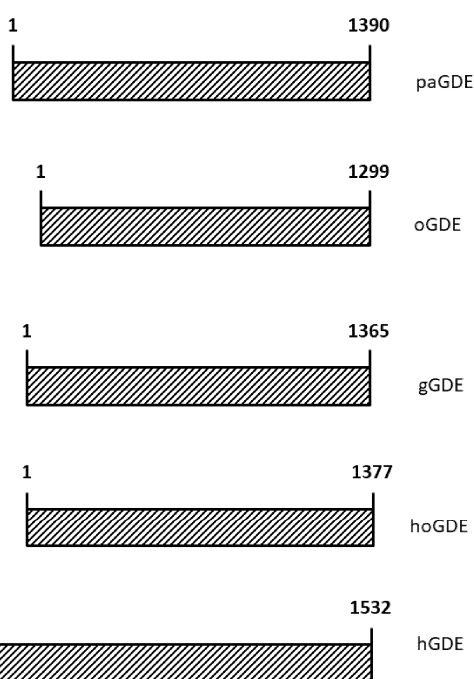
13. Выделенная клетка, трансформированная молекулой нуклеиновой кислоты по п.5, генетической конструкцией нуклеиновой кислоты по п.6 или 7 или вектором по любому из пп.8-12.

14. Выделенная клетка по п.13, которая представляет собой клетку печени, мышечную клетку, клетку сердца или клетку ЦНС.

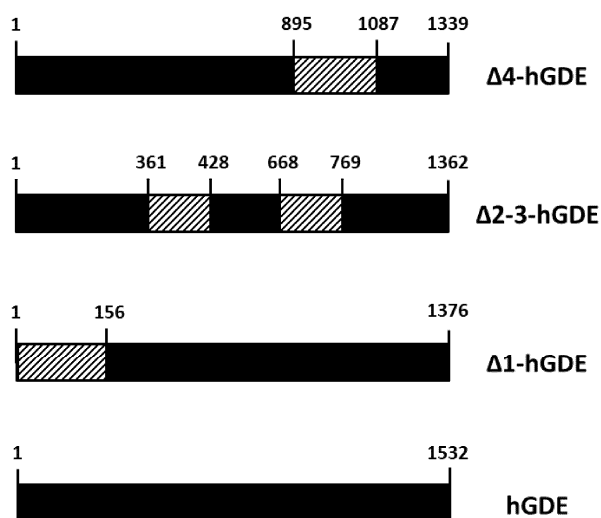
15. Применение функционального укороченного полипептида GDE человека по любому из пп.1-4, молекулы нуклеиновой кислоты по п.5, генетической конструкцией нуклеиновой кислоты по п.6 или 7, вектора по любому из пп.8-12 или клетки по п.13 или 14 в качестве лекарственного препарата.

16. Применение функционального укороченного полипептида GDE человека по любому из пп.1-4, молекулы нуклеиновой кислоты по п.5, генетической конструкцией нуклеиновой кислоты по п.6 или 7, вектора по любому из пп.8-12 или клетки по п.13 или 14 в способе лечения GSDIII (болезни Кори).

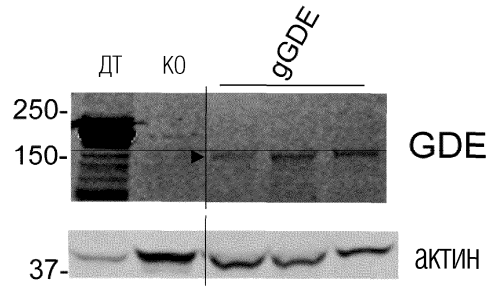
17. Применение полипептида GDE гориллы с SEQ ID NO: 12 в способе лечения GSDIII (болезни Кори).



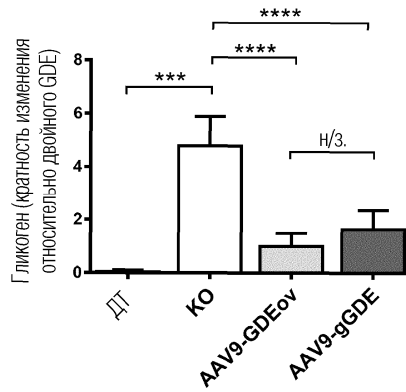
Фиг. 1



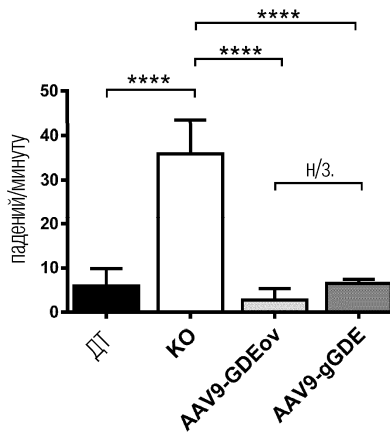
Фиг. 2



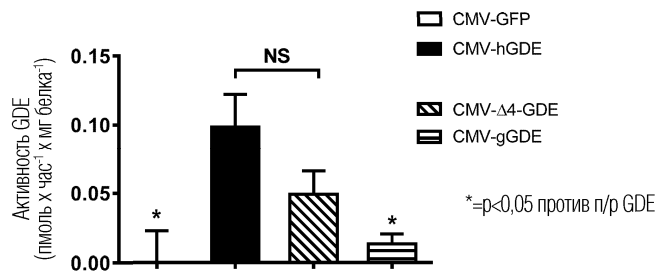
Фиг. 3



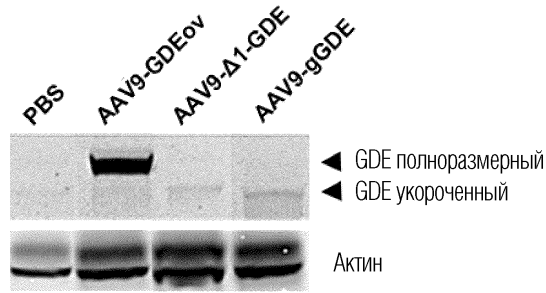
Фиг. 4



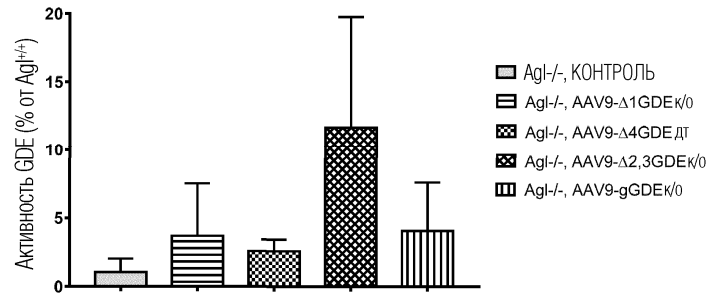
Фиг. 5



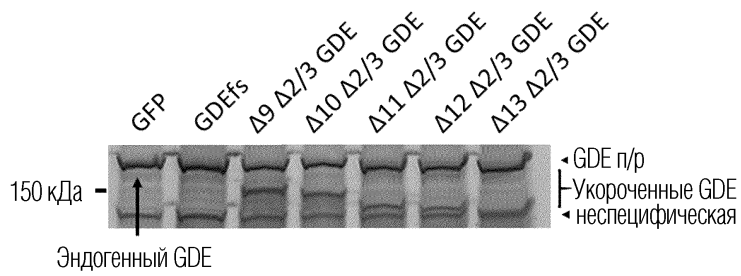
Фиг. 6



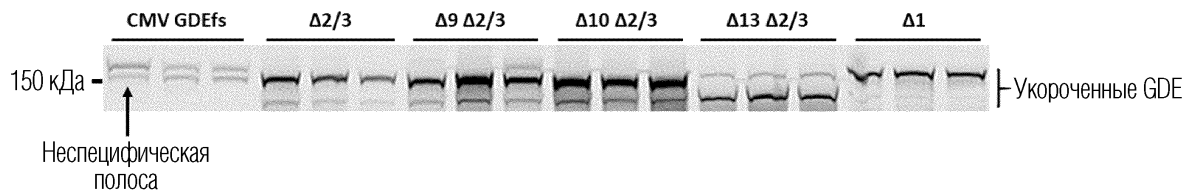
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10