

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392398** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.12.26

(22) Дата подачи заявки
2022.02.25

(51) Int. Cl. **C12N 15/86** (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
C12N 9/40 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)

(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ ФАБРИ**

(31) **63/154,485**

(32) **2021.02.26**

(33) **US**

(86) **PCT/US2022/017998**

(87) **WO 2022/183052 2022.09.01**

(71) Заявитель:
**ТАКЕДА ФАРМАСЬЮТИКАЛ
КОМПАНИ ЛИМИТЕД (JP)**

(72) Изобретатель:

**Ислам Ризвана, Дешпанде Мугда
Равиндра, Натараджан Мадхусудан,
Пак Юн Хи, Чхве Вивиан (US)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) В данном изобретении предложен, среди прочего, способ лечения болезни Фабри у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, рекомбинантного аденоассоциированного вирусного вектора (гAAV), упакованного в капсид AAV, обладающего широким тропизмом к тканям, причем вектор включает: (a) 5'-инвертированный концевой повтор; (b) универсальный промотор; (c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL дикого типа или его вариант; (d) необязательно посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); (e) поли А; и (f) 3'-ITR.



202392398

A1

A1

202392398

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ ФАБРИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 63/154 485, поданной 26 февраля 2021 г., содержание которой включено в данный документе посредством ссылки в полном объеме.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[0002] Данное описание ссылается на Перечень последовательностей (представлен в электронном виде как файл в формате .txt под названием MIL-014WO_ST25 от 25 февраля 2022 г.). Файл в формате .txt был создан 24 февраля 2022 г. и имеет размер 177 кб. Полное содержание перечня последовательностей включено в данный документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Болезнь Фабри — редкое прогрессирующее врожденное заболевание обмена веществ, вызванное дефицитом лизосомального фермента α -галактозидазы А (α -GAL) в результате мутации гена GLA. Если не лечить, у пациентов с Фабри сокращается ожидаемая продолжительность жизни, они часто умирают в возрасте около сорока или пятидесяти лет из-за сосудистых заболеваний, поражающих почки, сердце и/или центральную нервную систему.

[0004] Недостаток активности фермента α -GAL приводит к прогрессирующему систематическому накоплению его первичного субстрата, глоботриаозилцерамида (GB3) и его деацетилированной растворимой формы, глоботриаозилсфингозина (lysoGb3), что приводит к множеству проблем со здоровьем, включая одно или несколько из заболеваний почек, сердца и/или цереброваскулярных заболеваний, с сокращением ожидаемой продолжительности жизни. В зависимости от мутации и остаточного уровня фермента α -Gal заболевание проявляется как классическая болезнь Фабри с ранним началом в детстве/подростковом возрасте или как аттенуированная (взрослая) форма в более позднем возрасте. Классическая болезнь Фабри возникает, когда остаточная активность фермента составляет $<5\%$ (Arends M, et al. (2017) PLoS ONE 12(8): e0182379.), и обычно встречается у мужчин.

[0005] Болезнь Фабри также связана с развитием боли. Боль может быть вызвана отложением липидов в ганглиях дорсальных корешков и симпатических ганглиях, или нейропатией мелких волокон. Как правило, боль бывает хронической или эпизодической. Эпизодическая боль при болезни Фабри, называемая «кризисом Фабри», обычно начинается в конечностях и расходуется проксимально, и может быть вызвана физическими упражнениями, болезнью, изменениями температуры или другими физическими и эмоциональными стрессами. Эта невропатическая боль также связана с отсутствием восприятия температуры.

[0006] Специфическим лечением болезни Фабри, которое в настоящее время одобрено, является заместительная ферментная терапия («ERT», англ.: enzyme replacement therapy), которая включает лечение пациентов одной из двух версий рекомбинантной α -GAL человека, агалсидазы альфа, которая продуцируется культивируемыми клеточными линиями человека, и агалсидазы бета, которая продуцируется клетками яичника китайского хомячка, трансдуцированными геном GLA. Хотя ERT эффективна во многих случаях, это лечение требует пожизненного внутривенного введения α -GAL каждые две недели. ERT устраняет симптомы, связанные с болезнью Фабри, но не излечивает и не останавливает прогрессирование заболевания. Например, не было показано, что два продукта α -GAL, описанные выше, существенно снижают риск инсульта, миокард медленно реагирует на лечение, а элиминация отложений липидов из некоторых типов клеток в почках ограничена. Недостаточный фармакологический ответ во многом обусловлен коротким периодом полужизни фермента в кровотоке и субоптимальной клеточной доставкой. Таким образом, сохраняется потребность в способах лечения болезни Фабри, которые могут остановить прогрессирование заболевания и потенциально вылечить его.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] В данной заявке описаны способы и композиции для лечения и/или профилактики болезни Фабри. В данном изобретении частично предложен подход к генной терапии с использованием рекомбинантных аденоассоциированных вирусных векторов (rAAV) для обеспечения переноса и экспрессии гена GLA. Данная заявка основана на открытии того, что средства доставки генов, такие как вектор rAAV, обладающий широким тропизмом к тканям и использующий универсальный промотор для обеспечения широкой экспрессии генов, приводит к устойчиво высоким уровням экспрессии белка и надежному воздействию белка на широкий спектр тканей и/или снижению уровней GB3 или lysoGb3. Данная заявка также основана на открытии того, что кодон-оптимизированные или сконструированные варианты GLA, доставляемые с использованием вектора rAAV с

широким или тканеспецифическим тропизмом и с использованием универсального или тканеспецифического промотора, приводят к увеличению активности α -GAL *in vivo* и/или снижению уровней lysoGb3 или GB3 *in vivo*. Кроме того, этот подход к доставке генов для управления экспрессией вариантов GLA, кодирующих белок α -GAL, с увеличенным периодом полужизни и улучшенным клеточным поглощением, обеспечивает дальнейшее увеличение воздействия α -GAL на ключевые целевые ткани. В совокупности эти открытия позволяют описанным в данном документе средствам доставки достичь широкого распределения введенных трансгенов в тканях, а также позволяют улучшить результаты лечения. Средства доставки, содержащие описанные в данном документе последовательности GLA, особенно полезны для лечения болезни Фабри.

[0008] В данном документе описаны способы и композиции для эффективной доставки гена α -галактозидазы А (GLA) в клетки нуждающегося в этом субъекта. Доставленный трансген GLA приводит к экспрессии белка α -GAL. Данное изобретение частично основано на разработке рекомбинантного аденоассоциированного вирусного (rAAV) вектора, который содержит, среди прочего, ген α -галактозидазы А (GLA) и который демонстрирует надежную экспрессию белка α -GAL, когда он присутствует в клетке. Данное изобретение основано, по меньшей мере частично, на неожиданном открытии того, что конструкция, содержащая ген GLA под управлением универсального промотора и упакованная в капсид rAAV с широким тканевым тропизмом, приводит к стойкой экспрессии белка α -GAL и надежному биораспределению в тканях почек, сердца, желудочно-кишечного тракта, головного мозга и периферических нейронов даже при низкой дозе. Широкое распределение, полученное с использованием этого вектора, позволяет эффективно доставлять α -GAL к тканям, пораженным болезнью Фабри, и, следовательно, обеспечивает надежный терапевтический результат.

[0009] Описанные в данном документе векторы rAAV можно использовать либо с геном GLA, имеющим последовательность дикого типа (SEQ ID NO: 3), либо с геном GLA, имеющим модифицированную последовательность, описанную в данном документе. Такие модифицированные последовательности GLA включают, например, кодон-оптимизированный GLA и/или сконструированные варианты GLA. Описанные в данном документе векторы rAAV обеспечивают клиренс субстрата глоботриаозилсфингозина (lysoGb3) и/или глоботриаозилцерамида (GB3) в различных тканях.

[0010] Как более подробно описано ниже, система генной терапии, описанная в данном документе, приводит к общему улучшению состояния здоровья, о чем свидетельствует увеличение массы тела, улучшение функции почек и неврологических симптомов в мышечных моделях болезни Фабри, и, как ожидается, также будет вызывать то

же самое у людей. Предложенные в данном документе способы и композиции можно использовать для достижения устойчивой экспрессии GLA в самых разных тканях, пораженных болезнью Фабри. Таким образом, в данной заявке предложены композиции и способы, которые являются высокоэффективными при лечении болезни Фабри и облегчении связанных с ней симптомов.

[0011] В некоторых аспектах предложен рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор с широким тропизмом к тканям, причем указанный вектор содержит: (a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); (b) универсальный промотор; (c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL; (d) поли A; и (e) 3'-ITR.

[0012] В некоторых аспектах предложен рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор с широким тропизмом к тканям, причем указанный вектор содержит: (a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); (b) универсальный промотор; (c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL; (d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); (e) поли A; и (f) 3'-ITR.

[0013] Различные виды капсидов AAV с широким тропизмом к тканям (термины «широкий тропизм к тканям» и «широкий тропизм» используются в данном документе взаимозаменяемо) могут быть использованы в векторе rAAV, описанном в данном документе. Например, в некоторых вариантах осуществления капсид AAV представляет собой капсид AAV с широким тропизмом, выбранный из капсида AAV1, капсида AAV2, капсида AAV3, капсида AAV4, капсида AAV5, капсида AAV6, капсида AAV7, капсида AAV8, капсида AAV9, AAV11, 12,13, AAVhu.37, AAVrh.8, AAVrh.10 и AAVrh.39, AAV-DJ, или AAV-DJ/8.

[0014] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления капсид AAV с широким тропизмом представляет собой AAV1. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV с широким тропизмом представляет собой AAV2. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV с широким тропизмом представляет собой AAV3. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV с широким тропизмом представляет собой AAV4. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV с широким тропизмом представляет собой AAV5. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV с широким тропизмом представляет собой AAV6. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV с широким тропизмом представляет собой AAV7. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV с широким тропизмом представляет собой AAV8. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV с широким тропизмом представляет собой AAV9.

[0015] Различные виды капсидов и связанные с ними тропизмы описаны в *Curr Opin Vir.* 2016 December 21:75-80, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки. Под «широким тропизмом к тканям» подразумевается, что капсид способен обеспечивать перенос генов в два или более чем 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более типов тканей. Например, в некоторых вариантах осуществления капсид, обладающий широким тропизмом к тканям, обеспечивает перенос гена в одну или несколько из следующих тканей: печени, почки, сердца, желудочно-кишечного тракта и/или периферических нейронов субъекта.

[0016] В некоторых вариантах осуществления универсальный промотор выбран из промотора куриного β -актина (CBA), промотора CAG, промотора EF-1 α , промотора PGK, промотора UBC, промотора бета-глюкуронидазы LSE (GUSB) или универсального промотора элемента открытия хроматина (UCOE). В некоторых вариантах осуществления универсальный промотор содержит CBh (энхансер ЦМВ, промотор куриного бета-актина, гибридный интрон куриный бета-актин-MVM). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления универсальный промотор представляет собой промотор куриного β -актина (CBA). В некоторых вариантах осуществления универсальный промотор представляет собой промотор EF-1 α . В некоторых вариантах осуществления промотор EF-1 α находится в комбинации с химерным интроном из генов куриного β -актина и кроличьего β -глобина. В некоторых вариантах осуществления универсальный промотор представляет собой промотор UBC. В некоторых вариантах осуществления универсальный промотор представляет собой промотор LSE бета-глюкуронидазы (GUSB). В некоторых вариантах осуществления универсальный промотор представляет собой универсальный промотор элемента открытия хроматина (UCOE). (Powell SK, et al. *Discov Med.* 2015 Jan;19(102):49-57.)

[0017] В некоторых вариантах осуществления универсальный промотор содержит энхансер цитомегаловируса (ЦМВ), промотор куриного бета-актина и интрон кроличьего бета-глобина.

[0018] В некоторых вариантах осуществления универсальный промотор содержит укороченный промотор EF-1 α и один или несколько интронов.

[0019] В некоторых вариантах осуществления один или более интронов получены из генов куриного β -актина и/или кроличьего β -глобина.

[0020] В некоторых вариантах осуществления капсид AAV9 является встречающимся в природе или модифицированным.

[0021] В некоторых вариантах осуществления последовательность WPRE является необязательной или модифицированной.

[0022] В некоторых вариантах осуществления последовательность WPRE представляет собой mut6delATG WPRE.

[0023] Примеры последовательностей поли А, которые могут быть включены в векторы для генной терапии, охватываемые данным изобретением, включают поли А гормона роста человека (hGHpA), синтетический поли А (SPA), поздний поли А вируса 40 обезьян (SV 40pA) и поли А бычьего гормона роста (BGH). В конкретном варианте осуществления поли А представляет собой поли А бычьего гормона роста (BGH).

[0024] В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая фермент α -GAL, является кодон-оптимизированной.

[0025] В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая фермент α -GAL, является кодон-оптимизированной для клеток человека.

[0026] В некоторых вариантах осуществления фермент α -GAL имеет немодифицированную последовательность.

[0027] В некоторых вариантах осуществления фермент α -GAL имеет модифицированную последовательность.

[0028] В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая фермент α -GAL, является сконструированной.

[0029] В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая фермент α -GAL, является сконструированной и кодон-оптимизированной.

[0030] В некоторых вариантах осуществления модифицированная последовательность содержит одну или несколько аминокислотных замен по сравнению с ферментом α -GAL дикого типа (SEQ ID NO: 30).

[0031] В некоторых вариантах осуществления модифицированная последовательность содержит от 1 до 25 аминокислотных замен по сравнению с ферментом α -GAL дикого типа (SEQ ID NO: 30). Например, в некоторых вариантах осуществления модифицированная последовательность содержит от 5 до 25 аминокислотных замен по сравнению с ферментом α -GAL дикого типа (SEQ ID NO: 30). В некоторых вариантах осуществления модифицированная последовательность содержит от 5 до 20 аминокислотных замен по сравнению с ферментом α -GAL дикого типа (SEQ ID NO: 30). В некоторых вариантах осуществления модифицированная последовательность содержит от 5 до 15 аминокислотных замен по сравнению с ферментом α -GAL дикого типа (SEQ ID NO: 30). В некоторых вариантах осуществления модифицированная последовательность содержит от 5 до 10 аминокислотных замен по сравнению с ферментом α -GAL дикого типа (SEQ ID NO: 30). В некоторых вариантах осуществления модифицированная последовательность содержит от 10 до 25 аминокислотных замен по сравнению с

ферментом α -GAL дикого типа (SEQ ID NO: 30). В некоторых вариантах осуществления модифицированная последовательность содержит от 10 до 20 аминокислотных замен по сравнению с ферментом α -GAL дикого типа (SEQ ID NO: 30). В некоторых вариантах осуществления модифицированная последовательность содержит от 10 до 15 аминокислотных замен по сравнению с ферментом α -GAL дикого типа (SEQ ID NO: 30).

[0032] В некоторых вариантах осуществления модифицированная последовательность содержит от 1 до 10 аминокислотных замен по сравнению с ферментом α -GAL дикого типа (SEQ ID NO: 30). Например, в некоторых вариантах осуществления модифицированная последовательность содержит от 1 до 9 аминокислотных замен по сравнению с ферментом α -GAL дикого типа (SEQ ID NO: 30). В некоторых вариантах осуществления модифицированная последовательность содержит от 1 до 8 аминокислотных замен по сравнению с ферментом α -GAL дикого типа (SEQ ID NO: 30). В некоторых вариантах осуществления модифицированная последовательность содержит от 1 до 7 аминокислотных замен по сравнению с ферментом α -GAL дикого типа (SEQ ID NO: 30). В некоторых вариантах осуществления модифицированная последовательность содержит от 1 до 6 аминокислотных замен по сравнению с ферментом α -GAL дикого типа (SEQ ID NO: 30). В некоторых вариантах осуществления модифицированная последовательность содержит от 1 до 5 аминокислотных замен по сравнению с ферментом α -GAL дикого типа (SEQ ID NO: 30). В некоторых вариантах осуществления модифицированная последовательность содержит от 1 до 4 аминокислотных замен по сравнению с ферментом α -GAL дикого типа (SEQ ID NO: 30). В некоторых вариантах осуществления модифицированная последовательность содержит от 1 до 3 аминокислотных замен по сравнению с ферментом α -GAL дикого типа (SEQ ID NO: 30).

[0033] В некоторых вариантах осуществления модифицированная последовательность содержит 10 аминокислотных замен по сравнению с ферментом α -GAL дикого типа (SEQ ID NO: 30).

[0034] В некоторых вариантах осуществления предложена рекомбинантная альфа-галактозидаза А. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 30 или ее функциональным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 30. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную

[0035] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или замену в SEQ ID NO:30 в одном или нескольких положениях, выбранных из: T41/M70/L75/S78/E79/Y123/R193/S197/K237/F248/N247/N278/L286/A292/H302/Q333/K314/L347/M353/S364/A368/S371/K374/K393/F396/E398/W399/R404/M423.

[0036] Дополнительные иллюстративные последовательности трансгена GLA и фермента α -GAL можно найти в публикациях PCT №№: PCT/US2021/019811, PCT/US2019/067493 и PCT/US2015/063329, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[0037] В некоторых вариантах осуществления модифицированный фермент α -GAL выбран из одной из SEQ ID NO: 7-17, 33, 34 и 46-60.

[0038] В некоторых вариантах осуществления модифицированный фермент α -GAL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления модифицированный фермент α -GAL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления модифицированный фермент α -GAL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления модифицированный фермент α -GAL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления модифицированный фермент α -GAL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления модифицированный фермент α -GAL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления модифицированный фермент α -GAL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления модифицированный фермент α -GAL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления модифицированный фермент α -GAL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления модифицированный фермент α -GAL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления модифицированный фермент α -GAL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления модифицированный фермент α -GAL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления модифицированный фермент α -GAL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления модифицированный фермент α -GAL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления

[0043] В некоторых вариантах осуществления модифицированный фермент α -GLA обладает повышенной удельной каталитической активностью по сравнению с ферментом α -GLA дикого типа (SEQ ID NO: 30).

[0044] В некоторых аспектах предложен способ лечения болезни Фабри у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, рекомбинантного аденоассоциированного вирусного вектора (rAAV), как описано в данном документе.

[0045] В некоторых аспектах предложена фармацевтическая композиция, содержащая вектор rAAV, как описано в данном документе.

[0046] В некоторых аспектах предложена клетка, содержащая вектор rAAV, как описано в данном документе. Клетка может быть любым типом клетки млекопитающего. Например, в некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку сердца. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку почки. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку печени. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку скелетных мышц. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку желудочно-кишечного тракта. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку головного мозга, такую как, например, нейрон или глиальная клетка. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой периферический нейрон.

[0047] В некоторых аспектах предложен способ лечения болезни Фабри у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, рекомбинантного аденоассоциированного вирусного вектора (rAAV), упакованного в капсид rAAV, обладающего широким тропизмом к ткани, причем вектор содержит: (a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); (b) универсальный промотор, содержащий энхансер цитомегаловируса (ЦМВ), промотор куриного бета-актина и интрон кроличьего бета-глобин; (c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL; (d) поли А; и (e) 3'-ITR.

[0048] В некоторых аспектах предложен способ лечения болезни Фабри у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, рекомбинантного аденоассоциированного вирусного вектора (rAAV), упакованного в капсид rAAV, обладающего широким тропизмом к ткани, причем вектор содержит: (a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); (b) универсальный промотор, содержащий энхансер цитомегаловируса (ЦМВ), промотор куриного бета-актина и интрон кроличьего бета-глобин; (c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL; (d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); (e) поли А; и (f) 3'-ITR.

[0049] В некоторых вариантах осуществления капсид AAV представляет собой капсид AAV с широким тропизмом, выбранный из капсида AAV1, капсида AAV2, капсида AAV3, капсида AAV4, капсида AAV5, капсида AAV6, капсида AAV7, капсида AAV8 или капсида AAV9. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV с широким тропизмом представляет собой капсид AAV1. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV с широким тропизмом представляет собой капсид AAV2. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV с широким тропизмом представляет собой капсид AAV3. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV с широким тропизмом представляет собой капсид AAV4. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV с широким тропизмом представляет собой капсид AAV5. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV с широким тропизмом представляет собой капсид AAV6. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV с широким тропизмом представляет собой капсид AAV7. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV с широким тропизмом представляет собой капсид AAV8. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV с широким тропизмом представляет собой капсид AAV9.

[0050] В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV вводят внутривенно, подкожно или трансдермально. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления вектор гAAV вводят внутривенно нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV вводят подкожно нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV вводят трансдермально нуждающемуся в этом субъекту.

[0051] В некоторых вариантах осуществления трансдермальное введение осуществляется с помощью генной пушки.

[0052] В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV является эписомальным после введения.

[0053] В некоторых вариантах осуществления гAAV, описанный в данном документе, вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в дозе ниже, чем доза, которую предполагается использовать с вектором AAV, нацеленным на печень для экспрессии α -GAL. В других вариантах осуществления гAAV, описанный в данном документе, при введении в эквивалентной дозе в качестве гAAV, нацеленного на печень, проявляет более высокое воздействие на α -GAL в сыворотке и ткани.

[0054] В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV с широким тропизмом к ткани и с использованием универсального промотора обеспечивает достижение терапевтического эффекта при лечении болезни Фабри при более низкой дозе, чем вектор гAAV, содержащий капсид AAV1, капсид AAV2, капсид AAV3, капсид AAV4, капсид

AAV5, капсид AAV6, капсид AAV7 или капсид AAV8 с использованием специфичного для печени промотора. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления вектор гAAV с широким тропизмом к тканям и универсальным промотором достигает терапевтического эффекта при более низкой дозе, чем вектор гAAV, содержащий капсид AAV1, со специфичным для печени промотором. В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV с широким тропизмом к тканям и универсальным промотором достигает терапевтического эффекта при более низкой дозе, чем вектор гAAV, содержащий капсид AAV2, со специфичным для печени промотором. В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV с широким тропизмом к тканям и универсальным промотором достигает терапевтического эффекта при более низкой дозе, чем вектор гAAV, содержащий капсид AAV3, со специфичным для печени промотором. В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV с широким тропизмом к тканям и универсальным промотором достигает терапевтического эффекта при более низкой дозе, чем вектор гAAV, содержащий капсид AAV3, со специфичным для печени промотором. В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV с широким тропизмом к тканям и универсальным промотором достигает терапевтического эффекта при более низкой дозе, чем вектор гAAV, содержащий капсид AAV4, со специфичным для печени промотором. В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV с широким тропизмом к тканям и универсальным промотором достигает терапевтического эффекта при более низкой дозе, чем вектор гAAV, содержащий капсид AAV5, со специфичным для печени промотором. В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV с широким тропизмом к тканям и универсальным промотором достигает терапевтического эффекта при более низкой дозе, чем вектор гAAV, содержащий капсид AAV6, со специфичным для печени промотором. В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV с широким тропизмом к тканям и универсальным промотором достигает терапевтического эффекта при более низкой дозе, чем вектор гAAV, содержащий капсид AAV7, со специфичным для печени промотором. В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV с широким тропизмом к тканям и универсальным промотором достигает терапевтического эффекта при более низкой дозе, чем вектор гAAV, содержащий капсид AAV8, со специфичным для печени промотором.

[0055] В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV, способный экспрессировать фермент α -GAL, может содержать специфичный для ткани промотор, например, специфичный для печени промотор. Примеры специфичных для печени промоторов включают, помимо прочего, например, транстиретиновый промотор (TTR); промотор тироксинсвязывающего глобулина (ТСГ); гибридный специфичный для печени промотор (HLP) и промотор альфа-1-антитрипсина (ААТ).

[0056] В некоторых вариантах осуществления после введения вектора гAAV у субъекта обнаруживают α -GAL в сыворотке в течение по меньшей мере 5 недель, 10 недель, 15 недель, 26 недель, 1 года, 5 лет, 10 лет или 20 лет. В некоторых вариантах осуществления после введения вектора гAAV у субъекта обнаруживают α -GAL в сыворотке в течение по меньшей мере 5 недель. В некоторых вариантах осуществления после введения вектора гAAV у субъекта обнаруживают α -GAL в сыворотке в течение по меньшей мере 10 недель. В некоторых вариантах осуществления после введения вектора гAAV у субъекта обнаруживают α -GAL в сыворотке в течение по меньшей мере 15 недель. В некоторых вариантах осуществления после введения вектора гAAV у субъекта обнаруживают α -GAL в сыворотке в течение по меньшей мере 26 недель. В некоторых вариантах осуществления после введения вектора гAAV у субъекта обнаруживают α -GAL в сыворотке в течение по меньшей мере 1 года. В некоторых вариантах осуществления после введения вектора гAAV у субъекта обнаруживают α -GAL в сыворотке в течение по меньшей мере 5 лет. В некоторых вариантах осуществления после введения вектора гAAV у субъекта обнаруживают α -GAL в сыворотке в течение по меньшей мере 10 лет. В некоторых вариантах осуществления после введения вектора гAAV у субъекта обнаруживают α -GAL в сыворотке в течение по меньшей мере 15 лет. В некоторых вариантах осуществления после введения вектора гAAV у субъекта обнаруживают α -GAL в сыворотке в течение по меньшей мере 20 лет. В некоторых вариантах осуществления после введения вектора гAAV у субъекта обнаруживают α -GAL в сыворотке на протяжении всей жизни субъекта.

[0057] В некоторых вариантах осуществления экспрессия модифицированного фермента α -GAL обеспечивает в 3, 10, 30, 100, 300 раз более высокие уровни α -GAL в сыворотке по сравнению с экспрессией α -GAL ДТ. В некоторых вариантах осуществления экспрессия модифицированного фермента α -GAL обеспечивает в 3, 10, 30, 100, 300 раз более высокие уровни внутриклеточного фермента по сравнению с экспрессией α -GAL ДТ.

[0058] В некоторых вариантах осуществления введение приводит к воздействию фермента α -GAL на один или несколько из печени, почек, сердца, желудочно-кишечного тракта, головного мозга и/или периферических нейронов субъекта. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления введение приводит к воздействию фермента α -GAL на печень. В некоторых вариантах осуществления введение приводит к воздействию фермента α -GAL на почки. В некоторых вариантах осуществления введение приводит к воздействию фермента α -GAL на сердце. В некоторых вариантах осуществления введение приводит к воздействию фермента α -GAL на желудочно-кишечный тракт и клетки, связанные с желудочно-кишечным трактом. В некоторых вариантах осуществления введение приводит к воздействию фермента α -GAL на головной мозг. В некоторых

вариантах осуществления введение приводит к воздействию фермента α -GAL на периферические нейроны.

[0059] В некоторых вариантах осуществления введение вектора гAAV приводит к повышению выживаемости мыши/пациента с Фабри. В некоторых вариантах осуществления введение вектора гAAV приводит к снижению уровней глоботриаозилцерамида (GB3) в одном или нескольких из печени, сердца, почек и желудочно-кишечного тракта субъекта. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления введение вектора гAAV приводит к снижению уровня GB3 в сердце. В некоторых вариантах осуществления введение вектора гAAV приводит к снижению уровня GB3 в скелетных мышцах. В некоторых вариантах осуществления введение вектора гAAV приводит к снижению уровня GB3 в почках. В некоторых вариантах осуществления введение вектора гAAV приводит к снижению уровня GB3 в желудочно-кишечном тракте. Уровни GB3 могут быть оценены любыми способами, известными в данной области техники, включая, например, хроматографические методы, включая, например, жидкостную хроматографию с тандемной масс-спектрометрией.

[0060] В некоторых аспектах данное изобретение охватывает способ экспрессии фермента α -GAL в клетке, включающий введение вектора гAAV, упакованного в капсид AAV9, причем указанный вектор содержит: (a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); (b) универсальный промотор, содержащий энхансер цитомегаловируса (ЦМВ), промотор куриного бета-актина и интрон кроличьего бета-глобина; (c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL; (d) поли А бычьего гормона роста (BGH); и (f) 3'-ITR.

[0061] В некоторых аспектах данное изобретение охватывает способ экспрессии фермента α -GAL в клетке, включающий введение вектора гAAV, упакованного в капсид AAV9, причем указанный вектор содержит: (a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); (b) универсальный промотор, содержащий энхансер цитомегаловируса (ЦМВ), промотор куриного бета-актина и интрон кроличьего бета-глобина; (c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL; (d) необязательно посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE), имеющий мутацию *mut6delATG*; (e) поли А бычьего гормона роста (BGH); и (f) 3'-ITR.

[0062] В некоторых аспектах данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, причем указанный вектор содержит 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); специфичный для печени промотор; нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL; поли А; и 3'-ITR.

[0063] В некоторых аспектах данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, причем указанный вектор содержит 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); специфичный для печени промотор; нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL; посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); поли А; и 3'-ITR.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0064] **Фиг. 1** представляет собой векторную диаграмму примерного rAAV9, содержащего GAL дикого типа под контролем универсального промотора (обозначаемого в данном документе как «rAAV9»), как описано в данном документе.

[0065] **Фиг. 2** представляет собой график, показывающий уровень альфа-галактозидазы в сыворотке в течение 12 недель после введения rAAV9 на мышинной модели болезни Фабри (GLAko), как описано в данном документе.

[0066] **Фиг. 3А-Фиг. 3М** представляют собой серию графиков, показывающих экспрессию альфа-галактозидазы в различных тканях и снижение GB3 в различных тканях после введения rAAV9-ДТ мышам GLAko с Фабри. **Фиг. 3А** показывает экспрессию альфа-галактозидазы в печени после введения rAAV9 по сравнению с rAAV9-null («null» относится к AAV9, который не содержит трансгена) и необработанным контролем. **Фиг. 3В** показывает экспрессию альфа-галактозидазы в почках после введения rAAV9-ДТ по сравнению с rAAV9-null и необработанным контролем. **Фиг. 3С** показывает экспрессию альфа-галактозидазы в сердце после введения rAAV9-ДТ по сравнению с необработанным контролем. **Фиг. 3D** показывает экспрессию альфа-галактозидазы в двенадцатиперстной кишке после введения rAAV9-ДТ по сравнению с rAAV9-null (нулевой вектор) и необработанным контролем. **Фиг. 3Е** показывает экспрессию альфа-галактозидазы в толстой кишке после введения rAAV9 по сравнению с rAAV9-null и необработанным контролем. **Фиг. 3F** показывает уровни GB3 в сыворотке по сравнению с ФЗТ и необработанным контролем. **Фиг. 3G** показывает уровни GB3 в печени по сравнению с ФЗТ и необработанным контролем. **Фиг. 3H** показывает уровни GB3 в почках по сравнению с ФЗТ и необработанным контролем. **Фиг. 3I** показывает уровни GB3 в сердце по сравнению с ФЗТ и необработанным контролем. **Фиг. 3J** показывает уровни lysoGB3 в сыворотке по сравнению с ФЗТ и необработанным контролем. **Фиг. 3K** показывает уровни lysoGB3 в печени по сравнению с ФЗТ и необработанным контролем. **Фиг. 3L** показывает уровни

lysoGb3 в почках по сравнению с ФЗТ и необработанным контролем. **Фиг. 3М** показывает уровни lysoGb3 в сердце по сравнению с ФЗТ и необработанным контролем.

[0067] **Фиг. 4А-Фиг. 4Г** представляет собой серию графиков, показывающих экспрессию альфа-галактозидазы в различных тканях после введения гAAV9 мышам с тяжелой формой Фабри (G3Stg/GLAko). **Фиг. 4А** показывает дозозависимую активность альфа-галактозидазы в сыворотке по сравнению с носителем (т.е. только буфером для состава) в течение 18 недель. **Фиг. 4В** показывает дозозависимое увеличение активности альфа-галактозидазы в печени по сравнению с нулевым вектором и носителем (т. е. только буфером для состава). **Фиг. 4С** показывает дозозависимое увеличение активности альфа-галактозидазы в почках по сравнению с нулевым вектором и носителем (т. е. только буфером для состава). **Фиг. 4Д** показывает дозозависимое увеличение активности альфа-галактозидазы в сердце по сравнению с нулевым вектором и носителем (т. е. только с буфером состава). **Фиг. 4Е** показывает дозозависимое увеличение активности альфа-галактозидазы в двенадцатиперстной кишке по сравнению с нулевым вектором и носителем (т.е. только буфером для состава). **Фиг. 4F** показывает дозозависимое увеличение активности альфа-галактозидазы в толстой кишке по сравнению с нулевым вектором и носителем (только буфером для состава). **Фиг. 4Г** показывает дозозависимое увеличение активности альфа-галактозидазы в головном мозге по сравнению с нулевым вектором и носителем (т. е. только с буфером состава).

[0068] **Фиг. 5А-Фиг. 5F** представляют собой серию графиков, показывающих снижение GB3 в различных тканях после введения гAAV9 в мышиную модель с тяжелой формой болезни Фабри. **Фиг. 5А** показывает снижение GB3 в печени после введения гAAV9-ДТ по сравнению с гAAV9-null и носителем (т.е. только буфером для состава). **Фиг. 5В** показывает снижение GB3 в почке после введения гAAV9-ДТ по сравнению с гAAV9-null и носителем (т.е. только буфером для состава). **Фиг. 5С** показывает снижение GB3 в сердце после введения гAAV9-ДТ по сравнению с гAAV9-null и носителем (т.е. только буфером для состава). **Фиг. 5D** показывает снижение GB3 в двенадцатиперстной кишке после введения гAAV9-ДТ по сравнению с гAAV9-null и носителем (т.е. только буфером для состава). **Фиг. 5Е** показывает снижение GB3 в толстой кишке после введения гAAV9-ДТ по сравнению с гAAV9-null и носителем (т.е. только буфером для состава). **Фиг. 5F** показывает снижение GB3 в головном мозге после введения гAAV9-ДТ по сравнению с гAAV9-null и носителем (т.е. только буфером для состава). **Фиг. 5G** показывает дозозависимое снижение lysoGb3 в печени по сравнению с гAAV9-null. **Фиг. 5H** показывает дозозависимое снижение lysoGb3 в почке по сравнению с гAAV9-null. **Фиг. 5I** показывает дозозависимое снижение lysoGb3 в сердце по сравнению с гAAV9-null. **Фиг. 5J** показывает

дозозависимое снижение IysoGb3 в двенадцатиперстной кишке по сравнению с rAAV9-null. **Фиг. 5К** показывает дозозависимое снижение IysoGb3 в толстой кишке по сравнению с rAAV9-null. **Фиг. 5L** показывает дозозависимое снижение IysoGb3 в головном мозге по сравнению с rAAV9-null.

[0069] **Фиг. 6** представляет собой график, показывающий увеличение массы тела после введения возрастающих концентраций rAAV9-ДТ по сравнению с нулевым вектором (rAAV9-null) и носителем (т.е. только буфером для состава) у мышей с тяжелой формой болезни Фабри.

[0070] **Фиг. 7А-Фиг. 7В** представляют собой серию графиков, показывающих улучшение функции почек в 27-28-недельных мышей в мышинной модели с тяжелой формой болезни Фабри после введения rAAV9-ДТ. **Фиг. 7А** показывает дозозависимую нормализацию АМК в сыворотке. **Фиг. 7В** показывает нормализацию уровня альбумина в моче после введения rAAV9-ДТ.

[0071] **Фиг. 8А-Фиг. 8С** представляют собой фигуры, демонстрирующие иммуногистохимию подушечек лап мышинной модели с тяжелой формой болезни Фабри (G3Stg/GLAko). **Фиг. 8А** показывает препарат иммуногистохимии подушечек лап мышинной модели болезни Фабри, показывающий уменьшение вакуолизации в нервах дорсальных корешков. **Фиг. 8В** показывает препарат иммуногистохимии дозозависимой нормализации окрашивания PGP9.5 (нейронный маркер) в мышинной модели болезни Фабри. **Фиг. 8С** показывает препарат иммуногистохимии дозозависимого увеличения окрашивания MPZ (маркер шванновских клеток) в мышинной модели болезни Фабри.

[0072] **Фиг. 9А-Фиг. 9I** показывают изображения гистопатологических особенностей почек, сердца и ганглиев дорсальных корешков (ГДК). **Фиг. 9А** показывает окрашивание p62 (маркер аутофагии), наблюдаемое в собирательных трубочках почек мышей дикого типа. **Фиг. 9В** показывает окрашивание p62, наблюдаемое в собирательных трубочках почек мышей с болезнью Фабри, не получавших лечения. На **Фиг. 9С** показано окрашивание p62, наблюдаемое в собирательных трубочках почек мышей с болезнью Фабри при введении $6,25 \times 10^{12}$ вг/кг rAAV9-ДТ. **Фиг. 9D** показывает окрашивание p62, наблюдаемое в сердце мыши дикого типа. **Фиг. 9E** показывает окрашивание p62, наблюдаемое в сердце мыши с болезнью Фабри, не получавших лечения. На **Фиг. 9F** показано окрашивание p62, наблюдаемое в сердце мыши с болезнью Фабри при введении $6,25 \times 10^{12}$ вг/кг rAAV9-ДТ. **Фиг. 9G** показывает окрашивание CD68, наблюдаемое в ГДК мышей дикого типа. **Фиг. 9H** показывает окрашивание CD68, наблюдаемое в ГДК мышей с болезнью Фабри, не получавших лечения. **Фиг. 9I** показывает окрашивание CD68, наблюдаемое в ГДК мышей с болезнью Фабри при введении $6,25 \times 10^{12}$ вг/кг rAAV9-ДТ.

[0073] **Фиг. 10А-10F** показывают воздействие вариантов α -GAL в сыворотке и тканях мышей с болезнью Фабри через 2 дня после гидродинамической инъекции в хвостовую вену плазмид, экспрессирующих варианты α -GAL. На **Фиг. 10А** показано воздействие вариантов α -GAL в сыворотке. На **Фиг. 10В** показано воздействие вариантов α -GAL в почках. На **Фиг. 10С** показано воздействие вариантов α -GAL в сердце. На **Фиг. 10D** показано воздействие вариантов α -GAL в сыворотке. На **Фиг. 10Е** показано воздействие вариантов α -GAL в почках. На **Фиг. 10F** показано воздействие вариантов α -GAL в сердце.

[0074] **Фиг.11А** представляет собой график, показывающий уровень альфа-галактозидазы в сыворотке в течение 12 недель после введения конструкции на основе гAAV9 с универсальным промотором или конструкции на основе гAAV8 с промотором, специфичным для печени. **Фиг. 11В** показывает экспрессию альфа-галактозидазы в почках после введения гAAV9-ДТ по сравнению с гAAV8-ДТ, а также с белком альфа-галактозидазы в дозе 1 мг/кг и необработанным контролем. **Фиг. 11С** показывает процентное снижение GB3 в почках после введения гAAV9-ДТ по сравнению с гAAV8-ДТ, а также с белком альфа-галактозидазы в дозе 1 мг/кг и необработанным контролем.

[0075] **Фиг. 12А-12В** представляют собой серию графиков, показывающих функцию почек на мышинной модели Фабри в возрасте 27-28 недель после введения гAAV9-ДТ и гAAV8-ДТ. На **Фиг. 12А** показана дозозависимая нормализация азота мочевины крови (АМК) с помощью гAAV9-ДТ. На **Фиг. 12В** показаны изменения АМК в сыворотке под действием гAAV8-ДТ.

[0076] На **Фиг. 13А-13Е** показана серия графиков, показывающих активности галактозидазы в сыворотке и тканях вариантов α -GAL после введения мышам с тяжелой формой болезни Фабри гAAV9, экспрессирующего варианты α -GAL. На **Фиг. 13А** показана активность альфа-галактозидазы в сыворотке при дозе $5,0 \times 10^{10}$ вг/кг из Исследования 1. На **Фиг. 13В** показана активность альфа-галактозидазы в сыворотке при дозировке $2,5 \times 10^{11}$ согласно Исследованию 1. На **Фиг. 13С** показана активность альфа-галактозидазы в почках при двух разных дозировках в соответствии с Исследованием 1. На **Фиг. 13D** показана активность альфа-галактозидазы в сердце в двух разных дозировках в соответствии с Исследованием 1. На **Фиг. 13Е** показана активность альфа-галактозидазы в печени в двух разных дозировках в соответствии с Исследованием 1.

[0077] На **Фиг. 14А-14D** показана серия графиков, показывающих уровни альфа-галактозидазы в сыворотке и тканях вариантов α -GAL после введения мышам с тяжелой формой болезни Фабри гAAV9, экспрессирующего варианты α -GAL, в соответствии с

Исследованием 2. На **Фиг. 14А** показана активность альфа-галактозидазы в сыворотке при дозе $2,5 \times 10^{11}$ вг/кг из Исследования 2. На **Фиг. 14В** показана активность альфа-галактозидазы в почке в двух разных дозировках в соответствии с Исследованием 2. На **Фиг. 14С** показана активность альфа-галактозидазы в сердце в двух разных дозировках в соответствии с Исследованием 2. На **Фиг. 14D** показана активность альфа-галактозидазы в печени в двух разных дозировках в соответствии с Исследованием 2.

[0078] **Фиг. 15А-15D** представляет собой серию графиков, показывающих присутствие GB3 в сыворотке и тканях мышей, получавших гAAV9, экспрессирующий варианты α -GAL, в соответствии с Исследованием 1. На **Фиг. 15А** показан GB3 в сыворотке в ответ на введение гAAV9, экспрессирующего варианты α -GAL. На **Фиг. 15В** показан GB3 в почке в ответ на введение гAAV9, экспрессирующего варианты α -GAL. На **Фиг. 15С** показан GB3 в сердце в ответ на введение гAAV9, экспрессирующего варианты α -GAL. На **Фиг. 15D** показан GB3 в печени в ответ на введение гAAV9, экспрессирующего варианты α -GAL.

[0079] **Фиг. 16А-16D** представляет собой серию графиков, показывающих присутствие lysoGb3 в сыворотке и тканях мышей, получавших гAAV9, экспрессирующий варианты α -GAL, в соответствии с Исследованием 1. На **Фиг. 16А** показан lysoGb3in в сыворотке в ответ на введение гAAV9, экспрессирующего варианты α -GAL. На **Фиг. 16В** показан lysoGb3 в почке в ответ на введение гAAV9, экспрессирующего варианты α -GAL. На **Фиг. 16С** показан lysoGb3 в сердце в ответ на введение вариантов. На **Фиг. 16D** показан lysoGb3 в печени в ответ на введение гAAV9, экспрессирующего варианты α -GAL.

[0080] На **Фиг. 17А-17D** представляет собой серию графиков, показывающих присутствие GB3 в сыворотке и тканях мышей, получавших гAAV9, экспрессирующий варианты α -GAL, в соответствии с Исследованием 2. На **Фиг. 17А** показан GB3 в сыворотке в ответ на введение вариантов. На **Фиг. 17В** показан GB3 в почке в ответ на введение гAAV9, экспрессирующего варианты α -GAL. На **Фиг. 17С** показан GB3 в сердце в ответ на введение гAAV9, экспрессирующего варианты α -GAL. На **Фиг. 17D** показан GB3 в печени в ответ на введение гAAV9, экспрессирующего варианты α -GAL.

[0081] На **Фиг. 18А-18D** представляет собой серию графиков, показывающих присутствие lysoGb3 в сыворотке и тканях мышей, получавших гAAV9, экспрессирующий варианты α -GAL, в соответствии с Исследованием 2. На **Фиг. 18А** показан lysoGb3 в сыворотке в ответ на введение гAAV9, экспрессирующего варианты α -GAL. На **Фиг. 18В** показан lysoGb3 в почке в ответ на введение гAAV9, экспрессирующего варианты α -GAL. На **Фиг. 18С** показан lysoGb3 в сердце в ответ на введение гAAV9, экспрессирующего

варианты α -GAL. На **Фиг. 18D** показан lysoGb3 в печени в ответ на введение гAAV9, экспрессирующего варианты α -GAL.

[0082] **Фиг. 19A-19D** представляют собой серию графиков, показывающих активность α -GAL *in vitro* в клетках HUH-7 и HEK293 после трансфекции плазмидами, экспрессирующими кодон-оптимизированные варианты α -GAL 004 и D. **Фиг. 19A** представляет собой гистограмму, показывающую активность α -GAL *in vitro* в клетках HUH-7, трансфицированных вариантами плазмиды, содержащей D, D1-D6, по сравнению с α -GAL ДТ и без плазмиды. **ФИГ. 19B** представляет собой гистограмму, показывающую активность α -GAL *in vitro* в клетках HEK293, трансфицированных вариантами плазмиды, содержащей от D, D1-D6, по сравнению с α -GAL ДТ и без плазмиды. **Фиг. 19C** представляет собой гистограмму, показывающую активность α -GAL *in vitro* в клетках HUH-7, трансфицированных вариантами плазмиды, содержащей от 004, 004-1 до 004-5, по сравнению с α -GAL ДТ и без плазмиды. **Фиг. 19D** представляет собой гистограмму, показывающую активность α -GAL *in vitro* в клетках HEK293, трансфицированных вариантами плазмиды, содержащей от 004, 004-1 до 004-5, по сравнению с α -GAL ДТ и без плазмиды.

[0083] На **Фиг. 20A-20D** показана серия графиков, показывающих дозозависимую активность α -GAL в различных тканях на мышинной модели с тяжелой формой болезни Фабри, получавшей гAAV9-D3 и гAAV9-004-3. **Фиг. 20A** представляет собой гистограмму дозозависимой активности α -GAL в сыворотке на мышинной модели с тяжелой формой болезни Фабри, получавшей гAAV9-D3 и гAAV9-004-3. **Фиг. 20B** представляет собой гистограмму дозозависимой активности α -GAL в почке на мышинной модели с тяжелой формой болезни Фабри, получавшей гAAV9-D3 и гAAV9-004-3. **Фиг. 20C** представляет собой гистограмму дозозависимой активности α -GAL в сердце на мышинной модели с тяжелой формой болезни Фабри, получавшей гAAV9-D3 и гAAV9-004-3. **Фиг. 20D** представляет собой гистограмму дозозависимой активности α -GAL в печени на мышинной модели с тяжелой формой болезни Фабри, получавшей гAAV9-D3 и гAAV9-004-3.

[0084] На **Фиг. 21A-21H** показана серия графиков, показывающих дозозависимое снижение субстрата в различных тканях на мышинной модели с тяжелой формой болезни Фабри, получавшей гAAV9-D3 и гAAV9-004-3. **Фиг. 21A** представляет собой график, показывающий дозозависимое снижение GB3 в сыворотке на мышинной модели с тяжелой формой болезни Фабри, получавшей гAAV9-D3 и гAAV9-004-3. **Фиг. 21B** представляет собой график, показывающий дозозависимое снижение lysoGb3 в сыворотке на мышинной модели с тяжелой формой болезни Фабри, получавшей гAAV9-D3 и гAAV9-004-3. **Фиг. 21C** представляет собой график, показывающий дозозависимое снижение GB3 в почках на

мышинной модели с тяжелой формой болезни Фабри, получавшей гAAV9-D3 и гAAV9-004-3. **Фиг. 21D** представляет собой график, показывающий дозозависимое снижение lysoGb3 в почке на мышинной модели с тяжелой формой болезни Фабри, получавшей гAAV9-D3 и гAAV9-004-3. **Фиг. 21E** представляет собой график, показывающий дозозависимое снижение GB3 в сердце на мышинной модели с тяжелой формой болезни Фабри, получавшей гAAV9-D3 и гAAV9-004-3. **Фиг. 21F** представляет собой график, показывающий дозозависимое снижение lysoGb3 в сердце на мышинной модели с тяжелой формой болезни Фабри, получавшей гAAV9-D3 и гAAV9-004-3. **Фиг. 21G** представляет собой график, показывающий дозозависимое снижение GB3 в печени на мышинной модели с тяжелой формой болезни Фабри, получавшей гAAV9-D3 и гAAV9-004-3. **Фиг. 21H** представляет собой график, показывающий дозозависимое снижение lysoGb3 в печени на мышинной модели с тяжелой формой болезни Фабри, получавшей гAAV9-D3 и гAAV9-004-3.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0085] *Приблизительно или около:* В контексте данного документа термин «приблизительно», применительно к одному или *большому количеству* значений, представляющим интерес, относится к значению, которое аналогично установленному эталонному значению. В некоторых вариантах осуществления термин «приблизительно» относится к диапазону значений, которые попадают в пределы 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % или менее в любую сторону (больше или меньше) от установленного эталонного значения, если не указано иное или иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число превышало бы 100 % от возможного значения). Понятно, что когда термин «около» или «приблизительно» используется для изменения заявленного эталонного значения, само указанное эталонное значение охватывается вместе со значениями, близкими к указанному эталонному значению по обе стороны от указанного эталонного значения.

[0086] *Введение:* Термины «вводить», «введение» и «процесс введения» относятся к предоставлению композиции по данному изобретению (например, рекомбинантного вектора генной терапии, экспрессирующего альфа-галактозидазу) субъекту, нуждающемуся в этом (например, субъекту, страдающему от последствий болезни Фабри).

[0087] *Вводимые в комбинации:* Используемый в данном документе термин «вводимые в комбинации» или «комбинированное введение» означает, что два или более агента вводятся субъекту одновременно или с интервалом, так что может иметь место перекрытие эффекта каждого агента на пациента. В некоторых вариантах осуществления

введение агентов осуществляется достаточно близко друг к другу, так что достигается комбинированный (например, синергический) эффект.

[0088] *Аллогенный*: Используемый в данном документе термин «аллогенный» относится к любому материалу, полученному от другого животного того же вида, что и индивид, которому вводят этот материал. Считается, что два или более индивидов являются аллогенными по отношению друг к другу, когда гены в одном или более локусов не являются идентичными. В некоторых аспектах аллогенный материал, полученный от индивидов одного и того же вида, может достаточно отличаться генетически для антигенного взаимодействия.

[0089] *Аминокислотная замена*: Термин «аминокислотная замена» относится к замене аминокислотного остатка, присутствующего в исходной или эталонной последовательности (например, последовательности GLA дикого типа), другим аминокислотным остатком. Аминокислота может быть заменена в исходной или эталонной последовательности (например в последовательности полипептида GLA дикого типа), например, с помощью химического пептидного синтеза или рекомбинантных способов, известных в данной области техники. Соответственно, ссылка на «замену в положении X» относится к замене аминокислоты, присутствующей в положении X, альтернативным аминокислотным остатком. В некоторых аспектах паттерны замещения могут быть описаны в соответствии со схемой AnY, при этом A представляет собой однобуквенный код, соответствующий аминокислоте, естественно или первоначально присутствующую в положении n, и Y представляет собой замещающий аминокислотный остаток. В других аспектах паттерны замещения могут быть описаны в соответствии со схемой An(YZ), при этом A представляет собой однобуквенный код, соответствующий аминокислотному остатку, заменяющему аминокислоту, естественно или первоначально присутствующую в положении X, и Y и Z представляют собой альтернативную замену аминокислотных остатков.

[0090] Сокращения, используемые для генетически кодируемых аминокислот, являются общепринятыми и представляют собой следующие: аланин (Ala или A), аргинин (Arg или R), аспарагин (Asn или N), аспартат (Asp или D), цистеин (Cys или C), глутамат (Glu или E), глутамин (Gln или Q), гистидин (His или H), изолейцин (Ile или I), лейцин (Leu или L), лизин (Lys или K), метионин (Met или M), фенилаланин (Phe или F), пролин (Pro или P), серин (Ser или S), треонин (Thr или T), триптофан (Trp или W), тирозин (Tyr или Y) и валин (Val или V). Когда используются трехбуквенные аббревиатуры, если только им не предшествует буква «L» или «D» или это не ясно из контекста, в котором используется аббревиатура, аминокислота может быть либо в L-, либо в D-конфигурации относительно

α -углерода (C_{α}). В различных вариантах осуществления, описанных в данном документе, одна или несколько аминокислот в последовательности GLA дикого типа могут быть заменены другой аминокислотой, что приводит к варианту белка α -GAL.

[0091] Замены в аминокислотной последовательности белка или полипептида могут быть как консервативными, так и неконсервативными по своей природе. Консервативная аминокислотная замена относится к замене остатка другим остатком, имеющим аналогичную боковую цепь, и, таким образом, обычно включает замену аминокислоты в полипептиде (например, в аминокислотной последовательности α -GAL) аминокислотами того же или подобного определенного класса аминокислот. В качестве примера, но не ограничения, аминокислота с алифатической боковой цепью может быть заменена другой алифатической аминокислотой (например, аланином, валином, лейцином и изолейцином); аминокислота с гидроксильной боковой цепью заменена другой аминокислотой с гидроксильной боковой цепью (например, серином и треонином); аминокислота, имеющая ароматические боковые цепи, заменена другой аминокислотой, имеющей ароматическую боковую цепь (например, фенилаланином, тирозином, триптофаном и гистидином); аминокислота с основной боковой цепью заменена другой аминокислотой с основной боковой цепью (например, лизином и аргинином); аминокислота с кислотной боковой цепью заменена другой аминокислотой с кислотной боковой цепью (например, аспарагиновой кислотой или глутаминовой кислотой); и/или гидрофобная или гидрофильная аминокислота заменена другой гидрофобной или гидрофильной аминокислотой, соответственно. Неконсервативная замена относится к замене аминокислоты в полипептиде (например, аминокислотной последовательности α -GAL) аминокислотой со значительно отличающимися свойствами боковой цепи. В качестве примера, но не ограничения, типичная неконсервативная замена может представлять собой кислотную аминокислоту, замененную основной или алифатической аминокислотой; ароматическую аминокислоту, замененную аминокислотой с небольшой боковой цепью; и гидрофильную аминокислоту, замененную гидрофобной аминокислотой.

[0092] В контексте данного изобретения замены (даже когда они называются аминокислотной заменой) осуществляются на уровне нуклеиновой кислоты, т. е. замена аминокислотного остатка альтернативным аминокислотным остатком осуществляется путем замены кодона, кодирующего первую аминокислоту кодоном, кодирующим вторую аминокислоту.

[0093] *Животное*: В контексте данного документа термин «животное» относится к любому представителю царства животных. В некоторых вариантах осуществления «животное» относится к человеку на любой стадии развития. В некоторых вариантах

осуществления изобретения «животное» относится к отличным от человека животным на любой стадии развития. В некоторых вариантах осуществления изобретения животное, не являющееся человеком, представляет собой млекопитающее (например, грызун, мышь, крысу, кролик, обезьяну, собаку, кошку, овцу, крупный рогатый скот, примат или свинью). В некоторых вариантах осуществления изобретения животные включают, но не ограничиваются ими, млекопитающих, птиц, рептилий, амфибий, рыб и червей. В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой трансгенное животное, генно-модифицированное животное или клон.

[0094] *Азот мочевины крови:* Используемый в данном документе термин «азот мочевины крови» или «АМК» относится к содержанию мочевины в крови. Азот мочевины крови повышен при патологии, связанной с почками. Хроническая болезнь почек является одним из основных признаков болезни Фабри, вызывая терминальную стадию почечной недостаточности. Считается, что отложения Gb-3 в гломерулярных подоцитах способствуют, по меньшей мере частично, протеинурии или скорости прогрессирования или тяжести поражения почек при болезни Фабри. Азот мочевины крови измеряет эффективность почек по удалению мочевины из крови. Высокие уровни АМК указывают на плохую функцию почек.

[0095] *Химера:* Используемый в данном документе термин «химера» представляет собой соединение, имеющее две или более несовместимых или гетерогенных частей или областей. Например, химерная молекула может содержать первую часть, содержащую полипептид GLA, и вторую часть (например, генетически слитую с первой частью), содержащую второй терапевтический белок (например, белок с отчетливой ферментативной активностью, антигенсвязывающим фрагментом, или фрагментом, способным продлить период полужизни α -GAL в плазме, например, Fc-область антитела).

[0096] *Замена кодона:* Используемые в данном документе термины «замена кодона» или «замещение кодона» в контексте оптимизации последовательности относятся к замене кодона, присутствующего в эталонной последовательности нуклеиновой кислоты, другим кодоном. Кодон может быть заменен в эталонной последовательности нуклеиновой кислоты, например, с помощью химического пептидного синтеза или с помощью рекомбинантных методов, известных в данной области техники. Соответственно, ссылки на «замену» или «замещение» в определенном месте последовательности нуклеиновой кислоты (например, мРНК) или в определенной области или подпоследовательности последовательности нуклеиновой кислоты (например, мРНК) относятся к замене кодона в таком месте или области альтернативным кодоном.

[0097] *Кодон-оптимизированный*: Термин «кодон-оптимизированный» или «оптимизация по кодону» относится к изменениям в кодонах полинуклеотида, кодирующего белок (например, ген GLA), таким образом, что кодируемый белок более эффективно экспрессируется, например, в клетке или организме. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотида, кодирующие ферменты α -GAL, могут быть кодон-оптимизированными для оптимальной продукции из организма-хозяина и/или типа(ов) клеток, выбранных для экспрессии с учетом содержания ГК, криптоических сайтов сплайсинга, сигналов терминации транскрипции, мотивов, которые могут влиять на стабильность РНК и вторичных структур нуклеиновых кислот, а также любых других представляющих интерес факторов.

[0098] *Сконструированные варианты*: Термин «сконструированные варианты α -GAL» или «сконструированные варианты» относятся к белкам GAL, в которых по сравнению с α -GAL дикого типа один или несколько аминокислотных остатков были модифицированы путем замены, делеции или вставки. В некоторых вариантах осуществления сконструированные варианты характеризуются улучшенной эффективностью и фармакокинетическими профилями благодаря, например, модифицированным структурным характеристикам белка. В некоторых вариантах осуществления сконструированные варианты α -GAL усиливают выведение субстратов из тканей, таких как сыворотка, почки, сердце и/или печень. Сконструированные варианты могут быть синтезированы или получены рекомбинантным путем.

[0099] *Gb3*: Используемый в данном документе термин «Gb3», или «глоботриаозилцерамид», или «GB3», или «gb3», или «CD77», или «GL-3» относится к типу гликофинголипида, который накапливается в лизосомах при болезни Фабри и считается основным причинным метаболитом. GB3 образуется за счет α -связи галактозы с лактозилцерамидом, катализируемой A4GALT. GB3 гидролизует по терминальной альфа-связи с помощью GLA. Примером болезни Фабри является накопление GB3 во всех органах (особенно в сердце и почках), а также во многих клетках и моче. Такое накопление сопровождается выраженным повышением риска развития инсульта, заболеваний сердца (гипертрофическая кардиомиопатия, нарушения ритма и проводящей системы, ишемическая болезнь сердца, клапанные аномалии и др.) и хронической протеинурии, почечной недостаточности. В некоторых вариантах осуществления деацелированный GB3 или lysoGb3 также является значимым биомаркером болезни Фабри.

[0100] *Ген*: Термин «ген», используемый в данном документе, относится к области ДНК, кодирующей белок или полипептид (например, фермент альфа-галактозидазу, как описано в данном документе), а также ко всем областям ДНК, которые регулируют

продукцию белка или полипептида, являются ли такие регуляторные последовательности смежными с кодирующими и/или транскрибируемыми последовательностями. Соответственно, ген включает, но не обязательно ограничивается этим, промоторные последовательности, терминаторы, последовательности регуляции трансляции, такие как сайты связывания рибосом и внутренние сайты посадки рибосом, энхансеры, сайленсеры, инсуляторы, граничные элементы, точки начала репликации, сайты прикрепления к матриксу и контрольные области локуса.

[0101] *Ген GLA*: Используемый в данном документе термин «ген GLA» или «ген галактозидазы», или «ген альфа-галактозидазы», или «ген α -галактозидазы» относится к гену, который кодирует фермент альфа-галактозидазу, расщепляющий глоботриаозилцерамид. Генетическая мутация в гене GLA приводит к нарушению функции фермента альфа-галактозидазы. У человека ген GLA расположен в положении Xq22.1, которое представляет собой длинное (q) плечо X-хромосомы в положении 22.1. Некоторые из других названий, под которыми может упоминаться ген GLA, включают AGAL HUMAN, агалсидазу альфа, альфа-D-галактозидазу A, альфа-D-галактозидазу галактогидролазу, альфа-галактозидазу, альфа-галактозидазу A, церамидтригексозидазу, GALA, галактозидазу или мелибиаза.

[0102] *Галактозидаза*: Термин «галактозидаза», или «альфа-галактозидаза A», или « α -галактозидаза A», или « α -GAL», используемый в данном документе, относится к ферменту, кодируемому геном GLA. Альфа-галактозидаза человека (EC 3.2.1.22) представляет собой лизосомальный фермент, который гидролизует концевые альфа-галактозилные фрагменты гликолипидов и гликопротеинов. Используемый в данном документе термин α -GAL может относиться к ферменту дикого типа или его варианту. Дефицит альфа-галактозидазы A вызывает болезнь Фабри (также называемую диффузной ангиокератомой туловища, болезнью Андерсона-Фабри, наследственным дистопическим липидозом, дефицитом альфа-галактозидазы A, дефицитом α -GAL и дефицитом церамидтригексозидазы), которая является врожденной ошибкой катаболизма гликосфинголипидов, сцепленной с X-хромосомой. В различных вариантах осуществления, описанных в данном документе, предложена платформа для генной терапии для лечения болезни Фабри.

[0103] *«Улучшенное свойство фермента»*: Термин «улучшенное свойство фермента» относится к любому свойству или свойству сконструированного полипептида α -GAL, которое является улучшением по сравнению с таким же свойством или свойством эталонного полипептида α -GAL (например, по сравнению с полипептидом α -GAL дикого типа или другим сконструированным полипептидом α -GAL). Улучшенные свойства

включают, помимо прочего, повышенную экспрессию генов, повышенную продукцию белка, повышенную термоактивность, повышенную термостабильность, повышенную активность при различных уровнях pH, повышенную стабильность, повышенную ферментативную активность, повышенную субстратную специфичность или аффинность, повышенную специфическую активность, повышенную устойчивость к ингибированию субстрата и/или продукта, повышенную химическую стабильность, улучшенную хемоселективность, улучшенную устойчивость к растворителям, повышенную толерантность к кислоте, нейтральному или щелочному pH, повышенную толерантность к протеолитической активности (т. е. сниженную чувствительность к протеолизу), сниженную агрегацию, повышенную растворимость, сниженную иммуногенность, улучшенную посттрансляционную модификацию (например, гликозилирование), измененный температурный профиль, повышенное клеточное поглощение, повышенную лизосомальную стабильность, повышенную способность клеток истощать GB3, повышенную секрецию клетками, продуцирующими α -GAL, и т. Д. В различных вариантах осуществления векторы для генной терапии, охватываемые данным изобретением, содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид α -GAL, обладающий одним или несколькими улучшенными свойствами фермента по сравнению с эталонным полипептидом α -GAL. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид α -GAL, проявляющий одно или несколько улучшенных ферментативных свойств, является кодон-оптимизированной.

[0104] В различных вариантах осуществления кодон-оптимизированные и/или сконструированные варианты α -GAL проявляют одно или несколько вышеупомянутых улучшенных свойств. В конкретном варианте осуществления вариант α -GAL с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:10 или SEQ ID NO: 50, обладает улучшенной стабильностью в сыворотке и лизосомах, а вариант α -GAL с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO: 55, обладает повышенной удельной каталитической активностью по сравнению с полипептидом α -GAL дикого типа.

[0105] *«Повышенная ферментативная активность»:* Термин «повышенная ферментативная активность» относится к увеличению специфической активности (например, количество произведенного продукта/время/масса белка) или увеличению процентной конверсии субстрата в продукт (например, процентной конверсии исходного количества субстрата в продукт в определенный период времени) с использованием

определенного количества сконструированного фермента α -GAL по сравнению с эталонным ферментом α -GAL (например, ферментом α -GAL дикого типа или другим сконструированным вариантом). Для определения активности фермента можно использовать любой подходящий способ, известный в данной области техники и/или описанный в данном документе. Может быть затронуто любое свойство, относящееся к ферментативной активности, включая классические ферментативные свойства K_m , V_{max} или k_{cat} , изменения которых могут привести к повышению ферментативной активности. Улучшение ферментативной активности может составлять от около 1,1-кратного улучшения ферментативной активности соответствующего фермента дикого типа до 2-кратного, 5-кратного, 10-кратного, 20-кратного, 25-кратного, 50-кратного, 75-кратного, 100-кратного, 150-кратного, 200-кратного увеличения или более ферментативной активности, чем у эталонного фермента α -GAL.

[0106] *Собственная экспрессия:* Термин «собственная экспрессия» и его грамматические эквиваленты относятся к экспрессии гена в одной или нескольких клетках, в которые вводят трансген. Собственная экспрессия использует собственные или уже существующие механизмы и ресурсы транскрипции или трансляции клетки для экспрессии трансгена. Например, в некоторых вариантах осуществления, когда этот термин используется для обозначения «собственной системы экспрессии α -GAL», это означает, что α -GAL экспрессируется внутри клеток ткани.

[0107] *Нуклеиновая кислота:* Используемые в данном документе термины «нуклеиновая кислота», «полинуклеотид» и «олигонуклеотид» применяются взаимозаменяемо и относятся к дезоксирибонуклеотидному или рибонуклеотидному полимеру в линейной или кольцевой конформации, а также в одноцепочечной или двухцепочечной форме. Для целей данного изобретения эти термины не должны толковаться как ограничивающие длину полимера. Указанные термины могут охватывать известные аналоги природных нуклеотидов, а также нуклеотиды, модифицированные по основанию, сахару и/или фосфатному фрагменту (например, фосфортиоатным каркасам). В общем, аналог конкретного нуклеотида имеет такую же специфичность спаривания оснований; то есть аналог А будет иметь пару оснований с Т.

[0108] *Функциональная связь:* Используемые в данном документе термины «функциональная связь» и «функционально связанный» (или «функционально связанный») используются взаимозаменяемо в отношении сопоставления двух или более компонентов (таких как элементы последовательности), в которых компоненты расположены таким образом, что оба компонента функционируют нормально и допускают возможность того, что по меньшей мере один из компонентов может опосредовать функцию, воздействующую

по меньшей мере на один из других компонентов. В качестве иллюстрации, транскрипционная регуляторная последовательность, такая как промотор, функционально связана с кодирующей последовательностью, если транскрипционная регуляторная последовательность контролирует уровень транскрипции кодирующей последовательности в ответ на присутствие или отсутствие одного или более транскрипционных регуляторных факторов. Транскрипционная регуляторная последовательность обычно функционально связана в цис-положении с кодирующей последовательностью, но не обязательно должна непосредственно граничить с ней. Например, энхансер представляет собой регуляторную последовательность транскрипции, которая функционально связана с кодирующей последовательностью, даже если они не являются смежными.

[0109] *Физиологический рН:* Используемый в данном документе термин «физиологический рН» означает диапазон рН, обычно обнаруживаемый в крови субъекта (например, человека).

[0110] *Базовый рН:* Термин «базовый рН» (например, используемый в отношении улучшенной стабильности в условиях базового рН или повышенной устойчивости к базовому рН) означает диапазон рН от около 7 до 11.

[0111] *Кислый рН:* термин «кислый рН» (например, используемый в отношении повышенной устойчивости к кислым условиям рН или повышенной толерантности к кислому рН) означает диапазон рН от около 1,5 до 4,5. *Полипептид:* Используемые в данном документе термины «полипептид», «пептид» и «белок» используются взаимозаменяемо для обозначения полимера аминокислотных остатков. Этот термин также применяется к аминокислотным полимерам, в которых одна или несколько аминокислот являются химическими аналогами или модифицированными производными соответствующих встречающихся в природе аминокислот.

[0112] *Промотор:* Используемый в данном документе термин «промотор» охватывает последовательность ДНК, которая направляет связывание РНК-полимеразы и тем самым способствует синтезу РНК, т. е. минимальную последовательность, достаточную для управления транскрипцией. Промоторы и экспрессия соответствующих белков или полипептидов могут быть универсальными, что означает высокую активность в широком диапазоне клеток, тканей и видов или специфичность к типу клеток, специфичность к ткани или видоспецифичность. В некоторых вариантах осуществления специфичные для печени промоторы включают, помимо прочего, например, транстиретиновый промотор (ТТР); промотор тироксинсвязывающего глобулина (ТСГ); гибридный специфичный для печени промотор (НLP) и промотор альфа-1-антитрипсина (ААТ). Промоторы могут быть «конститутивными», то есть постоянно активными, или «индуцибельными», что означает,

что промоторы могут быть активированы или деактивированы в присутствии или отсутствии биотических или абиотических факторов. Также в конструкции нуклеиновых кислот или векторов по изобретению включены энхансерные последовательности, которые могут быть или не быть смежными с последовательностью промотора. Энхансерные последовательности влияют на промотор-зависимую экспрессию генов и могут быть расположены в 5'- или 3'-областях нативного гена.

[0113] *Оптимизация последовательности:* Используемый в данном документе термин «оптимизация последовательности» относится к процессу или серии процессов, посредством которых азотистые основания в эталонной последовательности нуклеиновой кислоты заменяются альтернативными азотистыми основаниями, что приводит к получению последовательности нуклеиновой кислоты с улучшенными свойствами, например, улучшенной экспрессией белка или повышенной активностью.

[0114] *Тропизм:* Используемые в данном документе термины «тропизм» или «тропность» в контексте AAV относятся к серотипу капсида AAV, имеющему различные профили трансдукции для разных типов тканей. В некоторых вариантах осуществления «системный тропизм» и «системная трансдукция» (и эквивалентные термины) указывают на то, что вирусный капсид или вирусный вектор по изобретению проявляет тропизм к или трансдуцирует, соответственно, более чем одну ткань или несколько тканей или органов по всему телу (например, более чем одну ткань головного мозга, легких, скелетных мышц, сердца, печени, почек и/или поджелудочной железы).

[0115] *Вектор:* Используемый в данном документе термин «вектор» способен переносить последовательности генов в целевые клетки. Как правило, «конструкция вектора», «вектор экспрессии» и «вектор для переноса гена» означают любую конструкцию нуклеиновой кислоты, способную управлять экспрессией представляющего интерес гена, которая может переносить последовательности генов в целевые клетки. Таким образом, этот термин включает клонирующие и экспрессионные носители, а также интегрирующиеся векторы. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вирус, который включает, например, инкапсулированные формы нуклеиновых кислот вектора и вирусные частицы, в которые упакованы нуклеиновые кислоты вектора. В некоторых вариантах осуществления вектор не является штаммом вируса дикого типа, поскольку он содержит мутации или модификации, созданные человеком. В некоторых вариантах осуществления вектор получен из вирусного штамма дикого типа путем генетических манипуляций (т.е. путем делеции) для включения условно реплицирующегося вируса, как дополнительно описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления вектор доставляют невирусными средствами. В некоторых

вариантах осуществления векторы, описанные в данном документе, представляют собой векторы для генной терапии, которые используют в качестве носителей для доставки полинуклеотидных последовательностей (например, фермента альфа-галактозидазы) в клетки. В конкретном варианте осуществления вектор для генной терапии, описанный в данном документе, представляет собой рекомбинантный вектор AAV (например, AAV8 или AAV9).

[0116] *Дикий тип.* Используемые в данном документе термины «дикий тип» и «встречающийся в природе» относятся к форме нуклеиновой кислоты или белка, встречающейся в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность дикого типа представляет собой последовательность, присутствующую в организме, которая может быть выделена из источника в природе и которая не была преднамеренно модифицирована человеческими манипуляциями.

[0117] Перечисление числовых диапазонов по конечным точкам в настоящем документе включает в себя все числа и дроби, входящие в этот диапазон (например, от 1 до 5 включает в себя 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,9, 4 и 5). Также следует понимать, что все числа и их дроби подразумеваются измененными при использовании термина «около».

[0118] Различные аспекты изобретения подробно описаны в следующих разделах. Использование разделов не ограничивает изобретение. Каждый раздел может относиться к любому аспекту изобретения. В данной заявке применение «или» означает «и/или», если не указано иное. В контексте настоящего документа формы единственного числа включают в себя ссылки на формы как единственного, так и множественного числа, если из контекста явно не следует иное.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0119] Болезнь Фабри представляет собой сцепленное с X-хромосомой наследственное заболевание, которое приводит к продукции aberrантной лизосомальной гидролазы, α -галактозидазы А (α -GAL), из-за мутаций в гене GLA. Поскольку α -GAL необходима для катаболизма гликолипидов, таких как сфинголипиды, недостаток или нарушение функции α -GAL вызывает накопление сфинголипидов в тканях. Болезнь Фабри поражает 1 из 40 000 мужчин, у которых мультисистемное заболевание развивается в детском или подростковом возрасте. Клинические проявления болезни Фабри включают, помимо прочего, жжение, пощипывание или покалывание, или онемение в конечностях, непереносимость тепла, поражения кожи, называемые ангиокератомами, помутнение роговицы, сердечные аритмии, гипертрофию левого желудочка, протеинурию, почечную недостаточность и нарушения мозгового кровообращения, такие как инсульт и/или

судороги. Гетерозиготные женщины по гену GLA могут передавать заболевание своим сыновьям и обычно не имеют симптомов. Однако у некоторых женщин развивается помутнение роговицы или более тяжелые проявления из-за неравномерной инактивации X-хромосомы.

[0120] Текущие варианты лечения болезни Фабри включают заместительную терапию рекомбинантными ферментами (ФЗТ). ФЗТ замедляют прогрессирование болезни Фабри, но полностью не останавливают или не обращают болезнь вспять. Современное лечение болезни Фабри преимущественно обеспечивает замедление прогрессирования болезни, ограниченное поражением почек и сердца, с недостаточным улучшением или отсутствием улучшения в других органах/тканях. Пациентам с Фабри также требуется непрерывная инфузия белка, что иногда приводит к инфузионным реакциям и повышенной иммуногенности. Такие требования к непрерывному контролю болезни также увеличивают «бремя лечения» или дополнительную и постоянную нагрузку (т. е. потребности и требования) для пациентов, чтобы они следовали рекомендациям своих врачей по контролю своей заболеваемостью и благополучием. У мужчин с тяжелой формой классической болезни Фабри ежегодная потеря почечной функции, несмотря на лечение, составляет до -6,82 мл/мин/1,73 м²/год (Germain et al, J Med Genet. 2015 May;52(5):353-8.2015), по сравнению со здоровыми субъектами, у которых ежегодная потеря почечной функции составляет -1 мл/мин/1,73 м²/год. Эти потребности могут быть удовлетворены векторной доставкой GLA, как описано в данном документе.

[0121] Одним из преимуществ подхода на основе генной терапии к лечению болезни Фабри является непрерывное воздействие α -GAL, а не прерывистое воздействие α -GAL, обеспечиваемое инфузией ФЗТ. Подход на основе генной терапией потенциально может обеспечить поглощение некоторыми тканями и типами клеток (например, кардиомиоцитами, периферическими нейронами и подоцитами почек), чего нелегко достичь с помощью инфузии ФЗТ. Постоянная доступность α -GAL в лизосомах может предотвратить повторное накопление гликофинголипидов между дозами. Значительное улучшение распределения ферментов в целевых клетках может обеспечить трансформирующую терапию с возможностью достижения превосходного клинического эффекта по сравнению с существующими способами лечения. Кроме того, генная терапия, сопровождаемая трансдукцией гепатоцитов, может использовать толерогенную природу печени и индуцировать системную иммунологическую толерантность к трансгенному продукту, устраняя риск снижения эффективности лечения из-за антител к лекарственным средствам. Не желая быть связанными теорией, считается, что эти преимущества в сочетании с однократной дозой длительного действия могут удовлетворить потребность в

лечении со значительно более высокой эффективностью лечения и снизить нагрузку на пациентов и лиц, осуществляющих уход.

[0122] В данном изобретении предложены, среди прочего, (1) собственная система экспрессии GLA в тканях, пораженных болезнью Фабри, (2) способы достижения устойчивой и высокой экспрессии α -GAL для снижения бремени болезни и бремени лечения, связанного с прогрессированием болезни Фабри, и (3) применение вектора, кодирующего GLA, для снижения фенотипов, связанных с болезнью Фабри.

[0123] В некоторых вариантах осуществления собственная система экспрессии GLA, предложенная в данном документе, содержит вирусный вектор, содержащий последовательность, кодирующую α -GAL, контролируемую универсальным промотором. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой универсальный промотор млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления считают, что универсальный промотор обеспечивает широкое распределение кодируемого α -GAL у млекопитающего. Современные подходы генной терапии к лечению болезни Фабри в основном основаны на использовании специфичных для печени промоторов, в отличие от средств доставки, описанных в данном документе. Системы генной терапии болезни Фабри, использующие специфичный для печени промотор, основаны на продукции α -GAL в печени и «перекрестной коррекции» других тканей. В данном описании предложена система собственной экспрессии α -GAL во многих целевых тканях, что приводит к более широкому воздействию α -GAL и лучшему лечению болезни Фабри и связанных с ней симптомов с использованием системы генной терапии с универсальным промотором. Как более подробно описано ниже, универсальный промотор, используемый в данном описании, может быть выбран из одного или нескольких промоторов EF-1 α , промоторов UBC, промоторов бета-глюкуронидазы LSE (GUSB), универсального промотора элемента открытия хроматина (UCOE), промотора GAPDH, промотора куриного β -актина (CBA), промотора PGK и мини-промотора EF1. В некоторых вариантах осуществления универсальный промотор можно сконструировать из одного из более известных универсальных промоторов.

[0124] В данном описании предложена система для более широкого воздействия α -GAL и более эффективного лечения болезни Фабри и связанных с ней симптомов с использованием системы генной терапии, в которой используется универсальный промотор. Как более подробно описано ниже, универсальный промотор, используемый в данном описании, может быть выбран из одного или нескольких промоторов EF-1 α , промоторов UBC, промоторов бета-глюкуронидазы LSE (GUSB), универсального промотора элемента открытия хроматина (UCOE), промотора GAPDH, промотора куриного

β -актина (CBA), промотора PGK и мини-промотора EF1. В некоторых вариантах осуществления универсальные промоторы могут быть сконструированы из одного из более известных универсальных промоторов.

[0125] В некоторых вариантах осуществления собственная система экспрессии GLA, предложенная в данном документе, содержит вирусный вектор, который может улучшать воздействие или распределение α -GAL в различных тканях млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления улучшенное воздействие или распределение α -GAL в различных тканях улучшает симптомы, связанные с болезнью Фабри. В некоторых вариантах осуществления использование вирусного вектора дополняет использование универсального промотора для обеспечения широкого тропизма GLA. Обычно предполагают, что более широкий тропизм GLA улучшит симптомы болезни Фабри. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор выбран из одного или нескольких из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 или AAV9, имеющих универсальный промотор. В некоторых вариантах осуществления соответствующий вирусный вектор с широким тропизмом может быть сконструирован с использованием комбинированных элементов AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 или AAV9, имеющих универсальный промотор.

[0126] В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор, охватываемый данным изобретением, содержит специфичный к ткани промотор, например, специфичный для печени промотор, расположенный выше последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид α -GAL.

[0127] В некоторых вариантах осуществления собственная система экспрессии GLA, предложенная в данном документе, содержит вирусный вектор, который может улучшать воздействие или распределение α -GAL в различных тканях млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления улучшенное воздействие или распределение α -GAL в различных тканях улучшает симптомы, связанные с болезнью Фабри. В некоторых вариантах осуществления использование вирусного вектора дополняет использование универсального промотора для обеспечения надежного распределения α -GAL в тканях. Обычно предполагают, что улучшенное биораспределение α -GAL улучшит симптомы болезни Фабри. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор выбран из одного или нескольких из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 или AAV9, имеющих универсальный промотор. В некоторых вариантах осуществления соответствующий вирусный вектор с широким тропизмом может быть сконструирован с использованием комбинированных элементов AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 или AAV9, имеющих универсальный промотор.

[0128] В некоторых вариантах осуществления собственная система экспрессии GLA, предложенная в данном документе, представляет собой вирусный вектор, экспрессирующий α -GAL дикого типа или его вариант (например, сконструированный вариант). В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложена система вирусного вектора, содержащая универсальный промотор для широкого распространения в тканях α -GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложена система вирусного вектора, содержащая универсальный промотор для широкого распространения в тканях а варианта α -GAL.

[0129] В некоторых вариантах осуществления трансген GLA кодирует фермент с улучшенной стабильностью α -GAL в сыворотке или ткани по сравнению с α -GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления трансген GLA кодирует фермент с более высокой активностью α -GAL по сравнению с ферментом дикого типа. В некоторых вариантах осуществления трансген GLA, описанный в данном документе, кодирует фермент α -GAL, содержащий одну или несколько аминокислотных модификаций в положениях с 1 по 100 α -GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления фермент α -GAL, кодируемый трансгеном GLA, содержит одну или несколько аминокислотных модификаций в положениях 101-200 α -GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления фермент α -GAL, кодируемый трансгеном GLA, содержит одну или несколько аминокислотных модификаций в положениях 201-300 α -GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления фермент α -GAL, кодируемый трансгеном GLA, содержит одну или несколько аминокислотных модификаций в положениях 301-400 α -GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления фермент α -GAL, кодируемый трансгеном GLA, содержит одну или несколько аминокислотных модификаций в положениях 401-429 α -GAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления модификация может представлять собой аминокислотную замену. В некоторых вариантах осуществления модификация может представлять собой аминокислотную делецию. В некоторых вариантах осуществления модификация может представлять собой аминокислотную вставку. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена может быть консервативной заменой. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена может быть неконсервативной заменой. В некоторых вариантах осуществления α -GAL, кодируемая трансгеном GLA, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 7-17, 33 или 34.

Векторы для генной терапии

[0130] Описанные в данном документе векторы содержат последовательность GLA. В некоторых вариантах осуществления последовательность GLA может быть встречающейся в природе последовательностью (дикого типа) (SEQ ID NO: 30). В некоторых вариантах осуществления последовательность GLA может представлять собой модифицированную последовательность, например, скодон-оптимизированную последовательность GLA или сконструированную или модифицированную последовательность GLA. Типичные последовательности GLA, предполагаемые для использования в векторах по данному изобретению, представлены в Таблице 1 ниже.

[0131] В некоторых вариантах осуществления α -GAL, кодируемый трансгеном GLA, содержит последовательность сигнального пептида MQLRNPELHLGCALALRFLALVSWDIPGARA (SEQ ID NO: 76). В некоторых вариантах осуществления α -GAL, кодируемая трансгеном GLA, содержит последовательность сигнального пептида на N-конце. В некоторых вариантах осуществления α -GAL, кодируемый трансгеном GLA, содержит последовательность сигнального пептида на C-конце. В некоторых вариантах осуществления α -GAL, кодируемая трансгеном GLA, содержит SEQ ID NO: 76 на N-конце. В некоторых вариантах осуществления α -GAL, кодируемая трансгеном GLA, содержит SEQ ID NO: 76 на N-конце.

[0132] В некоторых вариантах осуществления последовательность GLA содержит последовательность сигнального пептида atgcagctgaggaaccagaactacatctgggctgcgcgcttgcgcttcgcttctggccctcgttcctgggacatccctggggctagagca (SEQ ID NO: 77). В некоторых вариантах осуществления последовательность GLA содержит последовательность сигнального пептида на 5'-конце. В некоторых вариантах осуществления последовательность GLA содержит последовательность сигнального пептида на 3'-конце. В некоторых вариантах осуществления последовательность GLA содержит SEQ ID NO: 77 на 5'-конце. В некоторых вариантах осуществления последовательность GLA содержит SEQ ID NO: 77 на 3'-конце.

Таблица 1: Примеры аминокислотных последовательностей α -GAL и трансгенных нуклеотидных последовательностей GLA

Примеры аминокислотных последовательностей α-GLA и трансгенных нуклеотидных последовательностей GLA	
<i>Идентификатор</i>	<i>Последовательность</i>
<i>A</i>	LDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLDCQEEPDCISEKLFMEMAERMVSEGWKDAGY EYLCIDDCWMA PQRDSEGR LQADPQRFPHGIRQLANYVHSGKGLKLG IYADVGNKT CAGFPGSFGYYDIDAQT FADWGVDLLKFDGCYCDSLENLADGYKHMSLALNRTGR

	PIVYSCEWPLYMWPFOKPNYTEIROQCNHWRNFADIDDSWASIKSILDWTSRNQE RIVDVAGPGGWNDPMDLVIGNFGLSWDQQVTQMALWAIMAAPLFMSNDLRHISPO AKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRKGDNFVWERPLSGDAWAVAI INRQEIGG PRSYTIPVASLGKGVACNPACFITQLLPVKKRQLGFYEWTSRLKSHINPTGTVLLQ LENTMQMSLKDLL (SEQ ID NO: 7)
<i>B</i>	LDNGLARTPPMGWLHWERFMCNLDCQEEPDSICISEKLFEEMAERMVTEGWKDAGY EYLCIDDCWMAPQRDSEGRLOADPQRFPHGIRQLANHVHSHKGLKLG IYADVGNKT CAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGVDLLKFDGICYCDSLENLADGYKHMSLALNRTGR PIVYSCEWPLYMWPFOKPNYTEIROQCNHWRNFADIDDSWASIKSILDWTSRNQE RIVDVAGPGGWNDPMDLVIGNFGLSWDQQVTQMALWAIMAGPLFMSNDLRRAISPO AKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRKGDNFVWERPLSGDAWAVAI INRQEIGG PRSYTIPVASLGKGVACNPACFITQLLPVKKRKLGFYEATSRLRSHINPTGTVLLQ LENTMQTSLKDLL (SEQ ID NO: 8)
<i>C</i>	LDNGLARTPPMGWLHWERFMCNLDCQEEPDSICISEKLFEEMAERMVTEGWKDAGY EYLCIDDCWMAPQRDSEGRLOADPQRFPHGIRQLANHVHSHKGLKLG IYADVGNKT CAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGVDLLKFDGICYCDSLENLADGYKHMSLALNKTGR PIVYSCEWPLYMWPFOKPNYTEIROQCNHWRNFADIDDSWASIKSILDWTSRNQE RIVDVAGPGGWNDPMDLVIGNFGLSWDQQVTQMALWAIMAGPLFMSNDLRRAISPO AKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRKGDNFVWERPLSGDAWAVAI INRQEIGG PRSYTIPVASLGKGVACNPACFITQLLPVKKRKLGFYEATSRLRSHINPTGTVLLQ LENTMQTSLKDLL (SEQ ID NO: 9)
<i>D</i>	LDNGLARTPPMGWLHWERFMCNLDCQEEPDSICISEKLFEEMAERMVTDGWKDAGY EYLCIDDCWMAPQRDSEGRLOADPQRFPHGIRQLANHVHSHKGLKLG IYADVGNKT CAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGVDLLKFDGICYCDSLENLADGYKHMSLALNKTGR PIVYSCEWPLYMWPFOKPNYTEIROQCNHWRNFADIDDSWASIKSILDWTSRNQE RIVDVAGPGGWNDPMDLVIGNFGLSWDQQVTQMALWAIMAGPLFMSNDLRRAISPO AKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRKGDNFVWERPLSGDAWAVAI INRQEIGG PRGYTIPVAKLGKGVACNPACFITQLLPVKKRKLGFYEATSRLRSHINPTGTVLLQ LENTMQTSLKDLL (SEQ ID NO: 10)
<i>E</i>	LDNGLARTPPMGWLHWERFMCNLDCQEEPDSICISEKLFEEMAERMVTDGWKDAGY EYLCIDDCWMAPQRDSEGRLOADPQRFPHGIRQLANHVHSHKGLKLG IYADVGNKT CAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGVDLLKFDGICYCDSLENLADGYKHMSLALNKTGR PIVYSCEWPLYMWPFOKPNYTEIROQCNHWRNFADIDDSWASIKSILDWTSRNQE RIVDVAGPGGWNDPMDLVIGNFGLSWDQQVTQMALWAIMAGPLFMSNDLRRAISPO AKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRKGDNFVWERPLSGDAWAVAI INRQEIGG PRGYTIPVAKLGKGVACNPACFITQLLPVKKRKLGFYEATSRLRSHINPTGTVLLQ LENTMQTSLKDLL (SEQ ID NO: 11)
<i>F</i>	LDNGLARTPPMGWLHWERFMCNLDCQEEPDSICISEKLFEEMAERMVTDGWKDAGY EYLCIDDCWMAPQRDSEGRLOADPQRFPHGIRQLANHVHSHKGLKLG IYADVGNKT CAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGVDLLKFDGICYCDSLENLADGYKHMSLALNKTGR DIVYSCEWPLYMWPFOKPNYTEIROQCNHWRNFADIDDSWASIKSILDWTSRNQE RIVDVAGPGGWNDPMDLVIGNFGLSWDQQVTQMALWAIMAGPLFMSNDLRRAISPO AKALLQDQDVIAINQDPLGKQGYQLRKGDNFVWERPLSGDAWAVAI INRQEIGG PRGYTIPVAKLGKGVACNPACFITQLLPVKKRKLGFYEATSRLRSHINPTGTVLLQ LENTMQTSLKDLL (SEQ ID NO: 46)
<i>002</i>	LDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLDCQEEPDSICISEKLFMEMAELMVSEGWKDAGY EYLCIDDCWMAPQRDSEGRLOADPQRFPHGIRQLANYVHSHKGLKLG IYADVGNKT CAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGVDLLKFDGICYCDSLENLADGYKHMSLALNRTGR SIVYSCEWPLYMWPFOKPNYTEIROQCNHWRNFADIDDSWASIKSILDWTSFNQE RIVDVAGPGGWNDPMDLVIGNFGLSWDQQVTQMALWAIMAAPLFMSNDLRHISPO AKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRQGDNFVWERPLSGLAWAVAVINRQEIGG

	PRSYTIAVASLGGGVACNPACFITQLLPVKRKLGLYEWTSRLKSHINPTGTVLLQ LENTMQMSLKDLL (SEQ ID NO: 12)
003	LDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLDCQEEPDSICISEKLFMEMAELMVSEGWKDAGY EYLCIDDCWMAPQRDSEGRLOADPQRFPHGIRQLANYVHSHKGLKLG IYADVGNKT CAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGVDLLKFDGICYCDSLENLADGYKHMSLALNRTGR SIVYSCEWPLYMWPFOKPNYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWKS IKSILDWTSFNQE RIVDVAGPGGWNDPMLVIGNFGLSWNQOVTQMALWA IMAAPLFMSNDRHISPQ AKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRKGDNFVWERPLSGDAWAVAMINRQIEGG PRSYTIPVASLGKGVACNPACFITQLLPVKRKLGFYEWTSRLRSHINPTGTVLLQ LENTMQMSLKDLL (SEQ ID NO: 13)
004	LDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLDCQEEPDSICISEKLFMEMAERMVSEGWKDAGY EYLCIDDCWMAPQRDSEGRLOADPQRFPHGIRQLANYVHSHKGLKLG IYADVGNKT CAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGVDLLKFDGICYCDSLENLADGYKHMSLALNRTGR SIVYSCEWPLYMWPFOKPNYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWAS IKSILDWTSRNQE RIVDVAGPGGWNDPMLVIGNFGLSWDQOVTQMASWA IMAAPLFMSNDRHISPQ AKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRKGDNFVWERPLSGDAWAVAI INRQIEGG PRSYTIPVASLGKGVACNPACFITQLLPVKRQLGFYNWTSRLKSHINPTGTVLLQ LENTMQMSLKDLL (SEQ ID NO: 14)
005	LDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLDCQEEPDSICISEKLFEMAERMVTDGWKDAGY EYLCIDDCWMAPQRDSEGRLOADPQRFPHGIRQLANHVHSHKGLKLG IYADVGNKT CAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGVDLLKFDGICYCDSLENLADGYKHMSLALNRTGR SIVYSCEWPLYMWPFOKPNYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWKS IKSILDWTSRNQE RIVDVAGPGGWNDPMLVIGNFGLSWNQOVTQMALWA IMAAPLFMSNDRHISPQ AKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRKGDNFVWERPLSGDAWAVAI INRQIEGG PRSYTIPVASLGKGVACNPACFITQLLPVKRKLGFYEWTSRLRSHINPTGTVLLQ LENTMQMSLKDLL (SEQ ID NO: 15)
006	LDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLDCQEEPDSICISEKLFEMAELMVSEGWKDAGY EYLCIDDCWMAPQRDSEGRLOADPQRFPHGIRQLANHVHSHKGLKLG IYADVGNKT CAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGVDLLKFDGICYCDSLENLADGYKHMSLALNRTGR SIVYSCEWPLYMWPFOKPNYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWKS IKSILDWTSFNQE RIVDVAGPGGWNDPMLVIGNFGLSWNQOVTQMALWA IMAAPLFMSNDRHISPQ AKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRQGDNFVWERPLSGDAWAVAMINRQIEGG PRSYTIPVASLGKGVACNPACFITQLLPVKRKLGFYEWTSRLRSHINPTGTVLLQ LENTMQMSLKDLL (SEQ ID NO: 16)
007	LDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLDCQEEPDSICISEKLFEMAERMVTDGWKDAGY EYLCIDDCWMAPQRDSEGRLOADPQRFPHGIRQLANHVHSHKGLKLG IYADVGNKT CAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGVDLLKFDGICYCDSLENLADGYKHMSLALNRTGR SIVYSCEWPLYMWPFOKPNYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWKS IKSILDWTSRNQE RIVDVAGPGGWNDPMLVIGNFGLSWDQOVTQMALWA IMAAPLFMSNDRHISPQ AKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRKGDNFVWERPLSGDAWAVAI INRQIEGG PRSYTIPVASLGKGVACNPACFITQLLPVKRKLGFYEATSRLKSHINPTGTVLLQ LENTMQMSLKDLL (SEQ ID NO: 17)
008	LDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLDCQEEPDSICISEKLFEMAERMVTDGWKDAGY EYLCIDDCWMAPQRDSEGRLOADPQRFPHGIRQLANHVHSHKGLKLG IYADVGNKT CAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGVDLLKFDGICYCDSLENLADGYKHMSLALNRTGR SIVYSCEWPLYMWPFOKPNYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWAS IKSILDWTSRNQE RIVDVAGPGGWNDPMLVIGNFGLSWDQOVTQMALWA IMAAPLFMSNDRHISPQ AKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRKGDNFVWERPLSGDAWAVAI INRQIEGG PRSYTIPVASLGKGVACNPACFITQLLPVKRQLGFYNWTSRLKSHINPTGTVLLQ LENTMQMSLKDLL (SEQ ID NO: 33)
009	LDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLDCQEEPDSICISEKLFEMAERMVTDGWKDAGY EYLCIDDCWMAPQRDSEGRLOADPQRFPHGIRQLANHVHSHKGLKLG IYADVGNKT

	CAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGVDLLKFDGICYCDSLENLADGYKHMSLALNKTGRPIVYSCEWPLYMWPFOKPNYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWASIKSILDWTSRNQERIVDVAGPGGWNDPMLVIGNFGLSWDQOVTQMALWAIMAAPLFMSNDRHISPQAKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRKGDNFEVWERPLSGDAWAVAIINRQIEGGPRSYTIPVASLGKGVACNPACFITQLLPVKRQLGFYNWTSRLKSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL (SEQ ID NO: 34)
<i>ДТ</i>	LDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLDCQEEPDSCISEKLFMEMAELMVSEGWKDAGYEYLCIDDCWMAPQRDSEGRLOADPQRFPHGIRQLANYVHSGKGLKLGİYADVGNKTCAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGVDLLKFDGICYCDSLENLADGYKHMSLALNRTGRSIVYSCEWPLYMWPFOKPNYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWKSIKSILDWTSFNQERIVDVAGPGGWNDPMLVIGNFGLSWNQOVTQMALWAIMAAPLFMSNDRHISPQAKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRQGDNFEVWERPLSGDAWAVAMINRQIEGGPRSYTIAVASLGKGVACNPACFITQLLPVKRKLGFYEWTSRLRSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL (SEQ ID NO: 30)
<i>Пример аминокислоты α-GLA с сигнальным пептидом</i>	
<i>A</i>	MQLRNPELHLGCALALRFLALVSWDIPGARALDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLDCQEEPDSCISEKLFMEMAERMVSEGWKDAGYEYLCIDDCWMAPQRDSEGRLOADPQRFPHGIRQLANYVHSGKGLKLGİYADVGNKTCAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGVDLLKFDGICYCDSLENLADGYKHMSLALNRTGRPIVYSCEWPLYMWPFOKPNYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWASIKSILDWTSRNQERIVDVAGPGGWNDPMLVIGNFGLSWDQOVTQMALWAIMAAPLFMSNDRHISPQAKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRKGDNFEVWERPLSGDAWAVAIINRQIEGGPRSYTIPVASLGKGVACNPACFITQLLPVKRQLGFYEWTSRLKSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL (SEQ ID NO: 47)
<i>B</i>	MQLRNPELHLGCALALRFLALVSWDIPGARALDNGLARTPPMGWLHWERFMCNLDCQEEPDSCISEKLFEEMAERMVTEGWKDAGYEYLCIDDCWMAPQRDSEGRLOADPQRFPHGIRQLANHVHSGKGLKLGİYADVGNKTCAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGVDLLKFDGICYCDSLENLADGYKHMSLALNRTGRPIVYSCEWPLYMWPFOKPNYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWASIKSILDWTSRNQERIVDVAGPGGWNDPMLVIGNFGLSWDQOVTQMALWAIMAGPLFMSNDLRRAISPQAKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRKGDNFEVWERPLSGDAWAVAIINRQIEGGPRSYTIPVASLGKGVACNPACFITQLLPVKRKLGFYEATSRLRSHINPTGTVLLQLENTMQTSLKDLL (SEQ ID NO: 48)
<i>C</i>	MQLRNPELHLGCALALRFLALVSWDIPGARALDNGLARTPPMGWLHWERFMCNLDCQEEPDSCISEKLFEEMAERMVTEGWKDAGYEYLCIDDCWMAPQRDSEGRLOADPQRFPHGIRQLANHVHSGKGLKLGİYADVGNKTCAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGVDLLKFDGICYCDSLENLADGYKHMSLALNKTGRPIVYSCEWPLYMWPFOKPNYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWASIKSILDWTSRNQERIVDVAGPGGWNDPMLVIGNFGLSWDQOVTQMALWAIMAGPLFMSNDLRRAISPQAKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRKGDNFEVWERPLSGDAWAVAIINRQIEGGPRSYTIPVASLGKGVACNPACFITQLLPVKRKLGFYEATSRLRSHINPTGTVLLQLENTMQTSLKDLL (SEQ ID NO: 49)
<i>D</i>	MQLRNPELHLGCALALRFLALVSWDIPGARALDNGLARTPPMGWLHWERFMCNLDCQEEPDSCISEKLFEEMAERMVTDGWKDAGYEYLCIDDCWMAPQRDSEGRLOADPQRFPHGIRQLANHVHSGKGLKLGİYADVGNKTCAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGVDLLKFDGICYCDSLENLADGYKHMSLALNKTGRPIVYSCEWPLYMWPFOKPNYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWASIKSILDWTSRNQERIVDVAGPGGWNDPMLVIGNFGLSWDQOVTQMALWAIMAGPLFMSNDLRRAISPQAKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRKGDNFEVWERPLSGDAWAVAIINRQIEGGPRGYTIPVASLGKGVACNPACFITQLLPVKRKLGFYEATSRLRSHINPTGTVLLQLENTMQTSLKDLL (SEQ ID NO: 50)

<i>E</i>	MQLRNPELHLGCALALRFLALVSWDIPGARALDNGLARTPPMGWLHWERFMCNLD CQEEPDSCISEKLFEEAERMVTDGWKDAGYEYLCIDDCWMAPQRDSEGRLQADP QRFPHGIRQLANHVHSGKGLKLG IYADVGNKTCAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGD LLKFDGCYCDLENLADGYKHMSLALNKTGRPIVYSCEWPLYMWPFOKPNYTEIR QYCNHWRNFADIDDSWASIKSILDWTSRNQERIVDVAGPGGWNDPDMLVIGNFGL SWDQQVTQMALWAIMAGPLFMSNDLRRAISPOAKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQ LRKGDNFEVWERPLSGDAWAVAIINRQEI GGPRGYTIPVAKLGKGVACNPACFIT QLLPVKKRKLGFYEATSRLRSHINPTGTVLLQLENTMQTSLKDLL (SEQ ID NO: 51)
<i>F</i>	MQLRNPELHLGCALALRFLALVSWDIPGARALDNGLARTPPMGWLHWERFMCNLD CQEEPDSCISEKLFEEAERMVTDGWKDAGYEYLCIDDCWMAPQRDSEGRLQADP QRFPHGIRQLANHVHSGKGLKLG IYADVGNKTCAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGD LLKFDGCYCDLENLADGYKHMSLALNKTGRDIVYSCEWPLYMWPFOKPNYTEIR QYCNHWRNFADIDDSWASIKSILDWTSRNQERIVDVAGPGGWNDPDMLVIGNFGL SWDQQVTQMALWAIMAGPLFMSNDLRRAISPOAKALLQDQDVIAINQDPLGKQGYQ LRKGDNFEVWERPLSGDAWAVAIINRQEI GGPRGYTIPVAKLGKGVACNPACFIT QLLPVKKRKLGFYEATSRLRSHINPTGTVLLQLENTMQTSLKDLL (SEQ ID NO: 52)
<i>002</i>	MQLRNPELHLGCALALRFLALVSWDIPGARALDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLD CQEEPDSCISEKLFMEMAELMVSEGWKDAGYEYLCIDDCWMAPQRDSEGRLQADP QRFPHGIRQLANYVHSGKGLKLG IYADVGNKTCAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGD LLKFDGCYCDLENLADGYKHMSLALNRTGRSIVYSCEWPLYMWPFOKPNYTEIR QYCNHWRNFADIDDSWASIKSILDWTSFNQERIVDVAGPGGWNDPDMLVIGNFGL SWDQQVTQMALWAIMAAPL FMSNDLRHISPOAKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQ LRQGDNFEVWERPLSGLAWAVAVINRQEI GGPRSYTIAVASLGKGVACNPACFIT QLLPVKKRKLGLYEWTSRLKSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL (SEQ ID NO: 53)
<i>003</i>	MQLRNPELHLGCALALRFLALVSWDIPGARALDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLD CQEEPDSCISEKLFMEMAELMVSEGWKDAGYEYLCIDDCWMAPQRDSEGRLQADP QRFPHGIRQLANYVHSGKGLKLG IYADVGNKTCAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGD LLKFDGCYCDLENLADGYKHMSLALNRTGRSIVYSCEWPLYMWPFOKPNYTEIR QYCNHWRNFADIDDSWKS IK SILDWTSFNQERIVDVAGPGGWNDPDMLVIGNFGL SWNQQVTQMALWAIMAAPL FMSNDLRHISPOAKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQ LRKGDNFEVWERPLSGDAWAVAMINRQEI GGPRSYTIPVASLGKGVACNPACFIT QLLPVKKRKLGFYEWTSRLRSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL (SEQ ID NO: 54)
<i>004</i>	MQLRNPELHLGCALALRFLALVSWDIPGARALDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLD CQEEPDSCISEKLFMEMAERMVSEGWKDAGYEYLCIDDCWMAPQRDSEGRLQADP QRFPHGIRQLANYVHSGKGLKLG IYADVGNKTCAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGD LLKFDGCYCDLENLADGYKHMSLALNRTGRSIVYSCEWPLYMWPFOKPNYTEIR QYCNHWRNFADIDDSWASIKSILDWTSRNQERIVDVAGPGGWNDPDMLVIGNFGL SWDQQVTQMASWAIMAAPL FMSNDLRHISPOAKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQ LRKGDNFEVWERPLSGDAWAVAIINRQEI GGPRSYTIPVASLGKGVACNPACFIT QLLPVKKRQLGFYNWTSRLKSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL (SEQ ID NO: 55)
<i>005</i>	MQLRNPELHLGCALALRFLALVSWDIPGARALDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLD CQEEPDSCISEKLFEEAERMVTDGWKDAGYEYLCIDDCWMAPQRDSEGRLQADP QRFPHGIRQLANHVHSGKGLKLG IYADVGNKTCAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGD LLKFDGCYCDLENLADGYKHMSLALNRTGRSIVYSCEWPLYMWPFOKPNYTEIR QYCNHWRNFADIDDSWKS IK SILDWTSRNQERIVDVAGPGGWNDPDMLVIGNFGL SWNQQVTQMALWAIMAAPL FMSNDLRHISPOAKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQ LRKGDNFEVWERPLSGDAWAVAIINRQEI GGPRSYTIPVASLGKGVACNPACFIT

	QLLPVKRKLGFYEWT SRLRSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL (SEQ ID NO: 56)
006	MQLRNPELHLGCALALRFLALVSWDIPGARALDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLD CQEE PDSCI SEKLFEEMAELMVSEGWKDAGYEYLCIDDCWMAPQRDSEGRLQADP QRFPHGIRQLANHVHSGKGLKLG IYADVGNKTCAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGD LLKFDGCYCDLENLADGYKHMSLALNRTGRSIVYSCEWPLYMWP FQKPNYTEIR QYCNHWRNFADIDDSWKS IKS I LDWTS FNQERIVDVAGPGGWNDPMLVIGNFGL SWNQOVTQMALWAIMAAPLFMSNDRHISPOAKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQ LRQGDNFEVWERPLSGDAWAVAMINRQEIGGPRSYTIPVASLGKGVACNPACFIT QLLPVKRKLGFYEWT SRLRSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL (SEQ ID NO: 57)
007	MQLRNPELHLGCALALRFLALVSWDIPGARALDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLD CQEE PDSCI SEKLFEEMAERMVTDGWK DAGYEYLCIDDCWMAPQRDSEGRLQADP QRFPHGIRQLANHVHSGKGLKLG IYADVGNKTCAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGD LLKFDGCYCDLENLADGYKHMSLALNRTGRSIVYSCEWPLYMWP FQKPNYTEIR QYCNHWRNFADIDDSWKS IKS I LDWTS RNQERIVDVAGPGGWNDPMLVIGNFGL SWDQOVTQMALWAIMAAPLFMSNDRHISPOAKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQ LRKGDNFEVWERPLSGDAWAVAI INRQEIGGPRSYTIPVASLGKGVACNPACFIT QLLPVKRKLGFYEATSRLKSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL (SEQ ID NO: 58)
008	MQLRNPELHLGCALALRFLALVSWDIPGARALDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLD CQEE PDSCI SEKLFEEMAERMVTDGWK DAGYEYLCIDDCWMAPQRDSEGRLQADP QRFPHGIRQLANHVHSGKGLKLG IYADVGNKTCAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGD LLKFDGCYCDLENLADGYKHMSLALNRTGRSIVYSCEWPLYMWP FQKPNYTEIR QYCNHWRNFADIDDSWAS IKS I LDWTS RNQERIVDVAGPGGWNDPMLVIGNFGL SWDQOVTQMALWAIMAAPLFMSNDRHISPOAKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQ LRKGDNFEVWERPLSGDAWAVAI INRQEIGGPRSYTIPVASLGKGVACNPACFIT QLLPVKRQLGFYNWTSRLKSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL (SEQ ID NO: 59)
009	MQLRNPELHLGCALALRFLALVSWDIPGARALDNGLARTPPMGWLHWERFMCNLD CQEE PDSCI SEKLFEEMAERMVTDGWK DAGYEYLCIDDCWMAPQRDSEGRLQADP QRFPHGIRQLANHVHSGKGLKLG IYADVGNKTCAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGD LLKFDGCYCDLENLADGYKHMSLALNKTGRPIVYSCEWPLYMWP FQKPNYTEIR QYCNHWRNFADIDDSWAS IKS I LDWTS RNQERIVDVAGPGGWNDPMLVIGNFGL SWDQOVTQMALWAIMAAPLFMSNDRHISPOAKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQ LRKGDNFEVWERPLSGDAWAVAI INRQEIGGPRSYTIPVASLGKGVACNPACFIT QLLPVKRQLGFYNWTSRLKSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL (SEQ ID NO: 60)
<i>ДТ с сигнальн ым пептидо м</i>	MQLRNPELHLGCALALRFLALVSWDIPGARALDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLD CQEE PDSCI SEKLFEEMAELMVSEGWKDAGYEYLCIDDCWMAPQRDSEGRLQADP QRFPHGIRQLANYVHSGKGLKLG IYADVGNKTCAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGD LLKFDGCYCDLENLADGYKHMSLALNRTGRSIVYSCEWPLYMWP FQKPNYTEIR QYCNHWRNFADIDDSWKS IKS I LDWTS FNQERIVDVAGPGGWNDPMLVIGNFGL SWNQOVTQMALWAIMAAPLFMSNDRHISPOAKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQ LRQGDNFEVWERPLSGLAWAVAMINRQEIGGPRSYTIAVASLGKGVACNPACFIT QLLPVKRKLGFYEWT SRLRSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL (SEQ ID NO: 75)
<i>Последовательности нуклеиновых кислот</i>	
<i>Нуклеин овая кислота,</i>	ctggataatggattggctagaacacactactatgggggtggcttactgggagaggt tcatgtgcaacctcgactgtcaggaagaaccagacagctgcatctccgagaagct gtttatggaaatggccgagcgaatggtgtcagaaggctggaaagatgcaggttac gagtatctgtgtattgacgattgctggatggctccgcaacgggacagtgagggca

<p><i>кодирующую А</i></p>	<p>gacttcaggcagatcctcagcgcttcccacatgggataaggcagctcgccaacta cgtccactctaagggactgaaactgggcatctatgctgacgtggggaataagacc tgtgccgggatttcccggtagcttcggctactacgacattgatgccagaccttg ccgattggggagttgacctcctcaaattcgaaggctgctattgtgactctttgga gaacctggcagacgggtacaagcataatgtccctggccctgaatcggacaggtaga cccacgtgtatagttgcaatggccccctttacatgtggccttttcaaaagccaa actacactgagattcgccagatttgcaatcactggaggaacttcgctgatatcga tgactcatgggagcagatcaaattccatattggattggacctctcggaatcaggag cgcattgtagacgtcgcaggaccggcggtggaacgacctgatatgctgggtga tcgggaattttggtcttagctgggaccagcaagttacgcagatggctctgtgggc aattatggcagccccactcttcatgtccaacgatctgcgacacatctctcctcaa gctaaggctctgctgcaggacaaagatgtgattgccatcaatcaggacctctcg gaaagcagggtatcagctgagaaaaggcgacaacttcgaagtctgggaaaggcc actttcaggagacgcatgggctgtggccataataaacggcaagagattggtggg cccaggagctacacaatccccgttgccagtttgggcaaggagtggtggtgtaatc ctgctgctttatcactcagctgctcccagtcaaagacagctgggggttctatga gtggacctcccgcctcaagagccataattaatcccacaggtaccgtactgctgcaa cttgaaaacacgatgcagatgagtttgaaggacctcctgtag (SEQ ID NO: 18)</p>
<p><i>Нуклеиновая кислота, кодирующую В</i></p>	<p>ctggataatggattggctagaacacctcctatgggggtggcttactgggagaggt tcatgtgcaacctggactgtcaggaagaaccagacagctgcatctccgagaagct ctttgaggaaatggccgaacgaatggtgactgagggctggaaagatgcagggttac gagtatctgtgtattgacgattgctggatggccccacaacgggattctgagggaa gacttcaggctgatccgcagcgcttccctcatggcataaggcagctggcaaacca cgtccacagtaaggggctcaaattgggaaatctacgcggacgtgggcaataagacc tgtgcccggttttccgggatcattcgggtattatgacattgacgccccaaacgtttg ctgattggggcggttgacctgctgaaattcgaatggttgctactgtgacagcctcga aaacctggcagacggctacaagcataatgtctctcgccctgaatagaaccggctcg ccaatcgtatattcctgcgagtggcctctttacatgtggccatttcagaaaccga actacacagaaattcgccagatttgcaatcattggaggaacttcgctgatatcga tgactcatgggctccataaagagcatcttggactggaccagtcggaatcaggag cgaattgtggatgtcgcaggccctggaggatggaacgatccagacatgctgggtga tcggcaattttggcctctcttgggaccagcaggttacccaaattggctctgtgggc aattatggccggctcctcttttcatgagcaacgatctgcgcgcatctcaccacag gcaaaggccctgctccaagacaaagatgtgtagccatcaatcaggacctggttg gaaagcagggtaccagctgagaaaaggcgacaactttgaggctctgggaaaggcc tttgagtggagatgctggtggctgtggccattattaatcggcaagagatcggaggt ccacgctcctatacaattcctgtagcatctcttggcaaggcggttgctgtaacc cagcttgcctcatcactcagcttctgcccgggtgaagagaaaactgggttctacga agctaccagcaggctccgatcccacatcaacctacaggaaccgtcctcttgtag ctggagaatacgatgcagacttactgaaggacctcctgtag (SEQ ID NO: 19)</p>
<p><i>Нуклеиновая кислота, кодирующую С</i></p>	<p>ctggataatggattggctagaacacctcctatgggggtggcttactgggagaggt tcatgtgcaacctggactgtcaggaagaaccagacagctgcatctccgagaagct ctttgaggaaatggccgaacgaatggtgactgagggctggaaagatgcagggttac gagtatctgtgtattgacgattgctggatggccccacaacgggattctgagggaa gacttcaggctgatccgcagcgcttccctcatggcataaggcagctggcaaacca cgtccacagtaaggggctcaaattgggaaatctacgcggacgtgggcaataagacc tgtgcccggttttccgggatcattcgggtattatgacattgacgccccaaacgtttg ctgattggggcggttgacctgctgaaattcgaatggttgctactgtgacagcctcga aaacctggcagacggctacaagcataatgtctctcgccctgaataaaaccggctcg ccaatcgtatattcctgcgagtggcctctttacatgtggccatttcagaaaccga actacacagaaattcgccagatttgcaatcattggaggaacttcgctgatatcga tgactcatgggctccataaagagcatcttggactggaccagtcggaatcaggag cgaattgtggatgtcgcaggccctggaggatggaacgatccagacatgctgggtga</p>

	<p>tggcaat tttggcctctcttgggaccagcaggttacccaaatggctctgtgggc aattatggccggctcctcttttcatgagcaacgatctgcgcgcatctcaccacag gcaaaggccctgctccaagacaaagatgtgatagccatcaatcaggaccggttg gaaagcagggctaccagctgagaaaaggcgacaactttgaggctctgggaaaggcc tttgagtggagatgcggtgggctgtggccattattaatcggcaagagatcggaggt ccacgctcctatacaattcctgtagcatctcttggcaagggcggttgctgtaacc cagcttgcttcatcactcagcttctgcccgggtgaagagaaaactgggtttctacga agctaccagcaggctccgatcccacatcaaccctacaggaaccgctcctcttgca ctggagaatacgatgcagacttctgaaggacctcctgtag (SEQ ID NO: 20)</p>
<p><i>Нуклеин овая кислота, кодирую щая D</i></p>	<p>ctggataatggattggctagaacacctcctatgggggtggcttcaactgggagaggt tcatgtgcaacctggactgtcaggaagaaccagacagctgcatctccgagaagct ctttgaggaaatggccgaacgaatggtgactgacggctggaaagatgcaggttac gagtatctgtgtattgacgattgctggatggccccacaacgggattctgaggaa gacttcaggctgatccgcagcgttccctcatggcataaggcagctggcaaacca cgtccacagtaaggggctcaaattgggaatctacgcggacgtgggcaataagacc tgtgccggttttccgggatcattcgggtattatgacattgacgcccaaacgtttg ctgattggggcggttgacctgctgaaattcgatggttgctactgtgacagcctcga aaacctggcagacggctacaagcатаatgtctctcgccctgaataaaaccggtcgg ccaatcgтаatctctgcgagtggcctctttacatgtggccatttcagaaaccga actacacagaaaattcgccagatattgcaatcattggaggaacttcgctgatatcga tgactcatgggctccатаaagagcatcttggactggaccagctcggaatcaggag cgaattgtggatgtcgcaggccctggaggatggaacgatccagacatgctgggtga tcggcaat tttggcctctcttgggaccagcaggttacccaaatggctctgtgggc aattatggccggctcctcttttcatgagcaacgatctgcgcgcatctcaccacag gcaaaggccctgctccaagacaaagatgtgatagccatcaatcaggaccggttg gaaagcagggctaccagctgagaaaaggcgacaactttgaggctctgggaaaggcc tttgagtggagatgcggtgggctgtggccattattaatcggcaagagatcggaggt ccacgcggttatacaattcctgtagcatctcttggcaagggcggttgctgtaacc cagcttgcttcatcactcagcttctgcccgggtgaagagaaaactgggtttctacga agctaccagcaggctccgatcccacatcaaccctacaggaaccgctcctcttgca ctggagaatacgatgcagacttctgaaggacctcctgtag (SEQ ID NO: 21)</p>
<p><i>Кодон- оптимиз ированна я нуклеино вая кислота, кодирую щая D</i></p> <p>(D1)</p>	<p>atgcagctgaggaaccagaactacatctgggctgcgcgcttgcgcttcgcttcc tggccctcgtttctgggacatccctggggctagagcactggataatggactggc cagaactcctcccatgggctggctgactgggaaaggtttatgtgтаатctggac tgtcaagaggagccagattcctgcatctctgagaagctctttgaagagatggctg agaggatggtgacagatggttggaggatgctggttatgagtacctgtgcattga tgactgctggatggccccagagagattcagaaggcagactgcaagcagaccct cagagggtcccccatggcatccgccagcttgccaaccatgtccactccaagggcc tgaactgggtatctatgctgatgtgggcaataagacctgtgctggctttcctgg ctcctttggctactatgacattgacgccagacctttgctgactgggggtgtggac ttgctgaagtttgatggctgctactgtgactccctggagaacctggcagatggat acaagcacatgtctctggctctgaacaagactggcagaccattgtttacagctg tgagtggccactgtacatgtggcccttcagaagcccaactacactgagatcaga cagactgcaatcattggaggaactttgccgacatcgatgattcttgggcctcca tcaagagcatcctggactggacatccagaaccaagaagaattgtggatgtggc tgaccctggaggatggaatgatcctgacatgctgggtgattggaaat tttgggctg tcctgggaccagcaagtgactcagatggccctctgggcatcatggctgggcccc tcttcatgagcaatgacctgaggccatttcccccaagccaaggccctgcttca agacaaaagatgtcattgctatcaatcaagatccctggggaagcaaggctaccag ctcagaaaaggagacaacttcgagggtgtgggagagacctctgtctggagatgcct gggctgtggccatcatcaacagacaagagattggtggccccagaggttacacat ccctgttgcttctcttggcaaggggtgttgctgcaaccagcttgcttcatcacc cagctgctcccagtgaaagaggaagctgggcttctatgaagctacctctaggttga</p>

	gatccacatcaaccccactgggtactgtgctgctgcagctggaaaacacccatgca gacttccctcaaggacctcctgtga (SEQ ID NO: 35)
<i>Кодон- оптимиз ированна я нуклеино вая кислота, кодирую щая D</i> (D2)	atgcagctgaggaacccagaactacatctgggctgcgcgcttgcgcttcgcttcc tggccctcgtttcctgggacatccctggggctagagcactggataatggacttgc aagaactcctcccatgggctggctgcactgggagaggtttatgtgtaatctggac tgtcaagaagaaccagattcctgcatctctgagaagctctttgaggagatggctg agaggatggtgacagatggatggaaggatgctggttatgaatatctgtgcattga tgactgctggatggccctcagagagacagtgaaggccgctgcaagcagacccc cagagggtcccccattggaatcagacagttggccaacctgtccactccaagggcc tgaactgggcatctatgctgatgtgggcaataagacctgtgctggcttccctgg ctcctttgggactatgacattgacgccagacttttgctgactgggggtgtggac ttgctgaagtttgatggctgctactgtgactccctggaaaacctggcagatggtt acaagcacatgtctctggccctgaacaagactggcagacccattgtttacagctg tgagtggccactgtacatgtggcccttcagaagcccaactacactgagatccgc cagactgcaatcattggaggaactttgcagacatcgatgattcttgggcccagca tcaagtccatcctggactggacttccagaaaccaagagagaattgtggatgttgc tggacctggaggttggatgatcctgacatgctgggtgattggaaattttggactg tcctgggaccagcaagtgactcagatggccctctgggcatcatggctgggcccc tcttcatgagcaatgacctgagggccatttcccccaagccaaggctctgcttca agacaaagatgtcattgctatcaatcaagatccctggggaagcaaggctaccag ctcagaaaaggagacaacttcgaggtgtgggaaagacctctgtctggagatgcct gggctgtggctatcatcaacagacaagaaattgggtggccccagaggctacacat ccctgtggcctctcttggcaaggggtgttgctgcaaccagcttgcctcatcacc cagctgctcccagtgaaagaggaagctgggtttctatgaggctacctctaggttga gatccacatcaatccactgggtacagtgctgctgcagctgggaaaacacccatgca gacctccctcaaggacctcctttaa (SEQ ID NO: 36)
<i>Кодон- оптимиз ированна я нуклеино вая кислота, кодирую щая D</i> (D3)	atgcagctgaggaacccagaactacatctgggctgcgcgcttgcgcttcgcttcc tggccctcgtttcctgggacatccctggggctagagcattggacaatggactggc aagaactcctcccatgggctggctgcactgggaaaggtttatgtgtaatctggac tgtcaagaggagccagattcctgcatctctgagaagctctttgaagagatggctg agaggatggtgacagatggatggaaggatgctggatagagtacctgtgcattga tgactgctggatggccctcagagagacagtgaaggcagactgcaagcagacccc cagagggtcccccattggcattaggcagctggccaacctgtccactccaagggcc tgaactgggcatctatgctgatgtgggcaataagacctgtgctgggttccctgg ctcctttggatactatgacattgatgccagacctttgctgactgggggtgtggac ctgctcaagtttgatggctgctactgtgactccctgggagaacctggctgatggtt acaagcacatgtctcttggctctgaacaagactggtagaccattgtttacagctg tgagtggccactgtacatgtggcccttcagaagcccaactacactgagatcaga cagactgcaatcattggaggaattttgcagatattgatgattcttgggcccaca tcaagagcatcctggactggacttccagaaaccaagaaagaattgtggatgttgc tggccctggaggttggatgaccctgacatgctgggtgattggcaactttgggctg tcctgggaccagcaagtgactcagatggccctctgggcatcatggctgggcccc tcttcatgtccaatgatctgagggccatttcccccaagccaaggccctgcttca agacaaagatgtcattgctatcaatcaagatccctgggcaagcaaggctaccag ctcagaaaaggagacaactttgaggtgtgggagagacctctgtctggagatgcct gggctgtggccatcatcaacagacaagagattgggtggccccagaggctacacat ccctgtggcttccctggggaaggggtgttgctgcaaccagcttgcctcatcacc cagcttctgccagtgaaagaggaagctgggttctatgaagctaccagcagactga gatccacatcaaccccactggcacagtgctgctgcagctgggaaaacacccatgca gacttctctgaaggacctcctgtga (SEQ ID NO: 37)
<i>Кодон- оптимиз ированна</i>	atgcagctgaggaacccagaactacatctgggctgcgcgcttgcgcttcgcttcc tggccctcgtttcctgggacatccctggggctagagcactggataatggactggc aagaactcctcccatgggctggctgcattgggagaggtttatgtgtaatctggac

<p><i>я нуклеиновая кислота, кодирующая D</i> (D4)</p>	<p>tgtcaagaggagccagactcctgcatctctgagaagctctttgaagagatggctg agaggatggtgacagatggttggaggatgctggatatgagtacctgtgcattga tgactgctggatggccccagagagacagtgaaggcagactgcaagcagaccct cagaggttccccatggcattaggcagctggccaaccatgtccactccaagggcc tgaacttggcatctatgctgatgtgggcaataagacctgtgctggcttccctgg ctcttttggctactatgacattgatgccagacttttggctgactgggggtgtggac ctgctcaagtttgatggctgctactgtgactctctggaaaacctggctgatggat acaagcacatgtctttggctctgaacaagactggtaggcccattggttacagctg tgagtggccactgtacatgtggcccttcagaagcccaactacactgagatcaga cagtactgcaaccactggaggaactttgcagatattgatgattcctgggcctcca tcaagagcatcctggactggacttccagaaaccaagagagaattgtggatgttgc tgggcctggaggatggaatgatcctgacatgctggtgattggaaattttgggctg agctgggaccagcaagtgactcagatggccctctgggcatcatggctggctccc tcttcatgagcaatgacttgagggccatttcccccaagccaaggccctgcttca agacaaaagatgtcattgctatcaatcaagatcccctgggcaagcaaggctaccag ttgagaaaaggagacaactttgaggtgtgggaaagacctctgtctggagatgcct gggctgtggccatcatcaacagacaagaaattggtggccccagaggttacacat ccctgtggcttctcttggaaaaggggttgcctgcaatccagcttgcctcatcacc cagctcctgccagtgaagaggaagctgggtttctatgaagctacctctaggctca gatcccacatcaaccccactggcacagtgctgctgcagctggagaacaccatgca gacctccctgaaggacctcctttaa (SEQ ID NO: 38)</p>
<p><i>Кодон-оптимизированная нуклеиновая кислота, кодирующая D</i> (D5)</p>	<p>atgcagctgaggaaccagaactacatctgggctgcgcgcttgcgcttcgcttcc tggccctcgtttctgggacatccctggggctagagcactggataatggactggc aagaactcctcccatgggctggctgactgggaaaggtttatgtgtaatctggac tgtcaagaggagcctgactcctgcatctctgagaagctctttgaagagatggctg agaggatggtgacagatggatggaaggatgctggttatgagtacctgtgcattga tgactgctggatggccccctcagagagattctgaaggcagactgcaagcagacccc cagaggttccccatggcattaggcagctggccaaccatgtccactccaagggcc tgaacttggcatctatgctgatgtgggcaataagacctgtgctggcttccctgg ctcttttggatactatgacattgatgccagacttttggctgactgggggtgtggac ctctgaagtttgatggctgctactgtgactctctgggagaacctggctgatggtt acaagcacatgtctcttggctctgaacaagactggtagaccattggttacagctg tgagtggccactgtacatgtggcccttcagaagcccaactacactgagatcaga cagtactgcaatcattggaggaattttgcagatattgatgattcctgggcctcca tcaagagcatcctggactggacatccagaaaccaagaaagaattgtggatgtggc tgggcctggagggttggatgaccagacatgctggtgattggcaactttgggctg agctgggaccagcaagtgactcagatggccctctgggcatcatggctggacctc tcttcatgtccaatgatctgagagccatttcccccaagccaaggccctgctcca agacaaaagatgtcattgctatcaatcaagatcccctggggaagcaaggctaccag ctcagaaagggtgacaactttgaggtgtgggagagacctctgtctggagatgcct gggctgtggccatcatcaacagacaagagattggtggccccagaggctacacat ccctgttgcctcctgggaaaaggagtggcctgcaaccagcttgcctcatcacc cagcttctgcctgtgaagaggaagctgggcttctatgaagctacctctaggctga ggtcccacatcaaccccactggcacagtgctgctgcagctggaaaacaccatgca gacttccctcaaggacctgctttaa (SEQ ID NO: 39)</p>
<p><i>Кодон-оптимизированная нуклеиновая кислота,</i></p>	<p>atgcagctgaggaaccagaactacatctgggctgcgcgcttgcgcttcgcttcc tggccctcgtttctgggacatccctggggctagagcactggacaatggcctggc cagaacccctcccatgggctggctgactgggagagattcatgtgcaacctggat tgccaggaggagccagactcttgcactctctgaaaagctgtttgaggaaatggccg agagaatggtgacagatggatggaaggatgccggatacaggtacctgtgtatcga tgactgttggatggcccccaagagagactccgaggccgtctgcaggctgacca cagaggtttccctcatggaattaggcagttggccaaccatgtgcaactccaagggac tgaagctgggcatctatgccgatgtgggcaacaagacctgtgctggcttcccagg</p>

<p><i>кодирующая D</i> (D6)</p>	<p>cagctttggctattatgatattgatgcacaaacttttgcagactggggagttgat ctgctgaaatttgatgggtgttactgtgactccctggagaacctcgccgacggat acaagcataatgtcccttgctctgaacaagactggcaggcccattgttactcttg tgagtggccactgtacatgtggcccttcagaagcccaactataccgagattcgc cagtaactgcaatcactggaggaactttgcagacattgatgacagctgggcctcca ttaagtctatcctggattggacaagcagaaaccaagagagaattgtggatgtggc tggccctggtgggttggaaatgacccccgataatgctggtgattggcaactttggactg tcttgggaccagcaggtgaccagatggctctgtgggctatcatggccggccccc tcttcatgtctaatgacctgagggccatctctcctcaggccaaggcacttctgca ggataaggacgtgattgccatcaatcaggatcctctggggaagcagggctatcag ctgagaaaggggacaatctcgaggtctgggagagaccctgagcggcgatgctt gggctgtggccatcatcaatagacaagagattggagggccaagaggctacacat tcttgtggcaagcctaggaaaaggggttgcttgcaatccagcctgtttcatcacc cagctgctgctgttaagagaaagtgggcttctatgaggccacctctaggctga gggtccataatcaacccactggcacagtgctgctgcagcttgaaaacaccatgca gACCTccctcaaggacctgctgtaa (SEQ ID NO: 40)</p>
<p><i>нуклеиновая кислота, кодирующая E</i></p>	<p>atgcagctgaggaaccsagaactacatctgggctgctgcttgcgcttgccttcc tggccctcgtttctgggacatccctggggctagagcactggataatggattggc tagaacacctcctatgggggtggcttactgggagaggttcatgtgcaacctggac tgctcaggaagaaccagacagctgcatctccgagaagctctttgaggaaatggccg aacgaatggtgactgacggctggaaagatgcaggttacgagtatctgtgtattga cgattgctggatggccccacaacgggattctgaggggaagacttcaggctgatccg cagcgttccctcatggcataaggcagctggcaaaccacgtccacagtaaggggc tcaaattgggaatctacgcgacgtgggcaataagacctgtgcccgttttccggg atcattcgggtattatgacattgacgccccaaacgtttgctgattggggcgttgac ctgctgaaatcgatgggtgctactgtgacagcctcgaaaacctggcagacggct acaagcataatgtctctcgccctgaataaaaccggctcggccaatcgtatattcctg cgagtggcctctttacatgtggccatttcagaaaccgaactacacagaaattcgc cagtaattgcaatcattggaggaacttcgctgatatcgatgactcatgggcctcca taaagagcatcttggactggaccagtcggaatcaggagcgaattgtggatgtcgc aggccctggaggatggaacgatccagacatgctggtgatcggcaattttggcctc tcttgggaccagcaggttacccaaatggctctgtgggcaattatggccggctcctc ttttcatgagcaacgatctgctgctgatctcaccacaggcaaggccctgctcca agacaaagatgtgatagccatcaatcaggaccctgggaaagcagggctaccag ctgagaaaaggcgacaactttgaggtctgggaaaggcctttgagtggagatgctg gggctgtggcattattaatcggcaagagatcggaggtccaagcgggtatacaat tctttagcaaaagcttggcaagggcgcttgctgtaaccagcttgccttcatcact cagcttctgcccgtgaagagaaaactgggtttctacgaagctaccagcagggctcc gatccacatcaaccctacaggaaccgtcctcttgcagctggagaatacgatgca gacttcaactgaaggacctcctgtag (SEQ ID NO: 22)</p>
<p><i>нуклеиновая кислота, кодирующая F</i></p>	<p>atgcagctgaggaaccsagaactacatctgggctgctgcttgcgcttgccttcc tggccctcgtttctgggacatccctggggctagagcactggataatggattggc tagaacacctcctatgggggtggcttactgggagaggttcatgtgcaacctggac tgctcaggaagaaccagacagctgcatctccgagaagctctttgaggaaatggccg aacgaatggtgactgacggctggaaagatgcaggttacgagtatctgtgtattga cgattgctggatggccccacaacgggattctgaggggaagacttcaggctgatccg cagcgttccctcatggcataaggcagctggcaaaccacgtccacagtaaggggc tcaaattgggaatctacgcgacgtgggcaataagacctgtgcccgttttccggg atcattcgggtattatgacattgacgccccaaacgtttgctgattggggcgttgac ctgctgaaatcgatgggtgctactgtgacagcctcgaaaacctggcagacggct acaagcataatgtctctcgccctgaataaaaccggctcgggatatcgtatattcctg cgagtggcctctttacatgtggccatttcagaaaccgaactacacagaaattcgc cagtaattgcaatcattggaggaacttcgctgatatcgatgactcatgggcctcca</p>

	<p>taaagagcatcttggactggaccagtcggaatcaggagcgaattgtggatgtcgc aggccctggaggatggaacgatccagacatgctggatcggaattttggcctc tcttgggaccagcaggttacccaaatggctctgtgggcaattatggccggccctc ttttcatgagcaacgatctgcgcgcatctcaccacaggcaaaggccctgctcca agacacggacgtgatagccatcaatcaggaccgcttgggaaagcagggctaccag ctgagaaaaggcgacaactttgaggtctgggaaaggcctttgagtggagatgctg gggctgtggcattattaatcggcaagagatcggaggtccacgcggttatacaat tcctgtagcaaagcttggcaagggcgcttgctgtaaccagcttgccttcatcact cagcttctgccggtgaagagaaaactgggtttctacgaagctaccagcaggctcc gatcccacatcaaccctacaggaaccgtcctcttgcagctggagaatacgatgca gacttcaactgaaggacctcctgtag (SEQ ID NO: 23)</p>
<p><i>нуклеино вая кислота, кодирую щая 002</i></p>	<p>ttggacaatgggctggccaggacacctaactatgggctggctccactgggagcgc ttatgtgtaacctcgactgccaagaggagccagactcatgcatctctgagaagtt gttcatggagatggctgagctgatggtgagcgaaggggtggaaggatgctgggctat gagtatctctgtattgatgactgctggatggctccaacagcgcgacagtgaaggcc ggctccaggccgatcctcagcgggtccccacgggtatcagacaactggcgaatta cgtgcaactcaaaaggccttaagctgggtatataatgctgatgtgggtaataaaaca tgtgcaggcttccaggctcttttgggtaactatgacatcgacgcccagacttttg cggactggggcgtggacctgctcaagtttgacggatggtactgtgactcccttga gaacctggccgacgggtacaagcatatgtcactggccctgaatcggacaggccga tccatcgtataactcttgcgagtgccctctgtacatgtggcccttcagaagccca actatacagaaaatcaggcaataactgcaaccattggcggaaacttcgcagacataga cgacagctgggctagcattaagtctattctggattggaccagtttcaatcaagaa aggattgtcgatgtcgcaggcccaggaggttggaaatgaccagacatgctcgtga ttggaaatttcggtctgtcatgggaccaacagggtgactcagatggctctgtgggc aatcatggcagcaccactgttcatgagcaatgatttgcgacacatctcccctcag gcgaaagcccttctgcaggataaggacgttatcgccattaaccaggaccgctcg gtaagcaagggtagcagttgcccaggaggagacaatttcgaggtctgggaacgacc cctgtctggactcgcttgggcccgtagccgtaattaaccgacaagaaatcggcggga ccgaggagctataccatagctgtcgcctccctcggcgggggctagcttgaacc cggcttggttcataaccagctgctgcccgtcaagaggaaactggggctttatga gtggacaagtcgggtgaagtctcataattaaccgacagggactgttctcctccag ctggaaaacacaatgcagatgagcctgaaggatctcttgtga (SEQ ID NO: 24)</p>
<p><i>нуклеино вая кислота, кодирую щая 003</i></p>	<p>tttggacaatgggctggccaggacacctaactatgggctggctccactgggagcgc ttatgtgtaacctcgactgccaagaggagccagactcatgcatctctgagaagt tgttcatggaaatggccgagcttatgggtctcagaggggtggaagacgcccggata tgagtatctgtgcatcgacgattgctggatggcccccaacgcgattccgaaggc cgcttgcaggctgatccgcagcgttttctcagggatccgccaattggcaaat acgtgcaactcaaaggggtcaagttgggcatctacgcagacgtgggaaacaagac atgtgctggatttcccgggagtttcgggtattatgacattgacgcacagacctt gctgattggggggtcgacctcctgaagtttgacgggtggtattgacgacagccttg aaaatctggccgacgggtacaaacacatgtcccttgcactgaatagaactggctg gtccatcgtctatagttgtgagtgccgctttacatgtggccttttcagaaacc aactacaccgagattcggcaatattgcaatcactggcgaaatttcgcagatctg atgattcttgggctagtattaatccatcctggattggacatcattcaaccagga gcgcatcgtggacgttgcctggacctggcgggtggaatgatccagacatgcttgtg atcggaaacttcgggtctctcttggaaaccagcaagtcactcaaatggcactctggg caattatggccgccccctctttatgtccaacgatctgaggcataatcagtcctca ggctaaagccctgctgcaagacaaggatgtgattgctatcaaccaagatcccctt ggtaaacaggggtaccagttgcgcaaaggcgacaattttgaggtgtgggaaaggc cactttcaggcgatgatggccgcttgcgatgatcaacaggcaagaaattggcgg accgaggagctatacaataaccagtgccgtcactgggtaagggagtgcctgtaac cccgatgcttcaactcaacttctgccagtgaaacgaaaactcggattctatg</p>

	<p>agtggacctcaagactgaggtctcatattaacccgacagggactgttctcctcca gctggaaaacacaatgcagatgagcctgaaggatctcttgtga (SEQ ID NO: 25)</p>
<p><i>нуклеино вая кислота, кодирую щая 004</i></p>	<p>ttggacaatgggctggccaggacacctaactatgggctggctccactgggagcgct ttatgtgtaacctcgactgccaaagaggagccagactcatgcatctctgagaagtt gttcatggagatggctgaacgcatggtttctgagggatggaaagatgcaggctac gagtacctgtgtagacgattggtggatggccccacagcgggatcagaaggta gactccaggcggatccccagagattcccacatggaatcagacagctggccaatta cgtccattccaaaggccttaagttgggtatctacgcccagctaggcaacaagact tgtgccggatctccggcagtttccggatactatgacattgatgcacagactttcg ctgactgggggggtggacttgcctcaaatgtgatggctgttattgcatagcctcga aaatctggctgatggctacaagcacatgtcactcgtctcaaccgactggggcg tctatagtttactcctgagtggtcctctgtatagtggccgttccagaaacca attacacagaaataaggcagattgcaatcactggcgcaactttgctgatattga tgattcctgggctccataaagagtatcttggactggactagtcgcaatcaggaa agaattgtcgacgtcgccggaccaggcggatggaatgatcctgatatgctcgtga tcgggaaacttcggactctcatgggaccagcaggtgaccagatggctagtggggc tatcatggccgcccctctgtttatgagtaacgacctccgccacatcagccccag gccaaggcgttctgcaggataaagatgtcatcgccatcaaccaagatcccctgg gcaacaaggctatcagctgcggaaggagacaattttgaggtgtgggaacgccc tttgagcggagacgctgggctgtggctattataaatcgccaggagattgggggc ccgagaagttatactatccccgttgcaagcctgggaaaggcgctcgctgcaacc ctgctgcttcatcacacagctgcttctgtcaaacgccaattgggggttctaca ttggacatccagactcaaattctcatattaacccgacagggactgttctcctccag ctggaaaacacaatgcagatgagcctgaaggatctcttgtga (SEQ ID NO: 26)</p>
<p><i>Кодон- оптимиз ированна я нуклеино вая кислота, кодирую щая 004 (004-1)</i></p>	<p>atgcagctgaggaaccagaactacatctgggctgcgcgcttgcgcttcgcttcc tggccctcgtttctgggacatccctggggctagagcactggataatggactggc aagaacccaaccatgggctggctgcactgggaaagattcatgtgtaatctggac tgtcaagaggagcccgactcctgcatctctgagaagctcttcatggagatggctg agaggatggtgagtgaaaggatggaaggatgctggttatgagtacctgtgcattga tgactgctggatggccccagagagattcagagggcagactgcaagcagatcct cagaggttccccatggcatcagacagctggccaactatgtccactccaagggcc tgaagctgggtatctatgctgatgtgggcaacaagacctgtgctggcttctcctgg ctcctttggttactatgacattgacgcccagacctttgctgactggggagtggac ctgttgaagtttgacggctgctactgtgactctctggagaacctggctgatggct acaagcacatgtctcttgccctgaacagaactggtaggagcattgtttacagctg tgagtggccactgtacatgtggcccttccagaagccaactacactgagatccgc cagactgcaaccattggaggaactttgcagacatcgatgattcctgggctcca tcaagagcatcctggactggacttccagaaaccaagagagaattgtggatgttg tggacctggaggttggaaatgacctgacatgctgggtgattggaaattttgggctg tcctgggaccagcaagtgactcagatggccagctgggcatcatggcagcccctc tcttatgtccaatgatctcagacacatttcccccaagccaaggctctgctcca agacaagaatgtcattgctattaatcaagatcccctggggaagcaaggctaccag ctgaggaaaggagacaactttgaggtgtgggagagacctctgtctggagatgcct gggctgtggctatcatcaatagacaagaaattgggtggccccagatcctacaccat ccctgtggcttccctgggcaagggtgtggcctgcaatccagcttgcctcatcacc cagctcctcccagtgaaagggcagcttggcttctacaactggacatctaggctca agtcccacatcaacccactggcacagtgctgctgcagctggaaaacaccatgca gatgagcctgaaagacctcctgtga (SEQ ID NO: 41)</p>
<p><i>Кодон- оптимиз ированна я нуклеино</i></p>	<p>atgcagctgaggaaccagaactacatctgggctgcgcgcttgcgcttcgcttcc tggccctcgtttctgggacatccctggggctagagcattggacaatggactggc taggacccaaccatggggtggctgcactgggagaggtttatgtgtaatctggac tgtcaagaagaacctgactcctgcatctctgagaagctgttcatggagatggctg agaggatggtgagtgaaaggctggaaggatgctggttatgagtacctgtgcattga</p>

<p><i>вая кислота, кодирую щая 004</i></p> <p><i>(004-2)</i></p>	<p>tgactgctggatggccccctcagagagattcagaggggcagacttcaagcagacccc cagaggttcccccatggcatccgccagctggccaactatgtccactccaagggcc tgaactgggtatctatgctgatgtgggcaacaagacctgtgctggcttccctgg ctcctttggctactatgacattgacgccagacctttgctgactgggggtgtggac ctcctcaagtttgatggctgctactgtgactctctggaaaacctggcagatggtt acaagcacatgtctcttgccctgaacagaactggtaggagcattgtttacagctg tgagtggccactgtacatgtggcccttccagaagcccaactacactgagatcaga cagactgcaaccattggaggaatgtgcccagacatcgatgattcctgggccagca tcaagtccatcctggactggacttccagaaaccaagagagaattgtggatgttgc tggacctggaggatggaatgaccagacatgctgggtgattggaaatctcgggctg tcctgggaccagcaagtgactcagatggcctcttgggccatcatggcagcccccc tcttcatgtccaatgatcttagacacatttccccacaagccaaggccctcctgca agacaaagatgtcattgctattaatcaagatccccctggggaagcaaggctaccag ctcagaaaaggagacaactttgaggtgtgggaaagacctctgtctggagatgcct gggctgtggctatcatcaatagacaagaaattgggtggccccagatcctacacat ccctgtggcctccctgggcaaggggtgttgctgcaatccagcttgcctcatcacc cagctgctcccagtgaaagaggcagttgggcttctacaactggacatctaggttga agagccacatcaacccccactggcacagtgctgctgcagctggagaacacccatgca gatgagcctgaaggacctgctttaa (SEQ ID NO: 42)</p>
<p><i>Кодон- оптимиз ированна я нуклеино вая кислота, кодирую щая 004</i></p> <p><i>(004-3)</i></p>	<p>atgcagctgaggaacccagaactacatctgggctgcgcgcttgcgcttcgcttcc tggccctcgtttccctgggacatccctggggctagagcactggataatggactggc aagaacccccaacccatggggtggctgactgggagaggtttatgtgtaactctggac tgtcaagaggagccagactcctgcatctctgagaagctcttcatggagatggctg agaggatgggtgagtgaaggctggaaggatgctggttatgagtacctgtgcattga tgactgctggatggccccctcagagagattcagaggggcagactgcaagcagatccc cagaggttcccccatggcattaggcaactggccaactatgtccactccaagggcc tgaagctgggcatctatgctgatgtgggcaacaagacctgtgctggcttccctgg ctcctttggctactatgataattgatgccagacctttgctgactgggggtgtggac ctgctcaagtttgatggctgctactgtgacagcctgggagaacctggctgatggtt acaagcacatgtctcttgctctgaacagaactggtagaagcattgtttacagctg tgagtggccactgtacatgtggcccttccagaagcccaactacactgagatcaga cagactgcaaccattggaggaactttgcagacattgatgattcctgggcctcca tcaagagcatcctggactggacttccagaaaccaagagagaattgtggatgttgc tggacctggaggatggaatgaccctgacatgctgggtgattggaaatctcgggctg tcctgggaccagcaagtgactcagatggccagctgggccatcatggcagcccccc tgttcatgagcaatgatctcagacacatttcccccaagccaaggccctgcttca agacaaagatgtcattgctattaatcaagatccccctgggcaagcaaggctaccag ctgaggaaggagacaactttgaggtgtgggaaagacctctgtctggagatgcct gggctgtggctatcatcaatagacaagaaattgggtggccccagatcctacacat ccctgttgccctctctgggaaaaggagtggcctgcaatccagcttgcctcatcacc cagctcctcccagtgaaagaggcagctgggtttctacaactggacaagcagattga agtcccacatcaacccccactggcacagtgctgctgcagctggaaaacacccatgca gatgtccctgaaggacctcctgtga (SEQ ID NO: 43)</p>
<p><i>Кодон- оптимиз ированна я нуклеино вая кислота, кодирую щая 004</i></p>	<p>atgcagctgaggaacccagaactacatctgggctgcgcgcttgcgcttcgcttcc tggccctcgtttccctgggacatccctggggctagagcacttgataatggactggc aagaacccccaacccatggggtggctgactgggaaagattcatgtgtaactctggac tgtcaagaagaaccagattcctgcatctctgagaagctgtttatggagatggctg agaggatgggtgtcagaaggatggaaggatgctggttatgagtacctgtgcattga tgactgctggatggccccccagagagacagtgaaaggcagacttcaagcagacccct cagaggttcccccatggcattaggcaactagccaactatgtccactccaagggcc tgaactgggcatctatgctgatgtgggcaacaagacctgtgctggcttccctgg ctcctttggctactatgacattgatgccagacctttgctgactgggggtgtggac ctcctcaagtttgatggctgctactgtgactccctggaaaacctggctgatggtt</p>

(004-4)	acaagcacatgagcctggccctgaacagaactggtaggagcattgtttacagctg tgagtggccactgtacatgtggcccttccagaagcccaactacactgagatcaga cagtactgcaaccattggaggaactttgcagatattgatgattcctgggccagca tcaagtccatcctggactggacatccagaaaccaagagagaattgtggatggtgc tggacctggaggttggaaatgatcctgacatgctggtgattggaaatTTTgggctg tcttgggaccagcaagtgactcagatggcctcctgggcatcatggcagccctc tcttcatgtccaatgacttgagacacatttcccccaagccaaggccctcctgca agacaaagatgtcattgctattaatcaagatcccttgggcaagcaaggctaccag ctgaggaagggagacaactttgaggtgtgggagaggccctgtctggagatgcct gggctgtggctatcatcaatagacaagaaattggtggccccagatcctacacat ccctgttgcttctcttggcaaaggagtggcctgcaatccagcttgcttcatcacc cagctccttctgtgaagaggcagctgggttctacaactggacttcaaggttga agagccacatcaacccactggcacagtgtgctgagctgggagaacacatgca gatgtctctgaaggacctgctttaa (SEQ ID NO: 44)
Кодон- оптимиз ированна я нуклеино вая кислота, кодирую щая 004 (004-5)	atgcagctgaggaaccagaactacatctgggctgcgcgcttgcgcttcgcttcc tggccctcgtttctgggacatccctggggctagagcactggataatggactggc aagaaccccaaccatgggctggctgactgggagaggttcatgtgtaatctggac tgtcaagaggagcctgactcctgcatctctgagaagctgtttatggagatggctg agaggatggtgtctgaaggatggaaggatgctggctatgagtacctgtgcattga tgcactgctggatggccctcagagggacagtgaaggcagactgcaagcagacccc cagagattccccatggcattagacagcttgccaactatgtccactccaagggcc tgaactgggcatctatgctgatgtgggcaacaagacctgtgctgggttccctgg ctcctttggctactatgacattgatgcccagacctttgctgactgggggtgtggac ctcctcaagtttgatggctgctactgtgacagcctggaaaacctggctgatggtt acaagcacatgtctctggccctgaacagaactggtaggagcattgtttacagctg tgagtggccactgtacatgtggcccttccagaagcccaactacactgagatcaga cagtactgcaaccattggaggaactttgcagatattgatgattcctgggcctcca tcaagagcatcctggactggacttccagaaaccaagagagaattgtggatgtagc tggacctggaggttggaaatgaccagacatgctggtgattggaaatTTTgggctg tcttgggaccagcaagtgactcagatggccagctgggcatcatggcagccccc tcttcatgagcaatgatctcagacacatttcccccaagccaaggctctgctcca agacaaagatgtcattgctattaatcaagatcccttggggaagcaaggctaccag ctgaggaagggagacaactttgaggtgtgggaaagacctctgtctggagatgcct gggctgtggctatcatcaatagacaagaaattggtggccccagatcctacacat ccctgttgcttctcttggcaaaggagtggcctgcaatccagcttgcttcatcacc cagctcctgctgtgaagaggcagttgggttctacaactggacatctaggttga agtcccacatcaacccactggcacagtgtgctgagctgggagaacacatgca gatgtccctgaaggacctgctttaa (SEQ ID NO: 45)
Нуклеин овая кислота, кодирую щая 005	ttggacaatgggctggccaggacacctactatgggctggctccactgggagcgt ttatgtgtaacctgactgccaagaggagccagactcatgcatctctgagaagtt gttcgaggagatggcagaacgaatggtgacagatggatggaaggacgctggctac gagtatctgtgcatagatgattgttggatggccctcagcgagactcagagggga gactccaggccgaccccagcgatttccacacggaatccggcaactggctaacca tgtgcaactcaaaagggtcaagctgggaatTTTatgctgacgtcgggaacaaaact tgtgcggggtttccggctccttcggatattacgacatcgacgcccagactttcg cagactgggggtgtggacctgcttaagtctgacggctgttactgcatagcttggg aaacttggctgacggctataagcacatgagtctcgccctgaaccgaacaggcaga agcatagtctactcctgcaatggccactttacatgtggccattccagaaacct attataccgagatcagacaatactgtaaccattggcgaacttccgacattga cgatagttggaagtcaatcaagtccatcctggattggacctctaggaaccaggaa aggatcgtggacgtggctggacctggcgatggaacgatccagacatgctcgtga taggaaactttggactgtcatggaatcagcaagtaacacagatggcgctctgggc cattatggctgcccccttgtttatgtctaacgacctgaggcatatctctcctcaa

	<p>gccaaggcactcctgcaggacaaggacggttatcgccatcaaccaggaccactgg gcaagcagggataccagctgcggaagggtgataacttcgaggctctgggagcgacc gcttcaggagacgcctgggcagttgcaatcatcaacaggcaagaaattggtggg ccacggtcttatactattcccgtggcttctctcggttaagggcgctgcctgcaacc ccgctgctttatcacccaattggtgcccgttaagagaaaactgggattttacga gtggacatccaggctgcggtctcatattaacccgacagggaactgttctcctccag ctggaaaacacaatgcagatgagcctgaaggatctcttgtga (SEQ ID NO: 27)</p>
<i>Нуклеин овая кислота, кодирую щая 006</i>	<p>ttggacaatgggctggccaggacacctaactatgggctggctccactgggagcgct ttatgtgtaacctcgactgccaaaggagccagactcatgcatctctgagaagtt gttcgaagagatggctgaactgatgggtgtccgaggggtggaaggatgcagggtac gagtacctttgcatagacgattgctggatggcaccacagcgggatagtgagggca ggttgcaaggcggacccccacaagatttccacatggcatcagacagctggccaacca cgtgcactctaaaggcctgaagctggggatttacgccgatgtcggtaataaaaaca tgtgctgggttcccggtagctttggatactacgacatcgacgccagacatttg ctgattggggagtgacactgctcaagttcgacggctgctactgcgattctctgga aaatctggccgatgggtataagcacatgagtcttctcttaatagaaccggacgc tctatagtctattcatgtgagtgggcactgtacatgtggccatttcagaaacca actataccgaaattagacagtattgtaaccactggcggaaatttcgccgacataga cgatagctggaagagcatcaagtcaattctcgattggacttcattcaaccaggag cggatcgtcgacgtggccggcctgggggctggaatgatccagatatgctgggtga tcggaaactttggctctcctggaatcaacaggctcactcagatggccctctgggc cattatggcagcaccactctttatgagcaacgacctgagacacatttcccacag gccaaggcattgctgcaggacaagacgtgatcgccattaaccaggaccactgg gcaagcaagggtaccaacttaggcaggagataattttgaggctctgggagcgccc actcagcggagacgcctgggcccgttgccatgataaacagacaggagattggcggc cccagatcctacacaattcctgctcgtagcctgggcaagggggtggcttgtaatc ccgctgctttataaccagctgctgccagtgaacggaaactcgggttctatga atggacttctaggctcaggtctcatattaacccgacagggaactgttctcctccag ctggaaaacacaatgcagatgagcctgaaggatctcttgtga (SEQ ID NO: 28)</p>
<i>Нуклеин овая кислота, кодирую щая 007</i>	<p>ttggacaatgggctggccaggacacctaactatgggctggctccactgggagcgct ttatgtgtaacctcgactgccaaaggagccagactcatgcatctctgagaagtt gttcgaggagatggcagaacgaatggtgacagatggatggaaggacgctggctac gagtatctgtgcatagatgattggtggatggccctcagcagagactcagagggga gactccaggccgacccccagcgaatttccacacggaatccggcaactggctaacca tgtgcactcaaaagggtcaagctgggaatttatgctgacgtcgggaacaaaact tgtgccccgggttcccggctccttcggataattacgacatcgacgccagactttcg cagactgggggtgtggacactgcttaagttcgacggctgttactgcgatagtctgga aaacttggtgacggctataagcacatgagtctcgcctgaaccgaacaggcaga agcatagtctactcctgcaatggccactttacatgtggccattccagaaacct attataccgagatcagacaataactgtaaccattggcgaacttcgccgacattga cgatagttggaagtcaatcaagtccatcctggattggacctctaggaaccaggaa aggatcgtggacgtggctggacactggcggatggaacgatccagacatgctcgtga taggaaactttggactgtcatgggatcagcaagtaacacagatggcgctctgggc cattatggctgcccccttggtttatgtctaacgacctgaggcataatctctcctcaa gccaaggcactcctgcaggacaaggacggttatcgccatcaaccaggaccactgg gcaagcagggataccagctgcggaagggtgataacttcgaggctctgggagcgacc gcttcaggagacgcctgggcagttgcaatcatcaacaggcaagaaattggtggg ccacggtcttatactattcccgtggcttctctcggttaagggcgctgcctgcaacc ccgctgctttatcacccaattggtgcccgttaagagaaaactgggattttacga ggcgacatccaggctgaagtctcatattaacccgacagggaactgttctcctccag ctggaaaacacaatgcagatgagcctgaaggatctcttgtga (SEQ ID NO: 29)</p>
<i>Нуклеин овая</i>	<p>tggaacaatggattggcaaggacgcctaccatgggctggctgcaactgggagcgctt catgtgcaaccttgactgccaggaagagccagattcctgcatcagtgagaagctc</p>

<p><i>кислота, кодирующую 008</i></p>	<p>ttcgaggagatggcagagagaatggtcaccgacggctggaaggatgcaggttatg agtacctctgattgatgactggtggatggctccccaagagattcagaaggcag acttcaggcagaccctcagcgctttcctcatgggattcgccagctagctaatac gttcacagcaaaggactgaagctagggatttatgcagatggtggaataaaacct gcgcaggcttccctgggagttttggatactacgacattgatgccagacctttgc tgactggggagtagatctgctaaaatttgatgggtgttactgtgacagtttgaa aatttggcagatggttataagcacatgtccttggccctgaataggactggcagaa gcattgtgtactcctgtgagtggcctctttatatgtggccctttcaaaagcccaa ttatacagaaatccgacagtagtcaatcactggcgaaattttgctgacattgat gattcctgggccagtataaagagtatcttggactggacatctagaaccaggaga gaattggtgatggtgctggaccaggggttggaatgaccagatagtttagtgat tggcaactttggcctcagctgggaccagcaagtaactcagatggccctctgggct atcatggctgctcctttattcatgtctaatgacctccgacacatcagccctcaag ccaaagctctccttcaggataaggacgtaattgccatcaatcaggacccttggg caagcaagggtaccagcttagaaaggagacaactttgaagtgtgggaacgacct ctctcaggcgatgcttgggctgtagctatcataaaccggcaggagattggtggac ctcgctcttataccatccccgttgcttccctgggtaaaggagtggcctgtaatcc tgcttcatcacacagctcctccctgtgaaaaggcagctagggttctataac tggacttcaaggttaaagagtcacataaatcccacaggcactgttttgcttcagc tagaaaatacaatgcagatgtcattaaaagacttactttaa (SEQ ID NO: 31)</p>
<p><i>Нуклеин овая кислота, кодирующую 009</i></p>	<p>tggacaatggattggcaaggacgcctCCCatgggctggctgactgggagcgctt catgtgcaacctgactgccaggaagagccagattcctgcatcagtgagaagctc ttcgaggagatggcagagagaatggtcaccgacggctggaaggatgcaggttatg agtacctctgattgatgactggtggatggctccccaagagattcagaaggcag acttcaggcagaccctcagcgctttcctcatgggattcgccagctagctaatac gttcacagcaaaggactgaagctagggatttatgcagatggtggaataaaacct gcgcaggcttccctgggagttttggatactacgacattgatgccagacctttgc tgactggggagtagatctgctaaaatttgatgggtgttactgtgacagtttgaa aatttggcagatggttataagcacatgtccttggccctgaataagactggcagac ccattgtgtactcctgtgagtggcctctttatatgtggccctttcaaaagcccaa ttatacagaaatccgacagtagtcaatcactggcgaaattttgctgacattgat gattcctgggccagtataaagagtatcttggactggacatctagaaccaggaga gaattggtgatggtgctggaccaggggttggaatgaccagatagtttagtgat tggcaactttggcctcagctgggaccagcaagtaactcagatggccctctgggct atcatggctgctcctttattcatgtctaatgacctccgacacatcagccctcaag ccaaagctctccttcaggataaggacgtaattgccatcaatcaggacccttggg caagcaagggtaccagcttagaaaggagacaactttgaagtgtgggaacgacct ctctcaggcgatgcttgggctgtagctatcataaaccggcaggagattggtggac ctcgctcttataccatccccgttgcttccctgggtaaaggagtggcctgtaatcc tgcttcatcacacagctcctccctgtgaaaaggcagctagggttctataac tggacttcaaggttaaagagtcacataaatcccacaggcactgttttgcttcagc tagaaaatacaatgcagatgtcattaaaagacttactttaa (SEQ ID NO: 32)</p>
<p><i>ДТ</i></p>	<p>atgcagctgaggaaccagaactacatctgggctgcgcgcttgcgcttcgcttcc tggccctcgtttccctgggacatccctggggcttagagcactggacaatggattggc aaggacgcctaccatgggctggctgactgggagcgcttcatgtgcaaccttgac tgccaggaagagccagattcctgcatcagtgagaagctcttcatggagatggcag agctcatggctcagaaggctggaaggatgcaggttatgagtacctctgcattga tgactggttgatggctccccaagagattcagaaggcagacttcaggcagaccct cagcgctttcctcatgggattcgccagctagctaattatgttcacagcaaaggac tgaagctagggatttatgcagatggtggaataaaacctgcgcaggcttccctgg gagttttggatactacgacattgatgccagacctttgctgactggggagtagat ctgctaaaatttgatgggtgttactgtgacagtttggaaaatttggcagatggtt ataagcacatgtccttggccctgaataggactggcagaagcattgtgtactcctg</p>

	<p>tgagtggcctctttatatgtggccctttcaaaagcccaattatacagaaatccga cagtactgcaatcactggcgaaattttgctgacattgatgattcctggaaaagta taaagagtatcttggactggacatcttttaaccaggagagaattgttgatgttg tgaccagggggttggaaatgaccagatagttagtgattggcaactttggcctc agctggaatcagcaagtaactcagatggccctctgggctatcatggctgctcct tattcatgtctaatacctccgacacatcagccctcaagccaaagctctccttca ggataaggacgtaattgccatcaatcaggacccttgggcaagcaagggtaccag cttagacagggagacaactttgaagtgtgggaacgacctctctcaggcttagcct gggctgtagctatgataaaccggcaggagattggtggacctcgctcttataccat cgcagttgcttccctgggtaaaggagtggcctgtaatcctgctgcttcatcaca cagctcctccctgtgaaaaggaagctagggttctatgaatggacttcaaggtaa gaagtcacataaatcccacaggcactgttttgcttcagctagaaaatacaatgca gatgtcattaaaagacttactttaa (SEQ ID NO: 3)</p>
<p>Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая варианты α-GLA с сигнальным пептидом</p>	
<p><i>Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая А</i></p>	<p>atgcagctgaggaaccsagaactacatctgggctgcgcgcttgcgcttcgcttcc tggccctcgtttctgggacatccctggggctagagcactggataatggattggc tagaacacctactatgggggtggcttccactgggagagggttcatgtgcaacctcgac tgtcaggaagaaccagacagctgcatctccgagaagctgtttatggaaatggccg agcgaatggtgtcagaaggctggaaagatgcaggttacgagtatctgtgtattga cgattgctggatggctccgcaacgggacagtgagggcagacttcaggcagatcct cagcgcttcccacatgggataaggcagctcgccaactacgtccactctaagggac tgaactgggcatctatgctgacgtggggaataagacctgtgcgggatttcccgg tagcttcggctactacgacattgatgccagacctttgccgattggggagttgac ctcctcaaatcagatggctgctattgtgactctttggagaacctggcagacgggt acaagcataatgtccctggccctgaatcggacaggtagaccatcgtgtatagttg cgaatggcccctttacatgtggccttttcaaaagccaaactacactgagattcgc cagtattgcaatcactggaggaacttcgctgatatcgatgactcatgggcgagca tcaaatccatattggattggacctctcggaatcaggagcgcattgtagacgtcgc aggaccggcggtggaacgacctgataatgctggatcgggaaattttggctct agctgggaccagcaagttacgcagatggctctgtgggcaattatggcagccccac tcttcatgtccaacgatctgacacacatctctcctcaagctaaggctctgctgca ggacaaagatgtgattgccatcaatcaggaccctcggaagcagggtatcag ctgagaaaaggcgacaacttcgaagtctgggaaaggccacttccaggagacgcat gggctgtggcataataaaccggcaagagattggtgggcccaggagctacacaat ccccgttgccagtttgggcaaggagtggtgctgtaatcctgctgctttatcact cagctgctcccagtcaaaagacagctgggggttctatgagtggacctcccgcctca agagccatattaatcccacagggtaccgtactgctgcaacttgaaaacacgatgca gatgagtttgaaggacctctgtag (SEQ ID NO: 61)</p>
<p><i>Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая В</i></p>	<p>atgcagctgaggaaccsagaactacatctgggctgcgcgcttgcgcttcgcttcc tggccctcgtttctgggacatccctggggctagagcactggataatggattggc tagaacacctcctatgggggtggcttccactgggagagggttcatgtgcaacctggac tgtcaggaagaaccagacagctgcatctccgagaagctctttgaggaaatggccg aacgaatggtgactgagggtggaagatgcaggttacgagtatctgtgtattga cgattgctggatggccccacaacgggattctgagggaagacttcaggctgatccg cagcgcttcccctcatggcataaggcagctggcaaacacagctccacagtaaggggc tcaaatgggaaatctacgcgacgtgggcaataagacctgtgcccgttttcccggg atcattcgggtattatgacattgacgcccacgctttgctgattggggcggtgac ctgctgaaatcagatgggtgctactgtgacagcctcgaaaacctggcagacggct acaagcataatgtctctcgccctgaatagaaccggctcgccaatcgtatattcctg cgagtggcctctttacatgtggccatttcagaaaccgaactacacagaaattcgc cagtattgcaatcattggaggaacttcgctgatatcgatgactcatgggcctcca taaagagcatcttggactggaccagtcggaatcaggagcgaattgtggatgtcgc</p>

	<p>aggccctggaggatggaacgatccagacatgctggtgatcggcaatTTTGGCCTC tcttgggaccagcaggttacccaaatggctctgtgggcaattatggccggtcctc TTTTcatgagcaacgatctgCGCGGATctcaccacaggcaaaaggccctgctcca agacaaagatgtgatagccatcaatcaggaccCGTTGGGaaagcagggctaccag ctgagaaaaggCGACAactTTGAGgtctgggaaaggcctTTGAGTggagatgCGT gggctgtggcattattaatcggcaagagatcggaggTCCACgctcctatacaat tCCTgtagcatctcttggcaagggCGTTGcctgtaaccagcttGcttcatcact cagcttctgCCGgtgaagagaaaactgggTTTctacgaagctaccagcagggctcc gatccacatcaaccctacaggaaccGtctcttgcagctggagaatac gatgca gacttcaactgaaggacctcctgtag (SEQ ID NO: 62)</p>
<p><i>Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая С</i></p>	<p>atgcagctgaggaaccagaactacatctgggctgCGCGcttgcgcttcgcttcc TGGCCCTCGTTTcctgggacatccctggggctagagcactggataatggattggc tagaacacctcctatggggTGGcttcaactgggagaggttcatgtgcaacctggac TgtcaggaagaaccagacagctgcatctccgagaagctctTTGAGGaaatggccg aacgaatggTgactgagggctggaagatgcaggttacgagtatctgtgtattga cgattgctggatggccccacaacgggattctgagggaaagacttcaggctgatccg cagCGcttccctcatggcataaggcagctggcaaacacgctccacagtaaggggc tcaaattgggaatctacgCGgacgtgggcaataagacctgtgCCGGTTTccggg atcattcgggtattatgacattgacgccccaaacgTTTgctgattggggCGTTgac ctgctgaaattc gatggTTgctactgtgacagcctcgaaaacctggcagacggct acaagcатаatgtctctCGccctgaataaaaccggTcggccaatcgtataattcctg cgagtggcctctttacatgtggccatttcagaaaccgaactacacagaaattcgc cagtattgcaatcattggaggaacttcgctgatatcgatgactcatgggcctcca taaagagcatcttggactggaccagtcggaatcaggagcgaattgtggatgtcgc aggccctggaggatggaacgatccagacatgctggtgatcggcaatTTTGGCCTC tcttgggaccagcaggttacccaaatggctctgtgggcaattatggccggtcctc TTTTcatgagcaacgatctgCGCGGATctcaccacaggcaaaaggccctgctcca agacaaagatgtgatagccatcaatcaggaccCGTTGGGaaagcagggctaccag ctgagaaaaggCGACAactTTGAGgtctgggaaaggcctTTGAGTggagatgCGT gggctgtggcattattaatcggcaagagatcggaggTCCACgctcctatacaat tCCTgtagcatctcttggcaagggCGTTGcctgtaaccagcttGcttcatcact cagcttctgCCGgtgaagagaaaactgggTTTctacgaagctaccagcagggctcc gatccacatcaaccctacaggaaccGtctcttgcagctggagaatac gatgca gacttcaactgaaggacctcctgtag (SEQ ID NO: 63)</p>
<p><i>Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая D</i></p>	<p>atgcagctgaggaaccagaactacatctgggctgCGCGcttgcgcttcgcttcc TGGCCCTCGTTTcctgggacatccctggggctagagcactggataatggattggc tagaacacctcctatggggTGGcttcaactgggagaggttcatgtgcaacctggac TgtcaggaagaaccagacagctgcatctccgagaagctctTTGAGGaaatggccg aacgaatggTgactgacggctggaagatgcaggttacgagtatctgtgtattga cgattgctggatggccccacaacgggattctgagggaaagacttcaggctgatccg cagCGcttccctcatggcataaggcagctggcaaacacgctccacagtaaggggc tcaaattgggaatctacgCGgacgtgggcaataagacctgtgCCGGTTTccggg atcattcgggtattatgacattgacgccccaaacgTTTgctgattggggCGTTgac ctgctgaaattc gatggTTgctactgtgacagcctcgaaaacctggcagacggct acaagcатаatgtctctCGccctgaataaaaccggTcggccaatcgtataattcctg cgagtggcctctttacatgtggccatttcagaaaccgaactacacagaaattcgc cagtattgcaatcattggaggaacttcgctgatatcgatgactcatgggcctcca taaagagcatcttggactggaccagtcggaatcaggagcgaattgtggatgtcgc aggccctggaggatggaacgatccagacatgctggtgatcggcaatTTTGGCCTC tcttgggaccagcaggttacccaaatggctctgtgggcaattatggccggtcctc TTTTcatgagcaacgatctgCGCGGATctcaccacaggcaaaaggccctgctcca agacaaagatgtgatagccatcaatcaggaccCGTTGGGaaagcagggctaccag ctgagaaaaggCGACAactTTGAGgtctgggaaaggcctTTGAGTggagatgCGT</p>

	<p>gggctgtggccattattaatcggcaagagatcggaggtccacgcggttatacaat tctgtagcatctcttggcaaggcggttgccctgtaaccagcttgcttcatcact cagcttctgccggtgaagagaaaactgggtttctacgaagctaccagcaggctcc gatcccacatcaaccctacaggaaccgtcctcttgcagctggagaatacgatgca gacttactgaaggacctcctgtag (SEQ ID NO: 64)</p>
<p><i>Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая E</i></p>	<p>atgcagctgaggaaccagaactacatctgggctgcgcgcttgcgcttcgcttc ctggccctcgtttcttgggacatccctggggctagagcactggataatggattg gctagaacacctcctatgggggtggcttactgggagaggttcatgtgcaacctg gactgtcaggaagaaccagacagctgcatctccgagaagctctttgaggaaatg gccgaacgaatgggtgactgacggctggaaagatgcaggttacgagtatctgtgt attgacgattgctggatggccccacaacgggattctgaggggaagacttcaggct gatccgcagcgcttccctcatggcataaaggcagctggcaaacacagtcacagt aaggggctcaaattgggaatctacgcggacgtgggcaataagacctgtgcccgg tttccgggatcattcgggtattatgacattgacgccccaaacgtttgctgattgg ggcgttgacctgctgaaattcgatggttgctactgtgacagcctcgaaaacctg gcagacggctacaagcatatgtctctcgccctgaataaaaaccggtcggccaatc gtatattcctgcgagtgccctctttacatgtggccatttcagaaaccgaactac acagaaattcgccagatttgcaatcattggaggaacttcgctgatatcgatgac tcatgggctccataaagagcatcttggactggaccagtcggaatcaggagcga attgtggatgtcgcaggccctggaggatggaacgatccagacatgctggtgatc ggcaatthttggcctctcttgggaccagcaggttacccaaatggctctgtgggca attatggccggctcctcttttcatgagcaacgatctgcgcgcgatctcaccacag gcaaaggccctgctccaagacaaagatgtgatagccatcaatcaggaccgcttg ggaaagcagggctaccagctgagaaaaggcgacaactttgaggtctgggaaagg cctttgagtggagatgctggtgggctgtggccattattaatcggcaagagatcggg ggtccacgcggttatacaattcctgtagcaaagcttggcaagggcgcttgccctgt aaccagcttgcttcatcactcagcttctgccggtgaagagaaaactgggtttc tacgaagctaccagcaggctccgatcccacatcaaccctacaggaaccgtcctc ttgcagctggagaatacgatgcagacttactgaaggacctcctgtag (SEQ ID NO: 65)</p>
<p><i>Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая F</i></p>	<p>atgcagctgaggaaccagaactacatctgggctgcgcgcttgcgcttcgcttc ctggccctcgtttcttgggacatccctggggctagagcactggataatggattg gctagaacacctcctatgggggtggcttactgggagaggttcatgtgcaacctg gactgtcaggaagaaccagacagctgcatctccgagaagctctttgaggaaatg gccgaacgaatgggtgactgacggctggaaagatgcaggttacgagtatctgtgt attgacgattgctggatggccccacaacgggattctgaggggaagacttcaggct gatccgcagcgcttccctcatggcataaaggcagctggcaaacacagtcacagt aaggggctcaaattgggaatctacgcggacgtgggcaataagacctgtgcccgg tttccgggatcattcgggtattatgacattgacgccccaaacgtttgctgattgg ggcgttgacctgctgaaattcgatggttgctactgtgacagcctcgaaaacctg gcagacggctacaagcatatgtctctcgccctgaataaaaaccggtcgggataatc gtatattcctgcgagtgccctctttacatgtggccatttcagaaaccgaactac acagaaattcgccagatttgcaatcattggaggaacttcgctgatatcgatgac tcatgggctccataaagagcatcttggactggaccagtcggaatcaggagcga attgtggatgtcgcaggccctggaggatggaacgatccagacatgctggtgatc ggcaatthttggcctctcttgggaccagcaggttacccaaatggctctgtgggca attatggccggccctcttttcatgagcaacgatctgcgcgcgatctcaccacag gcaaaggccctgctccaagacacggacgtgatagccatcaatcaggaccgcttg ggaaagcagggctaccagctgagaaaaggcgacaactttgaggtctgggaaagg cctttgagtggagatgctggtgggctgtggccattattaatcggcaagagatcggg ggtccacgcggttatacaattcctgtagcaaagcttggcaagggcgcttgccctgt aaccagcttgcttcatcactcagcttctgccggtgaagagaaaactgggtttc tacgaagctaccagcaggctccgatcccacatcaaccctacaggaaccgtcctc</p>

	ttgcagctggagaatacgatgcagacttctactgaaggacctcctgtag (SEQ ID NO: 66)
<i>Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая 002</i>	atgcagctgaggaaccagaactacatctgggctgcgcgcttgcgcttcgcttcctggccctcgtttcctgggacatccctggggctagagcattggacaatgggctggccaggacacctaactatgggctggctccactgggagcgctttatgtgtaacctgactgccaaagaggagccagactcatgcatctctgagaagttgttcatggagatggctgagctgatgggtgagcgaaggggtggaaggatgctgggctatgagtatctctgtattgatgactgctggatggctccacagcgcgacagtgaggccggctccaggccgatcctcagcggttccccacgggtatcagacaactggcgaattacgtgcactcaaaaggccttaagctgggtatataatgctgatgtgggtaataaaacatgtgcaggcttcccaggctcttttgggtactatgacatcgacgccagacttttgcggactggggcgtggacctgctcaagtttgacggatgttactgtgactcccttgagaacctggccgacgggtacaagcatatgtcactggccctgaatcggacaggccgatccatcgtatactcttgcgagtggcctctgtacatgtggcccttcagaagcccaactatacagaaatcaggcaatactgcaaccattggcggaacttcgcagacatagacgacagctgggctagcattaagtctattctggattggaccagtttcaatcaagaaaggattgtcgatgtcgcaggccaggagggttggaaatgaccagacatgctcgtgattggaaatttcggtctgtcatgggaccaacagggtgactcagatggctctgtgggcaatcatggcagcaccactgttcatgagcaatgatttgcgacacatctcccctcaggcgaagcccttctgcaggataaggacgttatcgccattaaccaggacccgctcggtaagcaagggtagcagttgcgccaggagacaatttcgaggctcgggaacgacccctgtctggactcgcttggggcctagccgtaattaaccgacaagaaatcggcggaccgaggagctataccatagctgtcgcctccctcggcgggggctagcttgtaacccggcttgtttcataaccagctgctgccgtcaagaggaaactggggctttatgagtggacaagtcgggtgaagtctcatattaaccgacagggactgttctctccagctggaaaacacaatgcagatgagcctgaaggatctcttgtga (SEQ ID NO: 67)
<i>Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая 003</i>	atgcagctgaggaaccagaactacatctgggctgcgcgcttgcgcttcgcttcctggccctcgtttcctgggacatccctggggctagagcatttggacaatgggctggccaggacacctaactatgggctggctccactgggagcgctttatgtgtaacctcgactgccaaagaggagccagactcatgcatctctgagaagttgttcatggaaatggccgagcttatgggtctcagaggggtggaagacgccggataatgagtatctgtgcatcgacgattgctggatggcccccaacgcgattccgaaggccgcttgcaggctgatccgcagcgctttcctcagggatccgccaattggcaaattacgtgcactcaaaagggctcaagttgggcatctacgcagacgtgggaaacaagacatgtgctggatttcccgggagtttcgggtattatgacattgacgcacagacctttgctgattgggggtcgacctcctgaagtttgacgggtgttatttgcgacagccttgaaaatctggccgacgggtacaacacatgtcccttgcactgaatagaactggctcgggtccatcgtctatagttgtgagtggccgctttacatgtggccttttcagaaacccaactacaccgagattcggcaatattgcaatcactggcgaatttcgcagataatcgatgattcttgggctagtattaaatccatcctggattggacatcattcaaccaggagcgcacgtggacggttgctggacctggcgggtggaatgatccagacatgcttgtgatcggaaacttcgggtctctcttggaaaccagcaagtcactcaaatggcactctgggaattatggccgccccctctttatgtccaacgatctgaggcatatcagtcctcaggctaagccctgctgcaagacaaggatgtgatgtatcaaccaagatccccttggtaaacaggggtaccagttgcgcaaggcgacaattttgagggtgtgggaaaggccactttcaggcgatgcatgggcccgttgcaatgatcaacaggcaagaaattggcggaccaggagctatacaataaccagtgccgtcactgggtaaggagtcgctgtaaccccgcatgcttcattactcaacttctgccagtgaaacgaaaactcggattctatgagtggacctcaagactgaggtctcatattaaccgacagggactgttctcctccagctggaaaacacaatgcagatgagcctgaaggatctcttgtga (SEQ ID NO: 68)

<p><i>Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая 004</i></p>	<p>atgcagctgaggaaccagaaactacatctgggctgcgcgcttgcgcttcgcttc ctggccctcgtttcctgggacatccctggggctagagcattggacaatgggctg gccaggacacctactatgggctggctccactgggagcgctttatgtgtaacctc gactgccaaagaggagccagactcatgcatctctgagaagttgttcagggagatg gctgaacgcatgggttctgagggatggaaagatgcaggctacgagtacctgtgt atagacgattggttggatggccccacagcgggattcagaaggtagactccaggcg gatccccagagattcccacatggaatcagacagctggccaattacgtccattcc aaaggccttaagttgggtatctacgcccagctaggcaacaagacttgtgcccga tttcccggcagtttcggatactatgacattgatgacagactttcgtgactgg ggggtggacttgctcaaatttgatggctgttattgcatagcctcgaaaatctg gctgatggctacaagcacatgtcactcgtctcaaccgactggcgctctata gtttactcctgcgagtggcctctgtatatgtggccgttcagaaaccaattac acagaaataaggcagatttgcaatcactggcgcaactttgctgatattgatgat tcctgggctccataaagagtatcttggactggactagtcgcaatcaggaaaga attgtcgacgctcggcggaccaggcggatggaatgatcctgatatgctcgtgatc gggaacttcggactctcatgggaccagcaggtgaccagatggctagtgggct atcatggccgcccctctgtttatgagtaacgacctccgccacatcagccccag gccaaggcgcttctgcaggataaagatgtcatcgccatcaaccaagatcccctg ggcaacaaggctatcagctgcggaaggagacaattttgagggtgtgggaacgc cctttgagcggagacgcctgggctgtggctattataaatcgccaggagattggg ggcccgagaagttatactatcccctgtgcaagcctgggaaaggcgctcgcctgc aacctgctgcttcatcacacagctgcttctgtcaaacgccaattgggggttc tacaattggacatccagactcaaattctatattaaccgacagggactgttctc ctccagctggaaaacacaatgcagatgagcctgaaggatctcttgtga (SEQ ID NO: 69)</p>
<p><i>Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая 005</i></p>	<p>atgcagctgaggaaccagaaactacatctgggctgcgcgcttgcgcttcgcttc ctggccctcgtttcctgggacatccctggggctagagcattggacaatgggctg gccaggacacctactatgggctggctccactgggagcgctttatgtgtaacctc gactgccaaagaggagccagactcatgcatctctgagaagttgttcagggagatg gcagaacgaatgggtgacagatggatggaaaggacgctggctacgagtatctgtgc atagatgattggttggatggccccctcagcagactcagaggggagactccaggcc gacccccagcgatttccacacggaatccggcaactggctaaccatgtgactca aaagggtcaagctgggaatttatgctgacgctcgggaacaaaacttgtgcgggg tttcccggctccttcggatattacgacatcgacgcccagactttcgcagactgg ggtgtggacctgcttaagttcgacggctgttactgcatagctctggaaaacttg gctgacggctataagcacatgagtctcgcctgaaccgaacaggcagaagcata gtctactcctgccaatggccactttacatgtggccattccagaaacctaatat accgagatcagacaataactgtaaccattggcgaaacttcgccgacattgacgat agttggaagtcaatcaagtccatcctggattggacctctaggaaccaggaaagg atcgtggacgctggctggacctggcggatggaacgatccagacatgctcgtgata ggaaactttggactgtcatggaatcagcaagtaaacacagatggcgctctgggcc attatggctgcccccttgtttatgtctaacgacctgaggcatatctctcctcaa gccaaggcactcctgcaggacaaggacgttatcgccatcaaccaggaccactg ggcaagcagggataccagctgcggaaggatgataacttcgaggtctgggagcga ccgctttcaggagacgcctgggcagttgcaatcatcaacaggcaagaaattggg gggccacggtcttatactattcccgtggcttctctcggtaagggcgctcgcctgc aaccccgctgctttatcacccaattgttgccgtaagagaaaactgggattt tacgagtggacatccaggctgcggtctcatattaaccgacagggactgttctc ctccagctggaaaacacaatgcagatgagcctgaaggatctcttgtga (SEQ ID NO: 70)</p>
<p><i>Последовательность</i></p>	<p>atgcagctgaggaaccagaaactacatctgggctgcgcgcttgcgcttcgcttc ctggccctcgtttcctgggacatccctggggctagagcattggacaatgggctg gccaggacacctactatgggctggctccactgggagcgctttatgtgtaacctc</p>

<p><i>нуклеиновой кислоты, кодирующая 006</i></p>	<p>gactgccaaagaggagccagactcatgcatctctgagaagttggttcgaagagatg gctgaactgatgggtgtccgaggggtggaaggatgcagggtagcaggtacaccttgc atagacgattgctggatggcaccacagcgggatagtgagggcaggttgcagggc gacccccaaagatttccacatggcatcagacagctggccaaccacgtgcaactct aaaggcctgaagctggggatttacgccgatgtcggtaataaaaacatgtgctggg ttccccggtagctttggatactacgacatcgacgccagacatttggctgattgg ggagtggacctgctcaagttcgacggctgctactgcgattctctggaaaatctg gccgatgggtataagcacatgagtccttgcctttaatagaaccggacgctctata gtctattcatgtgagtgggcactgtacatgtggccatttcagaaacccaactat accgaaattagacagatttgaaccactggcgggaatttcgccgacatagacgat agctggaagagcatcaagtcaattctcgattggacttcattcaaccaggagcgg atcgtcgacgtggccggccctgggggctggaatgatccagatatgctggtgatc ggaaactttggctctctcctggaatcaacaggtcactcagatggccctctggggc attatggcagcaccactctttatgagcaacgacctgagacacatttccccacag gccaaggcattgctgcaggacaaagacgtgatcgccattaaccaggaccactg ggcaagcaagggtaccaacttaggcaggagataattttgaggtctgggagcgc ccactcagcggagacgcctgggcccgttgccatgataaacagacaggagattggc ggccccagatcctacacaattcctgtcgttagcctgggcaagggggtggcttgt aatcccgcctgctttataaccagctgctgccagtgaaacggaaactcgggttc tatgaatggacttctaggctcaggtctcatattaaccgcagaggactgttctc ctccagctggaaaacacaatgcagatgagcctgaaggatctcttgtga (SEQ ID NO: 71)</p>
<p><i>Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая 007</i></p>	<p>atgcagctgaggaaccagaactacatctgggctgcgcgcttgcgcttcgcttc ctggccctcgtttctgggacatccctggggctagagcattggacaatgggctg gccaggacacctactatgggctggctccactgggagcgtttatgtgtaacctc gactgccaaagaggagccagactcatgcatctctgagaagttggttcgaggagatg gcagaacgaatgggtgacagatggatggaaggacgctggctacgagtatctgtgc atagatgattggtggatggcccctcagcagactcagaggggagactccaggcc gacccccagcgaatttccacacggaatccggcaactggctaaccatgtgcaactca aaagggtcaagctgggaatttatgctgacgtcgggaacaaaacttgtgctgggg tttccccggctccttcggatattacgacatcgacgccagactttcgcagactgg gggtgtggacctgcttaagttcgacggctgttactgcgatagtctggaaaacttg gctgacggctataagcacatgagtcctcgccctgaaccgaacaggcagaagcata gtctactcctgccaatggccactttacatgtggccattccagaaacctaatat accgagatcagacaataactgtaaccattggcgaaacttcgccgacattgacgat agttggaagtcaatcaagtccatcctggattggacctctaggaaccaggaaagg atcgtaggacgtggctggacctggcggatggaacgatccagacatgctcgtgata ggaaactttggactgtcatgggatcagcaagtaaacacagatggcgctctggggc attatggctgcccccttgtttatgtctaacgacctgaggcatatctctcctcaa gccaaggcactcctgcaggacaaggacgttatcgccatcaaccaggaccactg ggcaagcagggataccagctgcggaaaggatgataacttcgaggctctgggagcga ccgctttcaggagacgcctgggcagttgcaatcatcaacaggcaagaaattggg gggcccaggtcttatactattcccgtggcttctctcggttaagggcgtcgctgc aaccccgcctgctttatcacccaattgttgcccgttaagagaaaactgggattt tacgagggcagatccaggctgaagtctcatattaaccgcagaggactgttctc ctccagctggaaaacacaatgcagatgagcctgaaggatctcttgtga (SEQ ID NO: 72)</p>
<p><i>Последовательность нуклеиновой кислоты,</i></p>	<p>atgcagctgaggaaccagaactacatctgggctgcgcgcttgcgcttcgcttc ctggccctcgtttctgggacatccctggggctagagcattggacaatggattgg caaggacgcctaccatgggctggctgcactgggagcgttcatgtgcaaccttg actgccaggaagagccagattcctgcatcagtgagaagctcttcgaggagatgg cagagagaatggtcaccgacggctggaaggatgcaggttatgagtacctctgca ttgatgactgttggatggctccccaaagagattcagaaggcagacttcaggcag</p>

<p><i>кодирующая 008</i></p>	<p>accctcagcgctttcctcatgggattcggcagctagctaatacagttcacagca aaggactgaagctagggatttatgcagatggttgaaataaaacctgcgagggct tcctgggagtttggatactacgacattgatgccagacctttgctgactggg gagtagatctgctaaaatttgatggttggtactgtgacagtttgaaaatttg cagatgggttataagcacatgtccttggccctgaataggactggcagaagcattg tgtactcctgtgagtgccctctttatatgtggccctttcaaaagcccaattata cagaaatccgacagtaactgcaatcactggcgaaaattttgctgacattgatgatt cctgggccagtataaagagtatccttggactggacatctagaaaccaggagagaa ttggtgatggtgctggaccagggggttggaatgaccagatatgtagtgattg gcaactttggcctcagctgggaccagcaagtaactcagatggccctctgggcta tcatggctgctcctttattcatgtctaatacctccgacacatcagccctcaag ccaaagctctccttcaggataaggacgtaattgccatcaatcaggacccttgg gcaagcaaggtaccagcttagaaagggagacaactttgaagtgtgggaacgac ctctctcaggcgatgcctgggctgtagctatcataaacggcaggagattggtg gacctcgctcttataccatccccggttgcctccctgggtaaaggagtggcctgta atcctgctgcttcatcacacagctcctcctgtgaaaaggcagctagggttct ataactggacttcaaggttaaagagtacataaatcccacaggcactgttttgc ttcagctagaaaatacaatgcagatgtcattaaaagacttactttaa (SEQ ID NO: 73)</p>
<p><i>Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая 009</i></p>	<p>atgcagctgaggaaccagaaactacatctgggctgcgcgcttgcgcttcgcttc ctggccctcgtttcctgggacatccctggggctagagcatggacaatggattgg caaggacgcctCCCatgggctggctgactgggagcgcttcatgtgcaaccttg actgccaggaagagccagattcctgcatcagtgagaagctcttcgaggagatgg cagagagaatggtcaccgacggctggaaggatgcaggttatgagtacctctgca ttgatgactggtggatggctcccaagagattcagaaggcagacttcaggcag accctcagcgctttcctcatgggattcggcagctagctaatacagttcacagca aaggactgaagctagggatttatgcagatggttgaaataaaacctgcgagggct tcctgggagtttggatactacgacattgatgccagacctttgctgactggg gagtagatctgctaaaatttgatggttggtactgtgacagtttgaaaatttg cagatgggttataagcacatgtccttggccctgaataagactggcagaccattg tgtactcctgtgagtgccctctttatatgtggccctttcaaaagcccaattata cagaaatccgacagtaactgcaatcactggcgaaaattttgctgacattgatgatt cctgggccagtataaagagtatccttggactggacatctagaaaccaggagagaa ttggtgatggtgctggaccagggggttggaatgaccagatatgtagtgattg gcaactttggcctcagctgggaccagcaagtaactcagatggccctctgggcta tcatggctgctcctttattcatgtctaatacctccgacacatcagccctcaag ccaaagctctccttcaggataaggacgtaattgccatcaatcaggacccttgg gcaagcaaggtaccagcttagaaagggagacaactttgaagtgtgggaacgac ctctctcaggcgatgcctgggctgtagctatcataaacggcaggagattggtg gacctcgctcttataccatccccggttgcctccctgggtaaaggagtggcctgta atcctgctgcttcatcacacagctcctcctgtgaaaaggcagctagggttct ataactggacttcaaggttaaagagtacataaatcccacaggcactgttttgc ttcagctagaaaatacaatgcagatgtcattaaaagacttactttaa (SEQ ID NO: 74)</p>

[0133] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает вектор для генной терапии, содержащий последовательность GLA, имеющую 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более 99% идентичности с любой из SEQ ID NO: 18-29, 31, 32, 35-45 и 61-74. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит

охватывает вектор для генной терапии, содержащий нуклеиновую последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 60.

[0138] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7-17, 30, 33, 34 и 46-60; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0139] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO:7; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0140] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 8; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0141] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 9; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0142] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 10; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0143] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид

AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 11; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0144] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 12; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0145] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 13; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0146] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 14; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0147] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 15; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0148] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 16; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0149] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 17; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0150] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 30; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0151] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 33; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0152] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 34; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0153] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 46; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0154] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную

последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 47; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0155] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; с) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 48; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0156] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; с) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 49; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0157] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; с) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 50; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0158] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; с) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 51; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0159] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; с) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 52; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0160] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-

инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 53; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0161] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 54; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0162] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 55; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0163] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 56; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0164] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 57; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0165] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 58; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0166] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид

AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 59; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0167] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 60; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0168] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 7; д) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и ф) 3'-ITR.

[0169] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 8; д) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и ф) 3'-ITR.

[0170] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 9; д) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и ф) 3'-ITR.

[0171] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную

последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 10; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRES); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0172] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 11; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRES); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0173] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 12; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRES); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0174] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 13; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRES); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0175] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 14; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRES); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0176] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную

последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 15; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0177] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 16; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0178] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 17; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0179] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 30; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0180] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 33; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0181] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную

последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 34; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0182] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 46; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0183] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 47; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0184] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 48; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0185] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 49; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0186] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную

последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 50; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0187] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 51; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0188] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 52; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0189] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 53; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0190] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 54; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0191] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную

последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 55; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0192] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 56; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0193] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 57; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0194] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 58; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0195] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 59; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0196] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную

последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 60; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0197] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 7; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0198] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 8; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0199] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 9; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0200] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 1; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0201] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 11; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0202] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид

AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); с) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 12; d) поли А; и е) 3'-ITR.

[0203] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); с) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 13; d) поли А; и е) 3'-ITR.

[0204] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); с) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 14; d) поли А; и е) 3'-ITR.

[0205] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); с) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 14; d) поли А; и е) 3'-ITR.

[0206] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); с) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 15; d) поли А; и е) 3'-ITR.

[0207] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); с) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 16; d) поли А; и е) 3'-ITR.

[0208] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 17; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0209] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 30; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0210] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 33; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0211] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 34; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0212] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 46; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0213] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 47; д) поли А; и е) 3'-ITR.

нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 47; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0214] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 48; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0215] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 49; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0216] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 50; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0217] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 51; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0218] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 52; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0219] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный

для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); с) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 53; d) поли A; и е) 3'-ITR.

[0220] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); с) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 54; d) поли A; и е) 3'-ITR.

[0221] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); с) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 55; d) поли A; и е) 3'-ITR.

[0222] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); с) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 56; d) поли A; и е) 3'-ITR.

[0223] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); с) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 57; d) поли A; и е) 3'-ITR.

[0224] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); с) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 58; d) поли A; и е) 3'-ITR.

[0225] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид

AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 59; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0226] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 60; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0227] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO:7; д) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и ф) 3'-ITR.

[0228] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 8; д) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и ф) 3'-ITR.

[0229] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 9; д) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и ф) 3'-ITR.

[0230] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 10; д) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и ф) 3'-ITR.

нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 10; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPPE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0231] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 11; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPPE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0232] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 12; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPPE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0233] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 13; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPPE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0234] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 14; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPPE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0235] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c)

нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 15; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPPE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0236] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 16; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPPE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0237] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 17; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPPE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0238] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 30; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPPE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0239] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 33; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPPE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0240] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c)

нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 34; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPPE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0241] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 46; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPPE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0242] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 47; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPPE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0243] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 48; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPPE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0244] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 49; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPPE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0245] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c)

нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 50; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPPE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0246] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); с) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 51; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPPE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0247] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); с) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 52; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPPE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0248] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); с) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 53; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPPE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0249] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); с) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 54; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPPE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0250] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); с)

нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 55; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPPE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0251] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 56; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPPE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0252] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 57; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPPE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0253] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 58; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPPE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0254] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 59; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPPE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0255] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c)

нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 60; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0256] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; с) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 35; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0257] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; с) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 36; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0258] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; с) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 37; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0259] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; с) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 38; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0260] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; с) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 39; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0261] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; с) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 40; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0262] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид

AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 41; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0263] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 42; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0264] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 43; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0265] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 44; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0266] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 45; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0267] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO:35; д) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и ф) 3'-ITR.

[0268] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 36; д)

посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и f) 3'-ITR.

[0269] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 37; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и f) 3'-ITR.

[0270] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 38; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и f) 3'-ITR.

[0271] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 39; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и f) 3'-ITR.

[0272] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 40; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и f) 3'-ITR.

[0273] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 41; d)

посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и f) 3'-ITR.

[0274] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 42; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и f) 3'-ITR.

[0275] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 43; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и f) 3'-ITR.

[0276] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 44; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и f) 3'-ITR.

[0277] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 45; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и f) 3'-ITR.

[0278] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 35; d) поли А; и e) 3'-ITR.

[0279] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 36; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0280] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 37; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0281] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 38; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0282] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 39; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0283] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 40; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0284] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 41; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0285] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 42; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0286] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 43; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0287] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 44; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0288] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 45; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0289] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор; в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO:35; д) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и ф) 3'-ITR.

[0290] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор; в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 36; д) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и ф) 3'-ITR.

[0291] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор; в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 37; д) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и ф) 3'-ITR.

[0292] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид

AAV, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор; с) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 38; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и f) 3'-ITR.

[0293] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор; с) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 39; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и f) 3'-ITR.

[0294] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор; с) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 40; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и f) 3'-ITR.

[0295] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор; с) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 41; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и f) 3'-ITR.

[0296] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор; с) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 42; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и f) 3'-ITR.

[0297] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор; с) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 43; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и f) 3'-ITR.

[0298] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор; с) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 44; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и f) 3'-ITR.

[0299] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор; с) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 45; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и f) 3'-ITR.

[0300] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; с) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 14; d) поли А; и е) 3'-ITR.

[0301] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; с) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 10; d) поли А; и е) 3'-ITR.

[0302] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; с) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 64; d) поли А; и е) 3'-ITR.

[0303] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; с) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 69; d) поли А; и е) 3'-ITR.

[0304] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а)

5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 14; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0305] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 10; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0306] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 64; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0307] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL, содержащий SEQ ID NO: 69; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0308] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 14; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0309] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c)

нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 10; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0310] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 64; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0311] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); c) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 69; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0312] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, при этом указанный вектор содержит a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к печени или мышцам); c) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 14; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0313] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, при этом указанный вектор содержит a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к печени или мышцам); c) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 10; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0314] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, при этом указанный вектор содержит a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к печени или мышцам); c) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 64; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0315] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к печени или мышцам); в) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 69; д) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и ф) 3'-ITR.

[0316] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 35; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0317] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 36; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0318] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 37; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0319] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 38; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0320] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 39; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0321] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: а) 5'-

инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 40; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0322] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 41; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0323] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 42; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0324] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 43; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0325] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 44; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0326] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, где вектор содержит: a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 45; d) поли A; и e) 3'-ITR.

[0327] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) универсальный промотор; c) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 35; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0328] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 36; д) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и ф) 3'-ITR.

[0329] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 37; д) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и ф) 3'-ITR.

[0330] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 38; д) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и ф) 3'-ITR.

[0331] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 39; д) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и ф) 3'-ITR.

[0332] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 40; д) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и ф) 3'-ITR.

[0333] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 41; г) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0334] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 42; г) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0335] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 43; г) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0336] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 44; г) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0337] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) универсальный промотор; в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 45; г) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0338] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 35; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0339] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 36; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0340] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 37; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0341] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 37; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0342] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 38; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0343] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 39; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0344] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 40; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0345] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 41; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0346] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 42; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0347] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 43; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0348] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 44; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0349] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, где вектор содержит: а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор (например, обладающий тропизмом к мышцам или печени); в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 45; д) поли А; и е) 3'-ITR.

[0350] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор; в) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 35; д) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); е) поли А; и ф) 3'-ITR.

[0351] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); б) специфичный для ткани промотор; в) нуклеотидную последовательность, содержащую

SEQ ID NO: 36; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0352] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор; c) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 37; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0353] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор; c) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 38; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0354] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор; c) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 39; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0355] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор; c) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 40; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0356] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор; c) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 41; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0357] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, при этом указанный вектор содержит а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR);

b) специфичный для ткани промотор; c) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 42; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0358] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, при этом указанный вектор содержит a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор; c) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 43; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0359] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, при этом указанный вектор содержит a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор; c) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 44; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0360] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, при этом указанный вектор содержит a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); b) специфичный для ткани промотор; c) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 45; d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); e) поли A; и f) 3'-ITR.

[0361] Трансгены, доставляемые вектором, могут быть введены в представляющую интерес клетку с использованием различных способов. Например, для доставки интересующего трансгена можно использовать как вирусные, так и невирусные векторы. Предложенные способы предполагают как вирусные, так и невирусные способы доставки вектора. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления вектор, описанный в данном документе, доставляют в виде вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления вектор, описанный в данном документе, доставляют в виде невирусного вектора.

[0362] Описанный в данном документе вектор можно вводить в клетку как часть молекулы вирусного или невирусного вектора, имеющей дополнительные последовательности, такие как, например, точки начала репликации, промотор и один или несколько генов. В некоторых вариантах осуществления векторы могут быть введены в виде «голых» нуклеиновых кислот, в виде комплекса нуклеиновой кислоты с агентом, таким как липосома или полксамер, или могут быть доставлены вирусами (например,

аденовирусом, аденоассоциированным вирусом (AAV), вирусом герпеса, ретровирусом, лентивирусом и дефектным по интегразе лентивирусом (IDLV). В некоторых вариантах осуществления вектор вводят с помощью вирусного вектора.

[0363] В данной области техники известны различные вирусные векторы, и они включают, например, либо интегрирующиеся, либо неинтегрирующиеся векторы. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой неинтегрирующийся вирусный вектор. Неинтегрирующиеся вирусные векторы включают, например, неинтегрирующиеся лентивирусные векторы или векторы AAV. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой аденоассоциированный вирусный (AAV) вектор.

[0364] В некоторых вариантах осуществления вектор AAV модифицирован в одной или нескольких областях, таких как капсид AAV. В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV представляет собой вектор гAAV9.

[0365] В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV, описанный в данном документе, содержит один или несколько из: (a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); (b) последовательность универсального промотора; (c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL дикого типа или его вариант; (d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE), (e) поли А; и (f) последовательность 3'-ITR.

[0366] В различных вариантах осуществления вектор гAAV, описанный в данном документе для доставки трангена (например, гена, кодирующего белок альфа-галактозидазы (α -GAL)) может быть упакован с использованием методов, известных в данной области техники, и как описано в данном документе. Например, в некоторых вариантах осуществления для упаковки гAAV используют упаковывающие клетки для образования вирусных частиц, способных инфицировать клетку-хозяина. Такие клетки включают, например, клетки HEK293, HeLa, HEK293T, Sf9 или клетки A549, которые используют для упаковки аденовируса. Вирусные векторы, применяемые в генной терапии, обычно генерируются линией клеток-производителей, которые упаковывают вектор нуклеиновой кислоты в вирусную частицу. Векторы обычно содержат минимальные вирусные последовательности, необходимые для упаковки и последующей интеграции в организм хозяина, другие вирусные последовательности заменяются кассетой экспрессии, кодирующей белок, который должен быть экспрессирован. В этом случае экспрессируемым белком является α -GAL либо дикого типа, либо модифицированный α -GAL. Отсутствующие вирусные функции могут быть обеспечены транс-клеточной линией упаковывающих клеток. Например, векторы AAV, применяемые в генной терапии, обычно

содержат только последовательности инвертированных концевых повторов (ITR) из генома AAV, которые необходимы для упаковки и интеграции в геном хозяина. Вирусная ДНК упакована в клеточную линию, которая содержит вспомогательную плазмиду, кодирующую другие гены AAV, а именно гер и сар, но не содержащую последовательностей ITR. Клеточная линия также инфицируется аденовирусом в качестве помощника (хелпера). Хелперный вирус способствует репликации вектора AAV и экспрессии генов AAV из хелперной плазмиды. Хелперная плазида не упакована в значительных количествах из-за отсутствия последовательностей ITR. Контаминацию аденовирусом можно снизить, например, с помощью тепловой обработки, к которой аденовирус более чувствителен, чем AAV.

[0367] Во многих применениях генной терапии желательно, чтобы вектор генной терапии доставлялся со специфичностью к конкретному типу ткани. Предыдущие подходы генной терапии для лечения болезни Фабри имели ограниченный успех из-за сниженного тропизма к тканям для векторов для генной терапии, которые использовались ранее. В отличие от ранее использовавшихся векторных конструкций, предложенная в данном документе векторная конструкция имеет широкое распределение в типах тканей и клеток после введения субъекту, нуждающемуся в этом. Описанные в данном документе векторы гAAV имеют широкое распространение в тканях, включая, например, сердце, печень, почки и желудочно-кишечный тракт.

[0368] В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV, который способен обеспечивать широкую экспрессию фермента α -GAL при введении нуждающемуся субъекту, содержит: (a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); (b) универсальный промотор, содержащий энхансер цитомегаловируса (ЦМВ), промотор куриного бета-актина и интрон кроличьего бета-глобина; (c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL; (d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE), имеющий мутацию mut6delATG; (e) поли А бычьего гормона роста (BGH); и (f) 3'-ITR.

[0369] Вектор гAAV, который способен обеспечивать широкую экспрессию фермента α -GAL при введении нуждающемуся субъекту, содержит: (a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); (b) универсальный промотор, содержащий энхансер цитомегаловируса (ЦМВ), промотор куриного бета-актина и интрон кроличьего бета-глобин; (c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL; (d) поли А бычьего гормона роста (BGH); и (e) 3'-ITR.

[0370] В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV, который способен обеспечивать широкую экспрессию фермента α -GAL, упакован в капсид AAV9, при этом

вектор гAAV содержит: (а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); (b) универсальный промотор, содержащий энхансер цитомегаловируса (ЦМВ), промотор куриного бета-актина и интрон кроличьего бета-глобин; (с) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL; (d) поли А бычьего гормона роста (BGH); (е) 3'-ITR.

[0371] В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV9 необязательно содержит посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE) (например, имеющий мутацию mut6delATG) между нуклеотидной последовательностью, кодирующей фермент α -GAL, и последовательностью полиА.

[0372] Типичные последовательности гAAV показаны в Таблице 2 ниже. В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV содержит векторный элемент гAAV, содержащий нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности с последовательностью векторного элемента, показанной в таблице ниже. В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV содержит нуклеотидную последовательность векторного элемента, идентичную нуклеотидной последовательности векторного элемента, показанной в таблице ниже.

Таблица 2: Примерные последовательности векторного компонента

<i>5'-ITR</i>
Ctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaagcccgggcgctcgggcgacctttggtcgcggcctcagtgagcgcgagcgcgagagggagtgccaaactccatcactaggggttcct (SEQ ID NO: 1)
<i>Промотор куриного бета-актина (CB)</i>
gatcttcaatattggccattagccatattattcattggttatatagcataaatcaatattggctattggccattgcatacgttgatctatatcataaatgtacatttatattggctcatgtccaatatgaccgccatggttgccattgattattgactagttattaatagtaaatcaattacgggggtcattagttcatagccataatgaggttccgcggtacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagatatttacggtaaacactgccacttggcagta catcaagtgtatcatatgccaaagtcggccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccggctggcattatgcccagtacatgaccttacgggactttcctacttggcagtacatctacgtatta gtcatcgctattaccatggtcgaggtgagccccacggtctgcttcaactctccccatctccccccctccccaccccccaattttgatatttatttattttttaattattttgtgcagcgatgggggcg gggggggggggggggcgcgcgccaggcggggcgggcgggcgagggggcggggagggggcgaggcggagaggtgscggcggcagccaatcagagcggcgcgctccgaaagtttcttttatggcgaggcggcggcggcggccctataaaaagcgaagcgcgcggcgggggagtcgctgacgctgccttcgccccgtgccccgctccgcccgcgctcgcgcccggcctctgactgaccgcttactcccacaggtgagcgggacggcccttctcctccgggctgtaattagcgcttgggtttaatgacggcttggttctttctgtggctgcgtgaaagccttgaggggctccgggagggccc tttgtgcggggggagcggctcggggggtgcgtgcgtgtgtgtgcgtggggagcgcggcgtgcggcccgcgctgcccggcggctgtgagcgtgcgggcgcggcggggctttgtgcgctccgcagtggtgcgcgaggggagcgcggccgggggctgccccgcggtgcggggggggctgagggggaacaaaggctgcgtgcgggggtgtgtgcgtgggggggtgagcagggggtgtgggcgcggcggctcgggctgtaacccccctgcacccccctccccgagttgctgagcagggccggccttcgggtg

cggggctccgtacggggcggtggcgcggggctcgccgtgcccgggggggggtggcggcaggtgg
gggtgccggggcgggggcggggcccgcctcgggcccggggagggctcgggggagggggcgcgggcggcc
cccggagcgccggcggtgtcagggcgcgggcgagcccgagccattgccttttatggtaatcgt
gcgagagggcgagggacttcctttgtcccaaatctgtgaggagccgaaatctgggagggcggc
gccgcaccccccttagcggggcgggggcgaaagcgggtgcccggcgaggaaaggaaatggggcg
gggagggccttcgtgctgcccgcggcgccggtcccttctccctctccagcctcggggctgtc
cgcggggggacggctgccttcgggggggacggggcgaggcggggttcggccttctggcgtgtga
ccggcggtctagagcctctgctaaccatgttcatgccttctcttttctacagctcctgg
gcaacgtgctggttattgtgctgtctcatcattttggcaaagaattcgatatca (SEQ ID
NO: 2)

hGLA1 ДТ

atgcagctgaggaaccagaactacatctgggctgcccgttgcgcttcgcttcctggccctc
gtttcctgggacatccctggggctagagcactggacaatggattggcaaggacgcctaccatg
ggctggctgcaactggagcgcttcatgtgcaaccttgactgccaggaagagccagattcctgc
atcagtgagaagctcttcatggagatggcagagctcatggcttcagaaggctggaaggatgca
ggttatgagtacctctgcattgatgactggttgatggctccccaaagagattcagaaggcaga
cttcaggcagaccctcagcgtttcctcatgggattcggcagctagctaattatggtcacagc
aaaggactgaagctagggatttatgcagatggttgaaataaaacctgcccagggcttcctggg
agttttggatactacgacattgatgccagacctttgctgactggggagtagatctgctaaaa
tttgatggttggtactgtgacagtttgaaaatttgccagatggttataagcacatgtccttg
gccctgaataggactggcagaagcattgtgtactcctgtgagtggcctctttatatgtggccc
tttcaaaagcccaattatacagaatccgacagtactgcaatcactggcgaaattttgctgac
attgatgattcctggaaaagtataaagagatcttggactggacatcttttaaccaggagaga
attggtgatggtgctggaccaggggggtggaatgaccagatagttagtgattggcaacttt
ggcctcagctggaatcagcaagtaactcagatggccctctgggctatcatggctgctccttta
ttcatgtctaatagacctccgacacatcagccctcaagccaaagctctccttcaggataaggac
gtaattgccatcaatcaggacccttgggcaagcaagggtaccagcttagacagggagacaac
tttgaagtgtgggaacgacctctctcaggcttagcctgggctgtagctatgataaaccggcag
gagattggtggacctcgtctttataccatcgcagttgcttccctgggtaaaggagtggcctgt
aatcctgctgcttcatcacacagctcctcctgtgaaaaggaagctaggggtctatgaatgg
acttcaagggttaagaagtacataaatcccacaggcactggtttgcttcagctagaaaataca
atgcagatgtcattaaaagacttactttaa (SEQ ID NO: 3)

WPREmut6delATG

Aatcaacctctggattacaaaatttgtaagattgactgggtattcttaactttgttgctcct
tttacgctttgtggatacgtgctttattgcctttgtatcttgctattgcttcccgtttggct
ttcattttctcctccttgataaatcctgggtgctgtctctttttgaggagtgtggcccgtt
gtcaggcaacgtggcggtgtgactgtgtttgctgacgcaacccccactgggtggggcatt
gccaccacctgtcagctcctttcgggactttcgcttccccctccctattgccacggcggaa
ctcatcggcgcctgccttgcccgtgctggacaggggctcggctgttggcactgacaattcc
gtgggtgtgtcggggaaatcatcgtcctttccttggctgctcgcctgtgttgccacctggatt
ctgcccgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccctcccgc
ggcctgctgcccgtctgcccctcttccgcgtcttcgccttcgccctcagacgagtcggatc
tcctttgggcccgcctccccgcatc (SEQ ID NO: 4)

сигнал полиденилирования бычьего гормона роста (bGH полиА)

Cctagagctcgtgatcagcctcgaactgtgccttctagttgcccagccatctgttggttgcccc
tccccgtgccttcttgaccctggaagggtgccactcccactgtcctttcctaataaaaatgag
gaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtgggggtggggcaggac
agcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggaa (SEQ ID NO: 5)

3'-ITR

```
Aggaacccttagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgagggcg  
ggcgaccaaaggtcgcccgacggcggtttgcccggcgccctcagtgagcgagcgagcgcg  
gcagaga (SEQ ID NO: 6)
```

[0373] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение охватывает вектор для генной терапии, содержащий модифицированную последовательность гена GLA. Такая модификация может быть сделана для улучшения характеристик экспрессии. Такие модификации могут включать, помимо прочего, вставку сайта начала трансляции (например, метионина), добавление последовательности Kozak, вставку сигнального пептида и/или оптимизацию кодонов. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления ген GLA модифицируют для включения вставки сайта начала трансляции. В некоторых вариантах осуществления ген GLA модифицируют для включения добавление последовательности Kozak. В некоторых вариантах осуществления ген GLA модифицируют для содержания сигнального пептида. В некоторых вариантах осуществления ген GLA является кодон-оптимизированным. В других вариантах осуществления ген GLA является сконструированным. В некоторых вариантах осуществления ген GLA является кодон-оптимизированным и сконструированным.

[0374] В некоторых вариантах осуществления вектор содержит ID-метку, например, спейсерную последовательность. Назначение ID-метки включает, например, возможность для специалиста в данной области техники идентифицировать вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE). В некоторых вариантах осуществления вектор содержит посттранскрипционный контрольный элемент вируса гепатита сурков (WPRE). В данной области техники известны различные оптимизированные или варианты формы WPRE, в том числе WPRE3, WPREmut6delATG и другие. Другие варианты формы WPRE включают, например, WPRE2, WPRE_wt (номер доступа GenBank № J04514); WPRE_wt (номер доступа GenBank № J02442) и WPREmut6. Элемент WPRE может содержать последовательность дикого типа или модифицированную последовательность элемента WPRE. Известны различные мутантные версии WPRE, включая, например, mut6delATG (SEQ ID NO: 4). В некоторых вариантах осуществления вектор содержит mut6delATG (SEQ ID NO: 4).

[0375] Описанный в данном документе вектор содержит одну или несколько последовательностей промотора. В некоторых вариантах осуществления последовательность промотора представляет собой последовательность универсального промотора. Можно использовать любую подходящую область промотора или

последовательность промотора при условии, что область промотора способствует экспрессии кодирующей последовательности в клетках млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления область промотора способствует экспрессии кодирующей последовательности, например, GLA, в клетках млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления промотор, контролирующей экспрессию трансгена GLA, представляет собой универсальный промотор. В некоторых вариантах осуществления универсальный промотор выбран из одного или нескольких промоторов GAPDH, мини-промотора EF1, промотора ЦМВ, промотора EF-1 α , промотора PGK, промотора UBC, промотора бета-глюкуронидазы LSE (GUSB) или универсального промотора элемента открытия хроматина (UCOE) и/или промотор куриного бета-актина. В некоторых вариантах осуществления универсальный промотор включает энхансер цитомегаловируса (ЦМВ), промотор куриного бета-актина и интрон кроличьего бета-глобина.

[0376] В некоторых вариантах осуществления вектор, описанный в данном документе, содержит одну или несколько последовательностей полиА. В некоторых вариантах осуществления полиА выбран из полиА гормона роста человека (hGHpA), синтетического полиА (SPA), позднего полиА вируса 40 обезьян (SV40pA) и полиА бычьего гормона роста (BGH).

[0377] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложена кассета экспрессии, содержащая полинуклеотидную последовательность, содержащую: (a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); (b) универсальный промотор, содержащий энхансер цитомегаловируса (ЦМВ), промотор куриного бета-актина и интрон кроличьего бета-глобина; (c) нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL; (d) необязательно посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE), содержащий мутацию mut6delATG; (e) поли А бычьего гормона роста (BGH); и (f) 3'-ITR. В некоторых вариантах осуществления элементы кассеты экспрессии, указанной выше, расположены в порядке от 5' до 3'. В различных вариантах осуществления один или несколько из (a)-(f) функционально связаны в порядке от 5' до 3'.

[0378] В некоторых вариантах осуществления вектор вводят в клетку. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления предложена клетка, содержащая вектор, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетка находится *in vitro*, *in situ* или *in vivo*. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления клетка, содержащая вектор, описанный в данном документе, находится *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления клетка, содержащая вектор, описанный в данном документе, находится *in situ*. В некоторых вариантах осуществления клетка, содержащая вектор, описанный в данном документе, находится *in vivo*.

Фармацевтические композиции

[0379] Примеры фармацевтических композиций, содержащих описанные в данном документе векторы, подробно описаны ниже.

[0380] Фармацевтически приемлемые носители частично определяются конкретной вводимой композицией, а также конкретным способом, применяемым для введения композиций. Соответственно, существует большое разнообразие подходящих составов фармацевтических композиций.

[0381] Составы для введения как *ex vivo*, так и *in vivo* включают суспензии в жидкости или эмульгированные жидкости. Активные ингредиенты часто смешивают с вспомогательными веществами, которые фармацевтически приемлемы и совместимы с активным ингредиентом. Пригодные вспомогательные вещества включают, например, воду, физиологический солевой раствор, декстрозу, глицерин, этанол и т.п. и их комбинации. Кроме того, композиции могут содержать незначительные количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, рН-буферные агенты, стабилизаторы или другие реагенты, повышающие эффективность фармацевтической композиции.

Способы лечения

[0382] Векторы по данному изобретению можно использовать для лечения субъекта, страдающего болезнью Фабри. Соответственно, векторы по данному изобретению можно использовать для лечения субъекта, страдающего болезнью Фабри, и, таким образом, для уменьшения одного или нескольких симптомов, связанных с болезнью. В некоторых вариантах осуществления векторы по данному изобретению можно использовать для лечения субъекта со сниженной экспрессией или без экспрессии α -GAL.

[0383] Неограничивающие примеры симптомов Фабри включают невропатическую боль, гипогидроз или ангидроз, непереносимость физической нагрузки, спазмы в животе, диарею, ангиокератому, вертициллез, шум в ушах, протеинурию, хроническую болезнь почек, артериальную гипертензию, коронарную недостаточность, нарушения АВ-проводимости, аритмии и клапанную недостаточность, левостороннюю недостаточность, гипертрофия желудочков, судороги и инсульт.

[0384] В некоторых вариантах осуществления векторы, предложенные в данном документе, применяют в качестве профилактического лечения субъекта, страдающего болезнью Фабри. Профилактическое лечение может быть назначено, например, субъекту, который еще не болен, но подвержен или иным образом подвергается риску определенного биологического состояния, включая болезнь Фабри (например, субъект может иметь

мутации, вызывающие болезнь Фабри, но не иметь симптомов, или статус мутаций, вызывающих болезнь Фабри, неизвестен). В некоторых вариантах осуществления терапевтическое лечение может быть назначено, например, субъекту, уже страдающему от болезни Фабри, для улучшения или стабилизации состояния субъекта (например, у пациента, у которого уже проявляются симптомы болезни Фабри).

[0385] В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV остается эписомальным после введения нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV не остается эписомальным после введения нуждающемуся в этом субъекту. Например, в некоторых вариантах осуществления вектор гAAV интегрируется в геном субъекта. Такая интеграция может быть достигнута, например, с помощью различных технологий редактирования генов, таких как нуклеазы цинковых пальцев (ZFN), нуклеазы на основе эффектора, подобного активатору транскрипции (TALENs), редактирование генома ARCUS и/или системы CRISPR-Cas.

[0386] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую вектор гAAV, описанный в данном документе, применяют для лечения нуждающихся в этом субъектов. Фармацевтическая композиция, содержащая вектор или частицу гAAV по изобретению, содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, разбавитель или носитель. Примеры подходящих фармацевтических носителей хорошо известны в данной области техники и включают забуференные фосфатом солевые растворы, воду, эмульсии, такие как эмульсии масло/вода, различные типы смачивающих агентов, стерильные растворы и т.п. Такие носители могут быть приготовлены обычными способами и введены субъекту в терапевтически эффективном количестве.

[0387] Вектор гAAV вводят нуждающемуся в этом субъекту подходящим способом. В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV вводят внутривенно, внутрибрюшинно, подкожно или внутрикожно. В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления внутрикожное введение включает введение с использованием «генной пушки» или библистической системы доставки частиц. В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV вводят с помощью невирусной липидной наночастицы. Например, композиция, содержащая вектор гAAV, может включать один или несколько разбавителей, буферов, липосом, липид, липидный комплекс. В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV содержится в микросфере или наночастице, такой как липидная наночастица.

[0388] В некоторых вариантах осуществления функциональный α -GAL обнаруживают в плазме или сыворотке субъекта через около 2-15 недель после введения

после введения вектора гAAV. В некоторых вариантах осуществления функциональный α -GAL обнаруживают в плазме или сыворотке субъекта по меньшей мере через 2 года после введения вектора гAAV. В некоторых вариантах осуществления функциональный α -GAL обнаруживают в плазме или сыворотке субъекта по меньшей мере через 3 года после введения вектора гAAV. В некоторых вариантах осуществления функциональный α -GAL обнаруживают в плазме или сыворотке субъекта по меньшей мере через 4 года после введения вектора гAAV. В некоторых вариантах осуществления функциональный α -GAL обнаруживают в плазме или сыворотке субъекта по меньшей мере через 5 лет после введения вектора гAAV. В некоторых вариантах осуществления функциональный α -GAL обнаруживают в плазме или сыворотке субъекта по меньшей мере через 6 лет после введения вектора гAAV. В некоторых вариантах осуществления функциональный α -GAL обнаруживают в плазме или сыворотке субъекта по меньшей мере через 7 лет после введения вектора гAAV. В некоторых вариантах осуществления функциональный α -GAL обнаруживают в плазме или сыворотке субъекта по меньшей мере через 8 лет после введения вектора гAAV. В некоторых вариантах осуществления функциональный α -GAL обнаруживают в плазме или сыворотке субъекта по меньшей мере через 9 лет после введения вектора гAAV. В некоторых вариантах осуществления функциональный α -GAL обнаруживают в плазме или сыворотке субъекта по меньшей мере через 10 лет после введения вектора гAAV. В некоторых вариантах осуществления функциональный α -GAL обнаруживают в плазме или сыворотке субъекта в течение оставшейся части жизни субъекта после введения вектора гAAV.

[0390] В некоторых вариантах осуществления введение гAAV, содержащего GLA, приводит к продукции активного α -GAL в той же степени, что и при внутривенном введении очищенного белка GLA. В некоторых вариантах осуществления введение гAAV, содержащего GLA, приводит к продукции большего количества активного α -GAL по сравнению с введением очищенного белка α -GAL, доставляемого внутривенно.

[0391] В некоторых вариантах осуществления введение гAAV, содержащего GLA, приводит к снижению уровня глоботриаозилцерамида (GB3) у субъекта. В некоторых вариантах осуществления введенный гAAV, содержащий GLA, снижает уровень GB3 у субъекта на около 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15% или на около 10% по сравнению с исходным уровнем GB3 субъекта до введения гAAV, содержащего GLA. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления введенный гAAV, содержащий GLA, снижает уровень GB3 у субъекта на около 95%. В некоторых вариантах осуществления введенный гAAV, содержащий GLA, снижает уровень

GB3 у субъекта на около 90%. В некоторых вариантах осуществления введенный гAAV, содержащий GLA, снижает уровень GB3 у субъекта на около 85%. В некоторых вариантах осуществления введенный гAAV, содержащий GLA, снижает уровень GB3 у субъекта на около 80%. В некоторых вариантах осуществления введенный гAAV, содержащий GLA, снижает уровень GB3 у субъекта на около 75%. В некоторых вариантах осуществления введенный гAAV, содержащий GLA, снижает уровень GB3 у субъекта на около 70%. В некоторых вариантах осуществления введенный гAAV, содержащий GLA, снижает уровень GB3 у субъекта на около 65%. В некоторых вариантах осуществления введенный гAAV, содержащий GLA, снижает уровень GB3 у субъекта на около 60%. В некоторых вариантах осуществления введенный гAAV, содержащий GLA, снижает уровень GB3 у субъекта на около 55%. В некоторых вариантах осуществления введенный гAAV, содержащий GLA, снижает уровень GB3 у субъекта на около 50%. В некоторых вариантах осуществления введенный гAAV, содержащий GLA, снижает уровень GB3 у субъекта на около 45%. В некоторых вариантах осуществления введенный гAAV, содержащий GLA, снижает уровень GB3 у субъекта на около 40%. В некоторых вариантах осуществления введенный гAAV, содержащий GLA, снижает уровень GB3 у субъекта на около 35%. В некоторых вариантах осуществления введенный гAAV, содержащий GLA, снижает уровень GB3 у субъекта на около 30%. В некоторых вариантах осуществления введенный гAAV, содержащий GLA, снижает уровень GB3 у субъекта на около 25%. В некоторых вариантах осуществления введенный гAAV, содержащий GLA, снижает уровень GB3 у субъекта на около 20%. В некоторых вариантах осуществления введенный гAAV, содержащий GLA, снижает уровень GB3 у субъекта на около 15%. В некоторых вариантах осуществления введенный гAAV, содержащий GLA, снижает уровень GB3 у субъекта на около 10%.

[0392] В некоторых вариантах осуществления введенный гAAV, содержащий GLA, снижает уровень GB3 у субъекта в течение по меньшей мере около 2 недель, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 12 месяцев, 1 года, 2 лет, 3 лет, 4 лет, 5 лет или более 5 лет.

[0393] В некоторых вариантах осуществления после введения вектора AAV субъекту уровни функционального α -GAL, обнаруживаемого в кровотоке, в около 2-100 раз или выше, чем в 10 раз, выше, чем в 20 раз, выше, чем в 30 раз, выше, чем в 40 раз, выше, чем в 50 раз, выше, чем в 60 раз, выше, чем в 70 раз, выше, чем в 80 раз, выше, чем в 90 раз, выше, чем в 95 раз, или в 100 раз и более превышают количество функционального α -GAL, обнаруживаемого у субъекта перед введением гAAV, содержащего трансген GLA.

активного α -GAL после введения в около 40 раза превышают терапевтический уровень для человека. В некоторых вариантах осуществления уровни активного α -GAL после введения в около 45 раза превышают терапевтический уровень для человека. В некоторых вариантах осуществления уровни активного α -GAL после введения в около 50 раза превышают терапевтический уровень для человека. В некоторых вариантах осуществления уровни активного α -GAL после введения в около 55 раза превышают терапевтический уровень для человека. В некоторых вариантах осуществления уровни активного α -GAL после введения в около 60 раза превышают терапевтический уровень для человека. В некоторых вариантах осуществления уровни активного α -GAL после введения в около 65 раза превышают терапевтический уровень для человека. В некоторых вариантах осуществления уровни активного α -GAL после введения в около 70 раза превышают терапевтический уровень для человека. В некоторых вариантах осуществления уровни активного α -GAL после введения в около 75 раза превышают терапевтический уровень для человека. В некоторых вариантах осуществления уровни активного α -GAL после введения в около 80 раза превышают терапевтический уровень для человека. В некоторых вариантах осуществления уровни активного α -GAL после введения в около 85 раза превышают терапевтический уровень для человека. В некоторых вариантах осуществления уровни активного α -GAL после введения в около 90 раза превышают терапевтический уровень для человека. В некоторых вариантах осуществления уровни активного α -GAL после введения в около 95 раза превышают терапевтический уровень для человека. В некоторых вариантах осуществления уровни активного α -GAL после введения в около 100 раза превышают терапевтический уровень для человека. В некоторых вариантах осуществления уровни активного α -GAL после введения в около 200 раза превышают терапевтический уровень для человека. В некоторых вариантах осуществления уровни активного α -GAL после введения в около 300 раза превышают терапевтический уровень для человека. В некоторых вариантах осуществления уровни активного α -GAL после введения в около 400 раза превышают терапевтический уровень для человека. В некоторых вариантах осуществления уровни активного α -GAL после введения в около 500 раз или более чем в 500 раз превышают терапевтический уровень для человека.

[0395] Таким образом, введение вектора гAAV, содержащего трансген GLA, приводит к устойчивой надежной экспрессии по сравнению с однократным введением очищенной α -GAL нуждающемуся субъекту.

[0396] В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV, содержащий трансген GLA, доставляют в виде однократной дозы на субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят минимальную эффективную дозу (МЭД). Используемый в данном документе термин МЭД относится к дозе вектора гAAV GLA, необходимой для достижения активности α -GAL, приводящей к снижению уровней GB3 у субъекта.

[0397] Титр вектора определяют на основании содержания ДНК в препарате вектора. В некоторых вариантах осуществления количественная ПЦР или оптимизированная количественная ПЦР используется для определения содержания ДНК в препаратах вектора гAAV GLA. В одном варианте осуществления доза составляет от около 1×10^{11} геномных копий (ГК)/кг массы тела до около 1×10^{13} ГК/кг, включая конечные точки.

[0398] Дозы для достижения терапевтического эффекта у субъекта, нуждающегося в этом, ниже, чем дозы, достигаемые при использовании других видов капсидов гAAV, таких как AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 и/или AAV8, которые включают специфичный для печени промотор. В некоторых вариантах осуществления вектор для генной терапии гAAV, экспрессирующий белок альфа-галактозидазы, как описано в данном документе, вводят субъекту в более низкой или эквивалентной дозе, используемой в случае вектора для генной терапии, который включает специфичный для печени промотор; однако неожиданно проявляет более высокое воздействие на сыворотку и ткани.

[0399] В некоторых вариантах осуществления композиции GLA с вектором гAAV могут быть составлены в лекарственные формы, содержащие количество дефектного по репликации вируса, которое находится в диапазоне от около $1,0 \times 10^9$ ГК до около $1,0 \times 10^{15}$ ГК. Используемый в данном документе термин «доза» может относиться к общей дозе, доставляемой субъекту в ходе лечения, или к количеству, доставляемому при однократном (или многократном) введении.

[0400] В некоторых вариантах осуществления доза достаточна для снижения уровня GB3 в плазме пациента на 25% или более. В некоторых вариантах осуществления гAAV, экспрессирующий α -GAL, вводят в комбинации с одним или несколькими видами терапии для лечения болезни Фабри.

Комбинированная терапия

[0401] Композиции и способы по данному изобретению также можно использовать в сочетании с другими известными в данной области техники средствами, которые применяют для лечения болезни Фабри или ее осложнений, включая, помимо прочего: ФЗТ

(например, агалсидаза бета), обезболивающие препараты (например, лидокаин, дифенилгидантоин, карбамазепин, габапентин, фенитоин, нейротропин, опиоиды); лечение диспепсии (например, метоклопрамид, блокаторы H-2), заменители витамина D и т. д., бета-блокаторы (метопролол, ацебутолол, бисопролол, атенолол, пропранолол и т. д.), антикоагулянтное лечение (гепарин, варфарин, апиксабан, ривароксабан).

[0402] Композиции и способы по изобретению также можно использовать в сочетании с другими формами лечения, включая, помимо прочего: физические вмешательства (например, диализ, трансплантацию почки); диетическое ограничение соли, потребление клетчатки, установку кардиостимулятора и трансплантацию сердца.

Получение вирусных векторов гAAV

[0403] В данной области техники известны способы создания и выделения вирусных векторов AAV, подходящих для доставки субъекту. *Смотрите*, например, патент США № US 7790449; патент США № US 7282199; WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689 и патент США № US 7588772 B2. В одной системе клеточную линию-продуцент временно трансфицируют конструкцией, которая кодирует трансген, фланкированный ITR, и конструкцией (-ями), которая (-ые) кодирует (-ют) гер и сар. Во второй системе пакующую линию клеток, которая стабильно поставляет гер и сар, временно трансфицируют конструкцией, которая кодирует трансген, фланкированный ITR. В каждой из этих систем вирионы AAV вырабатываются в ответ на инфекцию хелперным аденовирусом или вирусом герпеса, что требует отделения гAAV от примесного вируса. Совсем недавно были разработаны системы, которые не требуют заражения вспомогательным вирусом для восстановления AAV (например, аденовирусы E1, E2a, VA и E4 или вирусы герпеса UL5, UL8, UL52 и UL29 и полимеразы вируса герпеса), которые также поставляются транс-активной системой. В этих более новых системах хелперные функциональные элементы могут поставляться путем временной трансфекции клеток конструкциями, которые кодируют требуемые хелперные функции, или клетки могут быть искусственно сконструированы с возможностью стабильно содержать гены, кодирующие хелперные функции, экспрессию которых можно контролировать на транскрипционном или посттранскрипционном уровне.

[0404] В некоторых вариантах осуществления кассету экспрессии, фланкированную ITR, и гены гер/сар вводят в желаемую клетку или клеточную линию путем инфицирования векторами на основе бакуловируса.

[0405] В некоторых вариантах осуществления кассету экспрессии, фланкированную ITR, и гены *her/cap* вводят в клетки насекомых путем инфицирования векторами на основе бакуловируса. Обзоры этих систем продуцирования *см.*, в целом, например, в Zhang et al, 2009, «Adenovirus-Adeno-associated virus hybrid for large-scale recombinant Adeno-associated virus production», *Human Gene Therapy* 20:922–929, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки. Способы создания и использования этих и других систем продуцирования AAV также описаны в следующих патентах США, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки: 5,139,941; 5,741,683; 6,057, 152; 6,204,059; 6,268,213; 6,491,907; 6,660,514; 6,951,753; 7,094,604; 7,172,893; 7,201,898; 7,229,823 и 7,439,065. *См.*, в целом, например, Grieger & Samulski, 2005, «Adeno-associated virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications," *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* 99: 119-145; Buning et al, 2008, "Recent developments in Adeno-associated virus vector technology," *J. Gene Med* 10:717-733; и ссылки, приведенные ниже, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0406] Способы, используемые для конструирования вектора, как описано в данном документе, известны специалистам в области манипуляций с нуклеиновыми кислотами и включают генную инженерию, рекомбинантную инженерию и методы синтеза. *См.*, например, Green and Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012). Аналогичным образом, способы получения вирионов гAAV хорошо известны, и выбор подходящего способа не ограничивает настоящее изобретение. *См.*, например, K. Fisher et al, (1993) *J. Virol.*, 70:520–532 и патент США № US 5478745.

[0407] Многие плазмиды и другие клонирующие векторы и векторы экспрессии, которые могут использоваться в соответствии с настоящим изобретением, хорошо известны и легко доступны специалистам в данной области техники. Более того, специалисты в данной области техники смогут легко сконструировать любое количество других плазмид, пригодных для использования в настоящем изобретении. Свойства, конструкция и применение подобных плазмид, а также других векторов в настоящем изобретении будут очевидны специалистам в данной области техники из настоящего описания.

[0408] В одном варианте осуществления продуцирующая плаزمида представляет собой ту, которая описана в настоящем документе или описана в WO2012/158757, которая включена в настоящий документ посредством ссылки. Различные плазмиды известны в данной области техники для использования в производстве векторов гAAV и являются

полезными в данном документе. Продуцирующие плазмиды культивируются в клетках-хозяевах, которые экспрессируют сар- и/или гер-белки AAV. В клетках-хозяевах каждый геном гAAV сохраняют и упаковывают в капсидном белке или оболочечном белке для образования инфекционной вирусной частицы.

[0409] В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии гAAV, вектор (такой как вектор гAAV), вирус (такой как гAAV) продуцирующая плаزمида содержат последовательности инвертированного концевой повтора AAV, кодон-оптимизированную последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид α -GAL, и последовательности контроля экспрессии, которые направляют экспрессию кодируемых белков, присутствуют в клетке-хозяине. В других вариантах осуществления кассета экспрессии гAAV, вирус, вектор (такой как вектор гAAV), продуцирующая плазмида дополнительно содержат один или несколько интронов, последовательность Kozak, полиА, посттранскрипционные регуляторные элементы и другое. В одном варианте осуществления посттранскрипционный регуляторный элемент представляет собой посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WHP) (WPRE). В различных вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит сигнальный пептид выше трангена, который кодирует полипептид α -GAL. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид находится на N-конце полипептида α -GAL. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид находится на C-конце полипептида α -GAL.

[0410] В данной области техники известны различные способы получения и очистки векторов AAV. См., например, Mizukami, Hiroaki, et al. A Protocol for AAV vector production and purification; публикации патентов США № US 20070015238 и № US 20120322861. Например, плазмиды, содержащая интересующий ген, может быть объединена с одной или несколькими хелперными плазмидами, например, которые содержат ген гер (например, кодирующий Rep78, Rep68, Rep52 и Rep40) и ген сар (кодирующий VP1, VP2 и VP3, включая модифицированную область VP2, как описано в данном документе), и трансфицировали в рекомбинантные клетки таким образом, чтобы гAAV можно было упаковать и впоследствии очистить.

[0411] В некоторых вариантах осуществления упаковка осуществляется в хелперной клетке или клетке-продуценте, такой как клетка млекопитающего или клетка насекомого. Примеры клеток млекопитающих включают, помимо прочего, клетки HEK293, клетки COS, клетки HeLa, клетки ВНК или клетки CHO (см., например, ATCC® CRL-1573™, ATCC® CRL-1651™, ATCC® CRL-1650™, ATCC® CCL-2, ATCC® CCL-10™ или ATCC® CCL-

61™). Примеры клеток насекомых включают, помимо прочего, клетки Sf9 (см., например, ATCC® CRL-1711™). Хелперная клетка может содержать гены гер и/или сар, которые кодируют белок Рер и/или белки Сар для применения в способе, описанном в данном документе. В некоторых вариантах упаковку осуществляют in vitro.

[0412] В некоторых вариантах осуществления плазмиду, содержащую интересующий ген, комбинируют с одной или несколькими хелперными плазмидами, например, которые содержат ген гер первого серотипа и ген сар того же серотипа или другого серотипа, и трансфицируют в хелперные клетки таким образом, чтобы гAAV был упакован.

[0413] В некоторых вариантах осуществления одна или несколько хелперных плазмид включают первую хелперную плазмиду, содержащую ген гер и ген сар, и вторую хелперную плазмиду, содержащую один или несколько из следующих хелперных генов: ген Ela, ген Elb, ген E4, ген E2a и ген VA. Для ясности, хелперные гены — это гены, которые кодируют хелперные белки Ela, Elb, E4, E2a и VA. В некоторых вариантах осуществления ген сар модифицирован таким образом, что один или несколько белков VP1, VP2 и VP3 не экспрессируются. В некоторых вариантах осуществления ген сар модифицирован таким образом, что VP2 не экспрессируется. Способы осуществления таких модификаций известны в данной области техники (Lux et al. (2005), *J Virology*, 79: 11776-87).

[0414] Хелперные плазмиды и способы получения таких плазмид широко известны в данной области техники и обычно коммерчески доступны (см., например, pDF6, pRep, pDM, pDG, pDPlrs, pDP2rs, pDP3rs, pDP4rs, pDP5rs, pDP6rs, pDG(R484E/R585E) и плазмиды pDP8.ape от PlasmidFactory, Билефельд, Германия; другие продукты и услуги, доступные от Vector Biolabs, Филадельфия, Пенсильвания; Cellbiolabs, Сан-Диего, Калифорния; Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, и Addgene, Кембридж, Массачусетс; рххб ; Grimm et al. (1998), Novel Tools for Production and Purification of Recombinant Adeno associated Virus Vectors, *Human Gene Therapy*, Vol. 9, 2745-2760; Kem, A. et al. (2003), Identification of a Heparin-Binding Motif on Adeno- Associated Virus Type 2 Capsids, *Journal of Virology*, Vol. 77, 11072-11081.; Grimm et al. (2003), Helper Virus-Free, Optically Controllable, and Two-Plasmid-Based Production of Adeno-associated Virus Vectors of Serotypes 1 to 6, *Molecular Therapy*, Vol. 7, 839-850; Kronenberg et al. (2005).

ПРИМЕРЫ

[0415] Типичные отличительные признаки, задачи и преимущества данного изобретения становятся очевидными из последующих примеров. Однако следует

понимать, что примеры с указанием вариантов осуществления настоящего изобретения приведены только в качестве иллюстрации, а не ограничения. Различные изменения и модификации в пределах объема настоящего изобретения станут очевидными специалистам в данной области техники из примеров.

[0416] Данные в приведенных ниже Примерах были получены с трансгенами GLA, содержащими последовательность сигнального пептида SEQ ID NO: 77, которые кодируют ферменты α -GAL, содержащие последовательность сигнального пептида SEQ ID NO: 76.

Пример 1. Конструирование и очистка вирусных векторов для экспрессии фермента α -GAL

[0417] В этом Примере обобщается конструкция иллюстративных вирусных векторов, охватываемых данным изобретением.

[0418] Рекомбинантный аденоассоциированный вирус 9 (rAAV9) был разработан для экспрессии α -GAL человека или вариантов α -GAL дикого типа (например, аминокислотные последовательности, показанные в Таблице 1) под контролем универсального промотора в вирусном векторе. Элемент WPRE был связан с 3'-концом трансгена GLA дикого типа для увеличения экспрессии трансгена и улучшения стабильности мРНК. Хвост полиА бычьего гормона роста был присоединен к 3'-концу элемента WPRE. Конструкцию ДНК промотор-GLA-WPRE-BGHpA интегрировали между инвертированными концевыми повторами кольцевого плазмидного вектора. На Фиг. 1 показана примерная конструкция вектора rAAV9.

[0419] Векторы rAAV инкапсулировали с использованием инвертированных концевых повторов AAV2 и последовательностей гер с использованием способов, известных в данной области техники. Маточные растворы rAAV9 получали с использованием клеток НЕК-293Т методом тройной плазмидной котрансфекции без аденовируса и очищали с использованием ультрацентрифугирования с хлоридом цезия. Титры количества частиц вг определяли количественной ПЦР.

[0420] Очищенную суспензию вируса rAAV9 разбавляли в буфере для состава, состоящем из 1,5 мМ KH_2PO_4 (дигидрофосфат калия), 2,7 мМ KCl (хлорид калия), 8,1 мМ Na_2HPO_4 (гидрофосфат динатрия), 136,9 мМ NaCl (хлорид натрия) и 0,001% плуроник F-68. Нулевой вектор с капсидом rAAV9 (rAAV9-null) использовали в качестве контроля.

Пример 2. Стабильность α -GAL в сыворотке после введения rAAV9

[0421] Этот Пример показывает, что гAAV9-доставленный трансген GLA обеспечивал экспрессию белка α -GAL в сыворотке в течение по меньшей мере 12 недель после введения вектора мышам.

[0422] Сначала был получен и очищен вектор гAAV9, как описано в Примере 1 выше. Затем самцам мышей GLAko в возрасте 6-9 месяцев вводили очищенные векторы гAAV9, кодирующие α -GAL, внутривенно (в/в) в двух различных дозах, $2,5 \times 10^{11}$, $6,25 \times 10^{12}$ вг/кг, и наблюдали за мышами в течение 12 недель. Нулевой вектор гAAV9-null вводили группе мышей GLAko в дозе $6,25 \times 10^{12}$ вг/кг в качестве отрицательного контроля. Сыворотку собирали в различные моменты времени во время исследования, а также в конце 12-недельного периода. Некоторым животным вводили ФЗТ на основе α -GAL в дозе 1 мг/кг за 24 часа до умерщвления и отбора тканей для использования в качестве положительного контроля. Сыворотку собирали через 1 час после введения ФЗТ на основе α -GAL для регистрации уровней C_{\max} фермента в кровотоке.

[0423] Количество α -GAL в сыворотке измеряли с помощью ИФА. Вкратце, черный планшет MSD с высокой связывающей способностью (MSD, кат. № L15XB) покрывали поликлональным овечьим захватывающим антителом к α -GLA человека (R&D systems, кат. № AF6146) в 0,2 М карбонатно-бикарбонатном буфере (Thermoscientific, кат. № 28382) в течение ночи при 4°C. Затем покрытый планшет трижды промывали промывочным буфером, содержащим D'PBS и 0,05% Твин-20. Планшет блокировали блокирующим буфером (3% BSA в PBS) на 1 час, после чего добавляли образцы или стандарт очищенного белка α -GLA в буфере для разбавления (1% BSA в PBS). Связывание осуществляли в течение 1 часа при низкоскоростном встряхивании и трижды промывали промывочным буфером. Затем добавляли поликлональные кроличьи антитела к α -GLA человека (Novus Biologics, кат. № H00002717-D01P) в буфере для разбавления и инкубировали в течение 1 часа перед трехкратной промывкой промывочным буфером и добавлением детектирующего антитела, сульфо-метки козьего антикроличьего антитела (MSD, кат. № R32AB-1) в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшет считывали с использованием 1х буфера для считывания (MSD, кат. № R92TC-1) в системе MSD Sector Imager S600. Используя стандартную кривую, рассчитывали окончательные значения концентрации α -GAL. Концентрацию белка α -GAL в тканях нормализовали по концентрации общего белка, определенной с помощью анализа BCA. Ни одно из антител, используемых в этом анализе, не распознает мышинный белок α -GAL. Через 2 недели после введения вектора в сыворотке наблюдали быстрое повышение уровня α -GAL, достигающее значения, более чем в 4500 раз превышающего норму в аналогичной группе с высокой

дозой гAAV9-ДТ через 12 недель. Было замечено, что даже при самой низкой дозе гAAV9-ДТ приводил к устойчивому уровню фермента α -GAL в сыворотке, который был выше, чем C_{\max} положительного контроля ФЗТ на основе α -GAL (Фиг. 2).

[0424] Через 12 недель после введения несколько органов, включая печень, почки, сердце и ЖК-тракт, собирали для дальнейшей оценки. Для гистологической оценки выполняли фиксацию 10% NBF. Для физиологии ткани быстро замораживали и хранили при -80°C .

[0425] Дозозависимые устойчивые супрафизиологические уровни воздействия α -GAL наблюдали в периферических органах, включая печень (Фиг. 3А), почки (Фиг. 3В), сердце (Фиг. 3С) и ЖК-тракт (Фиг. 3D-3Е), что приводит к одновременному снижению накопления GB3 и lysoGb3 у этих животных (Фиг. 3F-3М). Кроме того, было замечено, что более высокая доза гAAV9-ДТ снижала уровни GB3 и lysoGb3 в сыворотке и почках более чем на 95% (Фиг. 3F, Фиг. 3H, Фиг. 3J, Фиг. 3L), а в печени и сердце на >99% (Фиг. 3G, Фиг. 3I, Фиг. 3K, Фиг. 3M). Точно так же уровни lysoGb3 во всех исследованных тканях были снижены на >99% после введения высоких доз гAAV9-ДТ. Напротив, как видно с Фиг. 3F-3M, у мышей, получавших белок α -GAL, наблюдали умеренное снижение уровня субстрата в сыворотке и печени, но не в почках и сердце.

[0426] В целом было отмечено, что лечение гAAV9-ДТ, кодирующим α -GAL, улучшало клиренс GB3 и lysoGb3 в различных тканях. Кроме того, экспрессию α -GAL поддерживали в течение как минимум 12 недель.

Пример 3. Эффект лечения гAAV9-ДТ мышей G3Stg/GLAko.

[0427] В этом Примере показаны эффекты гAAV9-ДТ *in vivo*, кодирующего экспрессию α -GAL, в различных тканях на мышинной модели с тяжелой формой болезни Фабри, которая имеет значительно более высокие уровни субстрата в различных тканях, чем у мышей GLAko. Данные этого Примера показали, что гAAV9-ДТ-доставленный трансген GLA снижает накопление GB3, связанное с болезнью Фабри.

[0428] Сначала был получен и очищен вектор гAAV9-ДТ, как описано в Примере 1 выше.

[0429] Затем мышей, нокаутированных по G3Stg/GLA, получали путем скрещивания мышей, нокаутированных по GLA, которые имеют фон C57BL/6, с мышами, трансгенными по GB3-синтазе. Исходные особи были куплены в лабораториях Jackson, а колонию для разведения содержали в Taconic Biosciences. У мышей с нокаутом G3Stg/GLA наблюдается значительное отложение субстратов GB3 во внутренних органах, что

приводит к тяжелым почечным, желудочно-кишечным и нейропатическим фенотипам, включая альбуминурию, сниженную осмолярность почек, задержку движения толстой кишки и потерю термочувствительности, что отражает несколько проявлений болезни Фабри (Taguchi et al., 2013). В этом эксперименте в качестве контроля дикого типа использовали мышей C57BL/6 (Charles River Laboratories). Животных содержали в контролируемой среде с циклом 12 часов темноты/12 часов света (свет включается в 7:00) с не более чем 4 мышами в клетке в вентилируемой системе стеллажей из клеток в Melior Discoveries и кормили стандартным кормом для грызунов и водой *без ограничений*.

[0430] Лечение гAAV9-ДТ увеличивало как уровни α -GAL, так и активность α -GAL в сыворотке устойчивым дозозависимым образом (**Фиг. 4А**). При самой высокой дозе $6,24 \times 10^{12}$ вг/кг активность α -GAL в сыворотке была в 10 000 раз выше, чем активность α -GAL ДТ в сыворотке. Дозозависимое повышение уровней и активности α -GAL в тканях наблюдали во всех исследованных тканях, включая печень (**Фиг. 4В**), почку (**Фиг. 4С**), сердце (**Фиг. 4D**), желудочно-кишечный тракт (двенадцатиперстная кишка **Фиг. 4Е** и толстая кишка **Фиг. 4F**) и мозг (**Фиг. 4G**).

[0431] Затем с помощью масс-спектрометрии анализировали уровни GB3 у мышей с тяжелой формой болезни Фабри (G3Stg/GLAko), трансфицированных гAAV9-ДТ, кодирующим α -GAL. Вкратце, образцы субстрата сначала экстрагировали с использованием хлороформа:метанола (об./об. 2:1) и муравьиной кислоты перед прогонкой в ВЭЖХ и ЖХ-МС/МС (Applied Biosystem API5000, ионизация распылением Turbo Ion, режим положительных ионов). Было замечено, что уровни GB3 и lyso-Gb3 в различных тканях этих животных показали дозозависимое снижение уровней накопленного субстрата в каждой ткани (**Фиг. 5А-5L**).

[0432] Было замечено, что гAAV9-ДТ экспрессирует α -GAL у мышей с Фабри и снижает накопление GB3, связанное с Фабри.

Пример 4. Фенотипические эффекты гAAV9 на мышинной модели Фабри (мыши G3Stg/GLAko)

[0433] В этом Примере показаны фенотипические эффекты гAAV9-ДТ, кодирующего α -GAL, на мышях G3Stg/GLAko. Мыши с Фабри, получавшие гAAV9-ДТ, продемонстрировали общее улучшение массы тела с течением времени.

[0434] Сначала был получен и очищен вектор гAAV9-ДТ, как описано в Примере 1 выше.

[0435] Затем мышам G3Stg/GLAko, как описано в Примере 3, вводили гAAV9, кодирующий фермент α -GAL. Массу тела контролировали на протяжении всего исследования.

[0436] Мыши G3Stg/GLAko продемонстрировали заметное снижение массы тела в ходе исследования; мыши, получавшие гAAV9-ДТ, кодирующий фермент α -GAL, имели более высокую массу тела по сравнению с мышами, которым вводили нулевой вектор AAV (**Фиг. 6**). Мыши ДТ демонстрировали устойчивое увеличение массы тела в течение всего периода исследования, однако мыши G3Stg/GLAko, получавшие нулевой вектор, а также более низкие дозы гAAV9-ДТ, начали терять вес после 16-18-недельного возраста, так что животные в группе с нулевым вектором закончили исследование с более низкой массой тела, чем в начале исследования ($22,2 \pm 0,5$ на 28 неделе по сравнению с $27,0 \pm 0,6$ г/мышь в начале, $p < 0,0001$). Лечение самой высокой дозой гAAV9-ДТ показало значительно более низкую потерю веса при прекращении ($28,5 \pm 0,8$ г/мышь по сравнению с $22,2 \pm 0,5$ г/мышь при отсутствии AAV, $p < 0,01$). Таким образом, лечение высокой дозой гAAV9-ДТ предотвратило потерю веса, демонстрируя преимущества потенциальной генной терапии для общего состояния здоровья.

[0437] Результаты этого Примера продемонстрировали, что гAAV9-ДТ, кодирующий фермент α -GAL, можно использовать для достижения значительного улучшения при лечении симптомов болезни Фабри.

Пример 5. Восстановление дефектов функции почек на модели Фабри (мышь G3Stg/GLAko) с помощью гAAV9

[0438] В этом Примере исследовали влияние гAAV9-ДТ, кодирующего фермент α -GAL, на функцию почек у мышей G3Stg/GLAko.

[0439] Сначала был получен и очищен вектор гAAV9-ДТ, как описано в Примере 1 выше.

[0440] Затем мышам G3Stg/GLAko, как описано в Примере 3, вводили гAAV9. Функцию почек оценивали путем измерения таких маркеров, как азот мочевины крови, уровень альбумина в моче.

[0441] гAAV9-ДТ, кодирующий фермент α -GAL, приводил к значительному снижению уровня АМК в сыворотке у мышей, получавших самую высокую дозу генной терапии (**Фиг. 7А**). Было замечено, что уровни сывороточного альбумина у мышей с Фабри, получавших самую высокую дозу генной терапии (ГТ), были аналогичны таковым у мышей дикого типа (**Фиг. 7В**).

[0442] Этот Пример продемонстрировал, что гAAV9-ДТ, кодирующий фермент α -GAL, восстанавливает почечные фенотипы, связанные с болезнью Фабри. В частности, гAAV9-ДТ восстанавливал уровни АМК и альбумина в моче.

Пример 6. Восстановление невропатии, связанной с болезнью Фабри, на мышинной модели (мышь G3Stg/GLAko)

[0443] В этом Примере исследовали влияние гAAV9-ДТ, кодирующего фермент α -GAL, на маркеры невропатии в мышинной модели Фабри.

[0444] Сначала был получен и очищен вектор гAAV9-ДТ, как описано в Примере 1 выше.

[0445] Затем мышам G3Stg/GLAko, как описано в Примере 3, вводили гAAV9. Мыши G3Stg/GLAko проявляют несколько признаков невропатии, как это наблюдалось при гистологическом исследовании периферических нейронов после умерщвления. Подушечки задних лап и ганглий дорсальных корешков у этих животных собирали для анализа с помощью иммуногистохимии для оценки плотности нейронов мелких волокон для мониторинга любой патологии нейронов у этих животных. У животных, получавших самую высокую дозу ГТ, наблюдалось заметное уменьшение вакуолизации в нервах дорсальных корешков, восстановленное до уровня ДТ (**Фиг. 8А**). Наконец, также наблюдалось дозозависимое увеличение PGP9.5 (нейронный маркер) и MPZ (маркер миелиновых нервов) в лапах животных, получавших лечение (**Фиг. 8В и 8С**).

[0446] Этот Пример продемонстрировал, что фермент α -GLA, продуцируемый гAAV9-ДТ, связан с улучшением невропатии, что оценивали по экспрессии маркера на мышинной модели болезни Фабри.

Пример 7. Нормализованное нарушение регуляции аутофагии в мышинной модели болезни Фабри (мышь G3Stg/GLAko)

[0447] В этом Примере исследовали влияние гAAV9-ДТ, кодирующего фермент α -GAL, на нарушение регуляции аутофагии в мышинной модели Фабри.

[0448] Сообщалось о нарушении регуляции аутофагии у пациентов с Фабри (Chevrier et al., Autophagy. 2010 Jul;6(5):589-99.), что может играть ключевую роль в невропатии Фабри. Белок p62 является классическим рецептором аутофагии, который накапливается в почках и фибробластах у пациентов с болезнью Фабри; аналогичное накопление наблюдалось у мышей G3Stg/GLAko в почках, сердце и гладких мышцах. Лечение гAAV9-ДТ полностью устраняло накопление p62 в почках и сердце при дозе $6,25 \times 10^{12}$ вг/кг (**Фиг. 9А-Фиг. 9F**).

[0449] Кроме того, хроническое воспаление у пациентов с болезнью Фабри способствует повреждению органов (Pinto et al., High Blood Press Cardiovasc Prev. 2020) и, вероятно, является причиной увеличения объема ГДК. Лечение мышей G3Stg/GLAko с помощью гAAV9-ДТ устраняет воспаление в ГДК, что было продемонстрировано снижением маркера макрофагов CD68 при гистологической оценке (Фиг. 9G-Фиг. 9I).

Пример 8. Подход универсальной трансдукции с использованием введения гAAV9 приводит к более высоким уровням α -GAL в кровотоке, более высокому воздействию α -GAL в целевых тканях и большему снижению субстрата по сравнению с подходом на основе гAAV8 в печени.

[0450] Этот Пример показывает, что трансген GLA, доставленный в гAAV9 с универсальным промотором, обеспечивал более высокую экспрессию белка α -GAL, чем GLA, доставленный в гAAV8 со специфичным для печени промотором, в сыворотке в течение по меньшей мере 12 недель.

[0451] Сначала получали и очищали гAAV9-ДТ и гAAV8-ДТ, кодирующие α -GAL, как описано в Примере 1 выше. Затем самцам мышей GLAko в возрасте 6-9 месяцев вводили очищенный гAAV9 или гAAV8 внутривенно (в/в) в дозе $2,5 \times 10^{11}$ вг/кг и наблюдали за мышами в течение 12 недель. Сыворотку собирали в различные моменты времени во время исследования, а также в конце 12-недельного периода. Некоторым животным вводили ФЗТ на основе α -GAL в дозе 1 мг/кг за 24 часа до умерщвления и отбора тканей для использования в качестве положительного контроля. Сыворотку собирали через 1 час после введения ФЗТ на основе α -GAL для регистрации уровней C_{\max} фермента в кровотоке.

[0452] Количество α -GAL в сыворотке измеряли с помощью ИФА, как описано в Примере 2. Было замечено, что гAAV9-ДТ приводил к более высокому устойчивому уровню фермента α -GAL в сыворотке, чем гAAV8-ДТ, и C_{\max} положительного контроля ФЗТ на основе α -GAL (Фиг. 11A).

[0453] Через 12 недель после введения почки собирали для дальнейшей оценки.

[0454] Значительно более высокие уровни воздействия α -GAL наблюдали в почках животных, получавших гAAV9-ДТ, по сравнению с гAAV8-ДТ или α -GAL (Фиг. 11B), что приводило к сопутствующему снижению накопления GB3 у этих животных (Фиг. 11C). Кроме того, было отмечено, что лечение гAAV9 снижало GB3 >86%, в то время как лечение гAAV8 снижало GB3 до 78%, в то время как лечение однократной дозой α -GAL в дозе 1 мг/кг не приводило к какому-либо снижению GB3 в почках.

[0455] Следовательно, в целом было замечено, что лечение гAAV9 с универсальным промотором, управляющим экспрессией GLA, снижало GB3 в почках более эффективно,

чем нацеленный на печень rAAV8, что приводило к более высокой устойчивой активности α -GAL в сыворотке в течение по меньшей мере 12 недель.

[0456] Не желая быть связанными какой-либо теорией, предполагается, что специфичный для печени промотор можно также использовать с трансгеном GLA, который иначе был модифицирован/кодон-оптимизирован для экспрессии фермента на повышенных уровнях.

Пример 9. Введение rAAV9 с универсальным промотором, управляющим экспрессией GLA, приводит к дозозависимому восстановлению функции почек, в то время как нацеленный на печень rAAV8, управляющий экспрессией GLA, улучшает функцию почек только при высокой дозе.

[0457] В этом Примере исследовали влияние rAAV9 и rAAV8 на функцию почек у мышей G3Stg/GLAko.

[0458] Сначала получали и очищали rAAV8 и rAAV9, как описано в Примере 1 выше.

[0459] Затем мышам G3Stg/GLAko, как описано в Примере 3, вводили rAAV8 и rAAV9. Животным дикого типа вводили носитель в качестве контроля. Функцию почек оценивали путем измерения азота мочевины крови.

[0460] Было замечено, что rAAV9-ДТ приводил к дозозависимому снижению уровня АМК в сыворотке, восстанавливая уровни, близкие к таковым у здоровых животных дикого типа, при самой высокой дозе $6,25 \times 10^{12}$ мкг/кг (**Фиг. 12А**). Лечение животных нацеленный на печень rAAV8-ДТ не привело к улучшению уровня АМК в сыворотке при дозе $2,5 \times 10^{11}$ вг/кг и показало ответ только при 25-кратно увеличенной дозе $6,25 \times 10^{12}$ вг/кг (**Фиг. 12В**).

[0461] Этот пример продемонстрировал, что rAAV9, управляющий экспрессией GLA через универсальный промотор, восстанавливает почечные фенотипы, связанные с болезнью Фабри, более эффективно, чем нацеленный на печень rAAV8.

Пример 10. Более высокое воздействие вариантов α -GAL по сравнению с α -GAL дикого типа в различных тканях после введения плазмид, экспрессирующих эти варианты, посредством гидродинамической инъекции в хвостовую вену.

[0462] Этот Пример демонстрирует стабильность в сыворотке и биораспределение в тканях различных вариантов α -GAL *in vivo*.

[0463] Плазмиды, экспрессирующие альфа-галактозидазу человека либо дикого типа, либо сконструированную (α - α -GAL), под управлением универсального промотора, исследовали на мышинной модели болезни Фабри. В первом исследовании были

протестированы следующие плазмиды: ДТ экспрессирует α -GAL дикого типа, тогда как А, В, С, D, Е, F экспрессируют сконструированные белки α -GAL. Во втором исследовании были протестированы следующие плазмиды: ДТ экспрессирует белок α -GAL дикого типа, в то время как 002, 003, 004, 005, 006 и 007 экспрессируют сконструированные варианты α -GAL.

[0464] В первом исследовании 12-14-недельным самцам мышей GLAko вводили по 50 мкг плазмидной ДНК каждому посредством гидродинамической доставки генов путем инъекции в хвостовую вену. В исследование была включена подгруппа, в которой мышам GLAko вводили только буфер в качестве отрицательного контроля. Другая подгруппа была включена в исследование, в котором животным ДТ вводили буфер. Животных умерщвляли через 2 дня после введения. Сыворотку собирали путем пункции в сердце в конечной временной точке, а ткани, такие как сердце и почки, собирали после перфузии PBS. Образцы быстро замораживали и хранили при температуре -80°C . Образцы сыворотки и ткани анализировали на активность α -GAL.

[0465] Во втором исследовании использовали самцов мышей в возрасте 10-12 недель. Использовали ту же схему исследования, что и в первом исследовании. В это исследование была включена дополнительная подгруппа, в которой мышам GLAko вводили рекомбинантный белок α -GAL человека в дозе 1 мг/кг в качестве положительного контроля.

[0466] Ткани гомогенизировали в буфере для лизиса, содержащем 10 мМ HEPES с 0,5% Тритон-Х 100 и смесью ингибиторов протеазы 1,5x Halt, без ЭДТА, центрифугировали и супернатант собирали для аналитических исследований. Активность альфа-галактозидазы в супернатанте или сыворотке измеряли с использованием флуоресцентного субстрата. Вкратце, 2 мкл биологических образцов инкубировали с 15 мкл раствора субстрата 4-MU-a-GLA (Research Products International Company, кат. № M65400) с ингибитором α -галактозидазы В (N-ацетил-D-галактозамин, Sigma кат. № A-2795) при 37°C в течение 60 минут. Ферментативную реакцию останавливают добавлением 200 мкл раствора карбоната глицина, pH 10,7. Продукт 4-MU измеряли при длине волны возбуждения 360 нм и длине волны испускания 465 нм с помощью флуоресцентного планшет-ридера. Концентрации 4-MU в исследуемых образцах рассчитывают по калибровочной кривой 4-MU на том же планшете. Активность в ткани нормализовали по концентрации общего белка, определяемой анализом BCA.

[0467] Было замечено, что в первом исследовании мыши, которым вводили плазмиды от А до F, имели значительно более высокие уровни активности α -GAL в кровотоке, а также в сердце и почках по сравнению с мышами ДТ (Фиг. 10А-Фиг. 10С).

Плазмида А экспрессирует белок α -GAL человека дикого типа, в то время как другие плазмиды экспрессируют варианты α -GAL, сконструированные для улучшения стабильности в сыворотке и поглощения тканями, что отражено в этих результатах. Плазмида D приводила к самой высокой активности α -GAL как в сыворотке, так и в тканях.

[0468] Во втором исследовании мыши, которым вводили плазмиды с 002 по 007 (экспрессирующие α - α -GAL), имели значительно более высокие уровни активности α -GAL в кровотоке, а также в сердце и почках по сравнению с мышами, получавшими 001 (экспрессирующие α -GAL ДТ) (**Фиг. 10D-Фиг. 10F**). В этом исследовании вариант 004 приводил к самой высокой активности α -GAL в сыворотке и ткани.

[0469] Этот Пример продемонстрировал, что плазмиды, содержащие различные варианты трансгенов α -GAL, экспрессируют ферменты со значительно более высокой стабильностью в сыворотке и биораспределением в тканях по сравнению с плазмидами, содержащими GLA дикого типа.

Пример 11. Сравнение векторов, экспрессирующих сконструированный α - α -GAL и α -GAL ДТ.

[0470] В этом примере исследовали ферментативную активность в сыворотке и тканях после введения вирусных векторов, кодирующих сконструированный α - α -GAL и α -GAL ДТ.

[0471] Сначала были получены 4 варианта вектора гAAV9 (описанных в данном документе как гAAV9-ДТ, гAAV9-А, гAAV9-005, гAAV9-D) и очищены, как описано в Примере 1 выше.

Исследование 1

[0472] В исследовании 1 12–13-недельным самцам мышей G3Stg/GLAko однократно вводили гAAV9-А, гAAV9-005, гAAV9-D и гAAV9-ДТ в 2х различных дозах $5,0 \times 10^{10}$ и $2,5 \times 10^{11}$ вг/кг, или нулевой вектор в качестве отрицательного контроля в дозе $2,5 \times 10^{11}$ вг/кг, и наблюдали в течение 4 недель после введения дозы. В **Таблице 3** показаны конкретные варианты α -GAL, используемые в каждом гAAV9. Мышей из одного потомства ДТ:ДТ с таким же генетическим фоном использовали в качестве контроля, и им вводили только носитель. Мыши были распределены в каждую группу исследуемого препарата в полурандомизированном процессе на основе массы тела до введения дозы для обеспечения сбалансированных групп. Сыворотку собирали во время исследования в несколько моментов времени. Кровь брали из ретроорбитальной или хвостовой вены во время исследования и через сердечную пункцию в конце исследования и обрабатывали для отбора

сыворотки. В конце исследования была собрана конечная сыворотка, а мышам была проведена перфузия для отбора органов, включая печень, почки и сердце, которые затем быстро заморозили в сухом льду и хранили при температуре -80 °С. Аналитические оценки включали измерение активности фермента α -GAL и анализ уровней субстрата в сыворотке и различных тканях.

Таблица 3: Краткое описание варианта вектора rAAV9 - α -GAL

Название вектора rAAV9	Вариант α - α - GAL	Белок содержит SEQ ID NO:	Нуклеиновая кислота содержит SEQ ID NO:
rAAV9-ДТ	ДИКИЙ ТИП	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 3
rAAV9-A	A	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 18
rAAV9-005	005	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 27
rAAV9-D	D	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 37
rAAV9-40	004	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 26
rAAV9-41	008	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 31
rAAV9-42	009	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 32

Альфа-галактозидазная активность:

[0473] Ткани гомогенизировали в буфере для лизиса, содержащем 10 мМ HEPES с 0,5% Тритон-Х 100 и смесью ингибиторов протеазы 1,5x Halt, без ЭДТА, центрифугировали и супернатант собирали для аналитических исследований. Активность альфа-галактозидазы в супернатанте или сыворотке измеряли с использованием флуоресцентного субстрата. Вкратце, 2 мкл биологических образцов инкубировали с 15 мкл раствора субстрата 4-MU-a-gal (Research Products International Company, кат. № M65400) с ингибитором α -галактозидазы В (N-ацетил-D-галактозамин, Sigma кат. № A-2795) при 37°C в течение 60 минут. Ферментативную реакцию останавливают добавлением 200 мкл стоп-раствора карбоната глицина, pH 10,7. Продукт 4-MU измеряют при длине волны возбуждения 360 нм и длине волны испускания 465 нм с помощью флуоресцентного планшет-ридера. Концентрации 4-MU в исследуемых образцах рассчитывают по калибровочной кривой 4-MU на том же планшете. Активность в ткани нормализуют по концентрации общего белка, определяемой анализом BCA (Thermo Scientific, кат. № 23225).

[0474] *Mus musculus*, нокаутированных по G3Stg/GLA, получали путем скрещивания мышей, нокаутированных по GLA, которые имеют фон C57BL/6, с мышами, трансгенными по GB3-синтазе. Исходные особи были куплены в лабораториях Jackson, а колонию для разведения содержали в Taconic Biosciences. Животных содержали в контролируемой среде

с циклом 12 часов темноты/12 часов света (свет включается в 7:00) с не более чем 4 мышами в клетке в вентилируемой системе стеллажей из клеток в Takeda или Melior Discoveries и кормили стандартным кормом для грызунов и водой без ограничений.

[0475] Однократное внутривенное введение rAAV9-A, rAAV9-005 и rAAV9-D в дозе либо $5,0 \times 10^{10}$ вг/кг, либо $2,5 \times 10^{11}$ вг/кг самцам мышей G3Stg/GLAko приводило к устойчивой более высокой активности α -GAL в сыворотке по сравнению с введением rAAV9-ДТ в течение 4 недель исследования.

Исследование 2

[0476] В исследовании 2 14–16-недельным самцам мышей G3Stg/GLAko однократно вводили rAAV9-40, rAAV9-41, rAAV9-42, rAAV9-ДТ или нулевой вектор в дозе $2,5 \times 10^{11}$ вг/кг, и наблюдали в течение 4 недель после введения дозы. В **Таблице 3** показаны конкретные варианты α -GAL, используемые в каждом rAAV9. Мышей из одного потомства ДТ:ДТ использовали в качестве контроля, и им вводили только носитель. Использовали ту же схему исследования, что и в предыдущем исследовании, в котором использовали мышей G3Stg/GLAko старшего возраста (14-16-недельные), однократная доза $2,5 \times 10^{11}$ вг/кг rAAV9-40, rAAV9-41 и rAAV9-42 также вызывала устойчивую активность α -GAL в сыворотке в течение 4 недель и на более высоком уровне, чем у животных, получавших rAAV9-ДТ.

[0477] На **Фиг. 13А-Фиг. 13В** показана активность α -галактозидазы каждого варианта в сыворотке. Было обнаружено, что активность α -GAL в сыворотке животных, получавших rAAV9-A, rAAV9-005 и rAAV9-D в дозе $2,5 \times 10^{11}$ вг/кг, была более чем в 16 000 раз, в 16 000 раз и в 46 000 раз, соответственно, выше нормальной активности α -GAL у мышей ДТ, измеренной у животных ДТ:ДТ, получавших носитель. Напротив, активность α -GAL в сыворотке после введения rAAV9-ДТ превышала норму чуть более чем в 1000 раз. Кроме того, повышенная активность α -GAL в тканях (почках, сердце и печени) также наблюдалась у животных, получавших rAAV9-A, rAAV9-005 и rAAV9-D, по сравнению с животными, получавшими rAAV9-ДТ в 2 разных дозах. На **Фиг. 13С-Фиг. 13Е** приведен краткий обзор активности α -галактозидазы каждого варианта в почках, сердце и печени.

[0478] На **Фиг. 14А** показана активность α -галактозидазы в сыворотке различных вариантов у мышей G3Stg/GLAko (14–16-недельных). Активность α -GAL в сыворотке в группе, получавшей rAAV9-40 и rAAV9-42, была более чем в 11 000 раз повышена по сравнению с контрольной группой ДТ:ДТ, получавшей носитель, и более чем в 6 600 раз повышена в группе, получавшей rAAV9-41, в то время как активность α -GAL в сыворотке у животных, получавших rAAV9-ДТ, была только в 780 раз выше контрольной группы

ДТ:ДТ. Все ткани, оцененные в группе, получавшей гAAV9-40, гAAV9-42 и гAAV9-41, также продемонстрировали более высокую активность α -GAL, чем у животных, получавших гAAV9-ДТ, за исключением активности в печени животных, получавших гAAV9-41, которая была ниже, чем у животных, получавших гAAV9-ДТ (Фиг. 14В-Фиг. 14D).

[0479] В Таблице 4 кратко описаны активности α -GAL в сыворотке и ткани для каждого варианта.

Таблица 4: Активность α -GAL в сыворотке и ткани через 4 недели после в/в введения вариантов по сравнению с нулевым контролем

Активность α -GAL в дозе $2,5 \times 10^{11}$ вг/кг																		
	ДТ:ДТ носитель			гAAV9-ДТ			гAAV9-A			гAAV9-005			гAAV9-D					
Сыворотка, Ткань	Акт. нмоль/ч/мл в сыворотке или мг Белка	С	О	Акт. нмоль/ч/мл в сыворотке или мг Белка	СО	С	Акт. нмоль/ч/мл в сыворотке или мг Белка	СО	С	Акт. нмоль/ч/мл в сыворотке или мг Белка	СО	С	Акт. нмоль/ч/мл в сыворотке или мг Белка	СО	С			
Сыворотка	11	2	6	423,9	247	6	76503	18281	6	24553	6758	6	23242	49	73	6		
Почка	13	0	6	19	10	6	2052	520	6	468	112	6	350	15	94	6		
Сердце	6	0	6	58	39	6	3951	892	6	799	188	6	758	8	15	6		
Печень	37	2	6	432	241	6	23923	5646	6	4367	1145	6	4623	81	2	6		
Активность α -GAL в дозе $5,0 \times 10^{10}$ вг/кг																		
	ДТ:ДТ носитель			гAAV9-null			гAAV9-ДТ			гAAV9-A			гAAV9-005			гAAV9-D		
Сыворотка, Ткань	Акт. нмоль/ч/мл в сыворотке или мг Белка	С	О	Акт. нмоль/ч/мл в сыворотке или мг Белка	СО	С	Акт. нмоль/ч/мл в сыворотке или мг Белка	СО	С	Акт. нмоль/ч/мл в сыворотке или мг Белка	СО	С	Акт. нмоль/ч/мл в сыворотке или мг Белка	СО	С	Акт. нмоль/ч/мл в сыворотке или мг Белка	СО	С
Сыворотка	11	2	6	1	1	5	11757	2914	5	484606	46941	5	162977	15844	5	160410	35695	5
Почка	13	0	6	2	1	5	410	71	5	9824	1822	5	5321	962	5	3100	788	5
Сердце	6	0	6	0	0	5	1439	343	5	22833	5065	5	10866	1499	5	7653	2700	5
Печень	37	2	6	3	1	5	16734	1687	5	86567	7160	5	43162	4175	5	34543	10554	5
Активность α -GAL в дозе $5,0 \times 10^{10}$ вг/кг при $2,5 \times 10^{11}$ вг/кг из Исследования 2																		
	ДТ:ДТ носитель			гAAV9-null			гAAV9-ДТ			гAAV9-A			гAAV9-005			гAAV9-D		

Сыворотка, Ткань	Актив. нмоль/ч/мл в сыворотке или мг Белка	С	О	Кол-во	Актив. нмоль/ч/мл в сыворотке или мг Белка	СО	С	Кол-во	Актив. нмоль/ч/мл в сыворотке или мг Белка	СО	С	Кол-во	Актив. нмоль/ч/мл в сыворотке или мг Белка	СО	С	Кол-во		
Сыворотка	23	1	8	0	0	7	17938	2629	7	253154	60153	8	151451	55459	7	309866	75811	7
Почка	1	0	8	0	0	7	613	87	7	4263	880	8	1968	589	7	5936	1052	7
Сердце	7	1	8	5	3	7	2270	423	7	7445	1392	8	5172	1964	7	19168	4040	7
Печень	42	2	8	5	1	7	60999	8904	7	142489	21338	8	29357	8232	7	93335	21958	7
Сыворотка	23	1	8	0	0	7	17938	2629	7	253154	60153	8	151451	55459	7	309866	75811	7

Пример 12. Сравнение снижения субстратов GB3 и lysoGb3 в вариантах

[0480] В этом Примере исследовали эффекты сконструированных вариантов α -GAL и α -GAL ДТ на снижение GB3 и lysoGb3.

Количественное определение субстрата GB3 и lysoGb3

[0481] Субстраты из образцов сыворотки и тканей анализировали методом ЖХ-МС. Образцы сначала экстрагировали с использованием хлороформа:метанола (об./об. 2:1) и муравьиной кислоты перед прогонкой в ВЭЖХ и ЖХ-МС/МС (Applied Biosystem API5000, ионизация распылением Turbo Ion, режим положительных ионов).

[0482] Было замечено, что при устойчиво высокой активности α -GAL в сыворотке и тканях субстраты как GB3, так и lysoGb3 были значительно снижены у мышей, получавших вирусные векторы, экспрессирующие α -GAL, по сравнению с rAAV9-нулевым контролем в обоих исследованиях. **На Фиг. 15A-15D** обобщены данные для GB3 в сыворотке и ткани через 4 недели после в/в введения rAAV9-A, rAAV9-005, rAAV9-D, rAAV9-ДТ, нулевого контроля в 2 различных дозах из Исследования 1 (описано в Примере 10). **На Фиг. 16A-16D** обобщены данные для lysoGb3 в сыворотке и ткани через 4 недели после в/в введения rAAV9-A, rAAV9-005, rAAV9-D, rAAV9-ДТ, нулевого контроля в 2 различных дозах из Исследования 1. **На Фиг. 17A-17D** обобщены данные для GB3 в сыворотке и ткани через 4 недели после в/в введения rAAV9-A, rAAV9-005, rAAV9-D, rAAV9-ДТ, нулевого контроля в 2 различных дозах из Исследования 2 (описано в Примере 10). **На Фиг. 18A-18D** обобщены данные для lysoGb3 в сыворотке и ткани через 4 недели после в/в введения rAAV9-A, rAAV9-005, rAAV9-D, rAAV9-ДТ, нулевого контроля в 2 различных дозах из

Исследования 2. В печени, где активность α -GAL была самой высокой после введения вирусных векторов, все вирусные векторы были одинаково эффективны в снижении субстрата до близкого к нулю уровня, после введения в дозе $2,5 \times 10^{11}$ вг/кг. В сердце и почках гAAV9-A, гAAV9-005, гAAV9-D, гAAV9-41 и гAAV9-42 были более эффективны, чем гAAV9-ДТ, в снижении GB3. Единственным исключением из этого правила были почки у животных, получавших гAAV9-41. В **Таблице 5** показаны субстраты GB3 и lysoGb3 в сыворотке и ткани через 4 недели после в/в введения гAAV9-A, гAAV9-005, гAAV9-D, гAAV9-ДТ, гAAV9-нулевого контроля в дозах $2,5 \times 10^{11}$ вг/кг и $5,0 \times 10^{10}$ вг/кг из Исследования 1. В **Таблице 6** показаны субстраты GB3 и lysoGb3 в сыворотке и ткани через 4 недели после в/в введения гAAV9-40, гAAV9-41, гAAV9-42, гAAV9-ДТ, гAAV9-нулевого контроля в дозе $2,5 \times 10^{11}$ вг/кг из исследования 2.

[0483] В **Таблице 7** показано сравнение снижения содержания субстрата GB3 в ткани в процентах в нулевой контрольной группе G3Stg/GLAko (гAAV9-null) через 4 недели после введения исследуемых препаратов гAAV9 из исследования 1 и исследования 2.

[0484] Снижение GB3 в сердце было на уровне или выше 86% у животных, получавших вирусные векторы, экспрессирующие сконструированный α -GAL (до 95% у животных, получавших гAAV9-42), по сравнению с животными, получавшими нулевой вектор. Напротив, GB3 снижался в сердце только на 70% и 58% у животных, получавших гAAV9-ДТ в исследованиях 1 и 2, соответственно. (**Таблица 7**). Накопление субстрата в этой мышинной модели происходит постепенно с возрастом. Поскольку в исследовании 2 использовали мыши старшего возраста, процент клиренса субстрата с помощью гAAV9-ДТ в этом исследовании был ниже, чем в исследовании 1. Снижение GB3 в почках после введения гAAV9-A, гAAV9-005 и гAAV9-D составило 96%, 95% и 93%, соответственно, по сравнению со снижением GB3 в почках на 74% у животных, получавших гAAV9-ДТ в исследовании 1 (**Таблица 7**). В исследовании 2 введение гAAV9-40, гAAV9-41 и гAAV9-42 снижало субстраты GB3 в почках на 86%, 51% и 86%, соответственно, по сравнению с животными, получавшими нулевой вектор, в то время как снижение у животных, получавших гAAV9-ДТ, составляло 79% (**Таблица 7**). При дозе вирусных векторов $2,5 \times 10^{11}$ вг/кг, экспрессирующих сконструированные варианты α -GAL, у мышей с симптомами Фабри уровни субстрата lysoGb3 были почти нормализованы к таковым у мышей ДТ:ДТ, получавших носитель (**Таблица 5** и **Таблица 6**).

Таблица 5 Субстраты GB3 и lysoGb3 в сыворотке и ткани через 4 недели после в/в введения из Исследования 1.

	ДТ:ДТ носитель	Контроль null	гAAV9-	гAAV9-22	гAAV9-A	гAAV9-005	гAAV9-D
--	----------------	---------------	--------	----------	---------	-----------	---------

Сыворотка, Ткань	Gb3 мкг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во	Gb3 мкг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во	Gb3 мкг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во	Gb3 мкг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во	Gb3 мкг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во	Gb3 мкг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во
Сыворотка	0,10	0,00	6	9,06	1,91	5	1,74	0,05	5	1,46	0,12	5	1,66	0,12	5	1,58	0,16	5
Почка	0,88	0,11	6	13,82	1,57	5	3,58	0,95	5	0,48	0,04	5	0,64	0,05	5	0,92	0,25	5
Сердце	0,00	0,00	6	36,38	2,59	5	15,20	1,10	5	2,42	0,17	5	4,84	0,84	5	2,82	0,40	5
Печень	0,00	0,00	6	18,46	1,47	5	0,10	0,00	5	0,14	0,02	5	0,12	0,02	5	0,12	0,02	5
Сыворотка, Ткань	Lyso Gb3 нг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во	Lyso Gb3 нг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во	Lyso Gb3 нг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во	Lyso Gb3 нг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во	Lyso Gb3 нг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во	Lyso Gb3 нг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во
Сыворотка	2,89	0,12	6	261,80	15,36	5	2,21	0,17	5	3,12	0,17	5	0,79	0,10	5	0,61	0,04	5
Почка	0,04	0,00	6	8,42	0,68	5	0,30	0,05	5	0,04	0,00	5	0,07	0,01	5	0,05	0,01	5
Сердце	0,00	0,00	6	19,49	2,05	5	4,80	0,63	5	0,05	0,01	5	0,71	0,30	5	0,12	0,04	5
Печень	0,08	0,00	6	66,27	3,00	5	0,57	0,05	5	0,09	0,00	5	0,15	0,02	5	0,12	0,00	5

Сыворотка, Ткань	ДТ:ДТ носитель			гAAV9-ДТ			гAAV9-A			гAAV9-005			гAAV9-D		
	Gb3 мкг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во	Gb3 мкг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во	Gb3 мкг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во	Gb3 мкг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во	Gb3 мкг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во
Сыворотка	0,10	0,00	6	5,08	0,79	5	1,58	0,07	5	2,08	0,20	5	1,85	0,18	5
Почка	0,88	0,11	6	9,17	1,35	5	1,40	0,33	5	1,93	0,42	5	1,17	0,10	5
Сердце	0,00	0,00	6	25,42	1,43	5	3,90	0,39	5	12,50	2,82	5	4,67	0,55	5
Печень	0,00	0,00	6	1,67	0,76	5	0,12	0,02	5	0,17	0,05	5	0,15	0,05	5
Сыворотка, Ткань	Lyso Gb3 нг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во	Lyso Gb3 нг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во	Lyso Gb3 нг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во	Lyso Gb3 нг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во	Lyso Gb3 нг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во
Сыворотка	2,89	0,12	6	29,13	10,39	5	0,66	0,02	5	1,76	0,83	5	1,01	0,41	5
Почка	0,04	0,00	6	3,70	0,88	5	0,07	0,01	5	0,27	0,11	5	0,10	0,01	5
Сердце	0,00	0,00	6	12,25	0,95	5	0,29	0,09	5	3,62	1,29	5	0,60	0,19	5
Печень	0,08	0,00	6	8,49	2,74	5	0,13	0,01	5	0,49	0,24	5	0,32	0,17	5

Таблица 6. Субстраты GB3 и lysoGb3 в сыворотке и ткани через 4 недели после в/в введения из Исследования 2.

	ДТ:ДТ носитель			rAAV9-null			rAAV9-ДТ			rAAV9-40			rAAV9-41			rAAV9-42		
	GB3 мкг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во	GB3 мкг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во	GB3 мкг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во	GB3 мкг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во	GB3 мкг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во	GB3 мкг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во
Сыворотка	0,1	0,0	6	9,9	0,7	7	1,4	0,1	7	1,0	0,1	8	1,5	0,1	7	1,0	0,1	7
Почка	2,3	0,5	6	17,0	1,2	7	3,5	0,6	7	2,5	0,6	8	8,4	2,3	7	2,4	0,4	7
Сердце	0,0	0,0	6	35,6	3,0	7	10,8	0,8	7	2,7	0,7	8	4,8	1,6	7	1,9	0,2	7
Печень	0,0	0,0	6	28,9	2,2	7	0,1	0,0	7	0,1	0,0	8	0,1	0,0	7	0,1	0,0	7
Сыворотка, Ткань	Lyso GB3 нг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во	Lyso GB3 нг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во	Lyso GB3 нг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во	Lyso GB3 нг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во	Lyso GB3 нг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во	Lyso GB3 нг/мл в сыворотке или мг Белка	СОС	Кол-во
Сыворотка	1,5	0,1	6	568,1	33,0	7	11,8	1,1	7	2,0	0,2	7	2,7	0,6	6	2,1	0,1	7
Почка	0,1	0,0	6	16,9	1,2	7	0,5	0,1	7	0,2	0,1	8	0,4	0,2	7	0,1	0,0	7
Сердце	0,0	0,0	6	29,9	2,5	7	6,4	0,8	7	1,0	0,8	8	1,7	1,1	7	0,2	0,0	7
Печень	0,1	0,0	6	115,4	8,2	7	0,3	0,0	7	0,2	0,1	8	0,2	0,1	7	0,1	0,0	7

Таблица 7. Сравнение снижения субстрата GB3 в ткани в процентах от нулевой контрольной группы G3Stg/GLAko (rAAV9-MY011) через 4 недели после введения исследуемых препаратов rAAV9 из 2х исследований (Исследование 1 и Исследование 2) в указанной дозе

Исследование 1				
Снижение %GB3 в ткани по сравнению с нулевой группой при дозе 2,5e11 вг/кг	rAAV9-ДТ	rAAV9-A	rAAV9-005	rAAV9-D
Почка	74%	96%	95%	93%
Сердце	58%	93%	86%	92%
Печень	99%	99%	99%	99%
Исследование 2				
	rAAV9-ДТ	rAAV9-40	rAAV9-41	rAAV9-42
Почка	79%	86%	51%	86%
Сердце	70%	92%	87%	95%
Печень	99,7%	99,7%	99,6%	99,6%

Пример 13. Оценка in vitro плазмид, экспрессирующих кодон-оптимизированные сконструированные варианты α-GAL.

[0485] В этом примере исследовали активность α-GAL различных кодон-оптимизированных вариантов α-GAL в двух разных клеточных линиях.

[0486] Последовательность ДНК сконструированных вариантов α -GAL D и 004 была дополнительно кодон-оптимизирована для улучшения экспрессии в тканях печени, почек и сердца человека. Для каждого из сконструированных вариантов α -GAL D и 004 было создано до шести отдельных последовательностей ДНК. Затем их включали в плазмиды и использовали для трансфекции.

[0487] Клетки Huh7 (гепатомы человека) или HEK293 (эмбриональные клетки почки человека) трансфицировали плазмидами, экспрессирующими различные варианты α -GAL, с использованием набора реагентов липофектамин 3000 (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, клетки высевали по 125 000 клеток на лунку в формате 12-луночного планшета с 1 мл среды для выращивания на лунку и выдерживали при 37°C, 5% CO₂ в течение ночи. На следующий день перед трансфекцией добавляли свежую среду (1 мл на лунку). Для каждой плазмиды 1 мкг плазмидной ДНК добавляли к 2 мкл реагента P3000, 1,5 мкл липофектамина 3000 и достаточному количеству среды OptiMEM, чтобы получить 100 мкл, и инкубировали при комнатной температуре в течение 10-15 минут. Затем эту смесь добавляли к клеткам и инкубировали при 37°C, 5 % CO₂ в течение ночи. На следующий день среду обновляли и клетки инкубировали еще один день перед сбором супернатанта для анализа активности α -GAL.

[0488] Собирали супернатанты из трансфицированных клеток и анализировали на активность фермента α -GAL. Все кодон-оптимизированные варианты D приводили к значительно более высокой активности α -GAL по сравнению либо с α -GAL дикого типа, либо с неоптимизированным ферментом D в клетках Huh7. (**Фиг. 19А**). Напротив, в клетках HEK293 только 3 оптимизированных варианта показали превосходную активность в супернатанте (**Фиг. 19С**). В случае сконструированного варианта 004 только один кодон-оптимизированный вариант показал относительно хорошую активность как в клетках Huh7, так и в клетках HEK293 (**Фиг. 19В, 19D**). Плазмиды, экспрессирующие два кодон-оптимизированных сконструированных варианта, затем упаковывали в вирус гAAV9 и тестировали *in vivo*, как описано в Примере 13.

Пример 14. Оценка плазмид *in vivo*, экспрессирующих кодон-оптимизированные сконструированные варианты α -GAL.

[0489] В этом примере исследовали активность α -GAL различных кодон-оптимизированных вариантов α -GAL на мышинной модели Фабри (G3Stg/GLAko).

[0490] 10-12 недельным самцам мышей G3Stg/GLAko однократно вводили гAAV9-D3 и гAAV9-004-3 в 4 различных дозах $2,5 \times 10^8$, $2,5 \times 10^9$, $2,5 \times 10^{10}$ и $2,5 \times 10^{11}$ вг/кг, или нулевой контроль гAAV9-NUL в дозе $2,5 \times 10^{11}$ вг/кг, и наблюдали в течение 4

недель после введения дозы. Мышей из одного потомства ДТ:ДТ и ДТ:САР с таким же генетическим фоном использовали в качестве контроля, и им вводили только носитель. Мыши были распределены в каждую группу исследуемого препарата в полурандомизированном процессе на основе массы тела до введения дозы для обеспечения сбалансированных групп. Сыворотку собирали во время исследования в несколько моментов времени. Кровь брали из ретроорбитальной или хвостовой вены во время исследования и через сердечную пункцию в конце исследования и обрабатывали для отбора сыворотки. В конце исследования была собрана конечная сыворотка, а мышам сделали перфузию для отбора органов, включая печень, почки и сердце, которые затем быстро заморозили в сухом льду и хранили при -80°C . Аналитические оценки включали измерение активности фермента α -GAL и анализ уровней субстрата в сыворотке и различных тканях.

[0491] Ткани гомогенизировали в буфере для лизиса, содержащем 10 мМ HEPES с 0,5% Тритон-Х 100 и смесью ингибиторов протеазы $1,5 \times$ Halt, без ЭДТА, центрифугировали и супернатант собирали для аналитических исследований. Активность альфа-галактозидазы в супернатанте или сыворотке измеряли с использованием флуоресцентного субстрата. Вкратце, 2 мкл биологических образцов инкубировали с 15 мкл раствора субстрата 4-MU-a-gal (Research Products International Company, кат. № M65400) с ингибитором α -галактозидазы В (N-ацетил-D-галактозамин, Sigma кат. № A-2795) при 37°C в течение 60 минут. Ферментативную реакцию останавливают добавлением 200 мкл стоп-раствора карбоната глицина, pH 10,7. Продукт 4-MU измеряют при длине волны возбуждения 360 нм и длине волны испускания 465 нм с помощью флуоресцентного планшет-ридера. Концентрации 4-MU в исследуемых образцах рассчитывают по калибровочной кривой 4-MU на том же планшете. Активность в ткани нормализуют по концентрации общего белка, определяемой анализом BCA (Thermo Scientific, кат. № 23225).

[0492] Дозозависимая экспрессия α -GAL наблюдалась у мышей G3Stg/GLAko после внутривенного введения rAAV9-D3 и rAAV9-004-3 в дозах от $2,5e8$ вг/кг до $2,5e11$ вг/кг самцам мышей G3Stg/GLAko, что приводило к устойчиво более высокой активности α -GAL в сыворотке в течение 4 недель исследования (**Фиг. 20А**). Активность α -GAL в сыворотке животных, которым вводили rAAV9-D3 и 004-3 в дозе $2,5e11$ вг/кг, была более чем на 2 логарифмических порядка выше нормальной активности α -GAL у мышей ДТ, измеренной у животных ДТ, получавших носитель. Мыши G3Stg/GLAko, получавшие rAAV9-NUL, имели неопределяемые уровни α -GAL в кровотоке. Дозозависимое увеличение активности α -GAL наблюдали в тканях (почках, сердце и печени) у животных, получавших rAAV9-D3 и 004-3 (**Фиг. 20В-20D**). Значительная превышение активности α -GAL по сравнению с

нормальными уровнями ДТ наблюдали при дозах гAAV9-D3 и гAAV9-004-3, равным 2,5e10 вг/кг или выше.

Пример 15. Оценка in vivo субстратов GB3 и lysoGb3 с плазмидами, экспрессирующими кодон-оптимизированные сконструированные варианты α -GAL.

[0493] В этом Примере исследовали снижение количества субстратов GB3 и lysoGb3 в различных кодон-оптимизированных вариантах α -GAL на мышинной модели Фабри (G3Stg/GLAko).

[0494] Как поясняется в Примере 14, самцам мышей G3Stg/GLAko вводили гAAV9-D3 и гAAV9-004-3 в 4 различных дозах. Кроме того, ткани гомогенизировали, как указано ранее в Примере 14. Субстраты из образцов сыворотки и тканей анализировали методом ЖХ-МС. Образцы сначала экстрагировали с использованием хлороформа:метанола (об./об. 2:1) и муравьиной кислоты перед прогонкой в ВЭЖХ и ЖХ-МС/МС (Applied Biosystem API5000, ионизация распылением Turbo Ion, режим положительных ионов).

[0495] Было замечено, что количество субстратов как GB3, так и lysoGb3 было снижено дозозависимым образом у мышей, получавших гAAV9-D3 и гAAV9-004-3, по сравнению с контролем гAAV9-null (**Фиг. 21А-21Н**). При самой высокой дозе 2,5e11 вг/кг введение животным либо гAAV9-D3, либо гAAV9-044-3 приводило к снижению уровней субстрата GB3 и lysoGb3 до нормальных уровней ДТ в ключевых целевых тканях, таких как почки и сердце. Аналогичные тенденции наблюдались для печени и сыворотки.

ЭКВИВАЛЕНТЫ И ОБЪЕМ

[0496] Специалистам в данной области техники станет понятно или они смогут установить, используя не более чем рутинные эксперименты, существование многочисленных эквивалентов конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящем документе. Объем данного изобретения не предназначен для ограничения приведенного выше описания, а скорее изложен в приведенной ниже формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, причем указанный вектор содержит
 - a. 5'-инвертированный концевой повтор (ITR);
 - b. универсальный промотор;
 - c. нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL;
 - d. поли A; и
 - e. 3'-ITR.

2. Рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, причем указанный вектор содержит
 - a. 5'-инвертированный концевой повтор (ITR);
 - b. универсальный промотор;
 - c. нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL;
 - d. посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE);
 - e. поли A; и
 - f. 3'-ITR.

3. Рекомбинантный вектор гAAV по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что капсид AAV представляет собой капсид AAV с широким тропизмом, выбранный из капсида AAV1, капсида AAV2, капсида AAV3, капсида AAV4, капсида AAV5, капсида AAV6, капсида AAV7, капсида AAV8 или капсида AAV9.

4. Рекомбинантный вектор гAAV по п. 3, отличающийся тем, что капсид AAV с широким тропизмом представляет собой AAV9.

5. Вектор гAAV по п. 1, отличающийся тем, что универсальный промотор выбран из промотора куриного β -актина (CBA), промотора EF-1 α , промотора PGK, промотора UBC, промотора бета-глюкуронидазы LSE (GUSB) или универсального промотора элемента открытия хроматина (UCOE).

6. Вектор гAAV по п. 1, отличающийся тем, что универсальный промотор содержит энхансер цитомегаловируса (ЦМВ), промотор куриного бета-актина и интрон кроличьего бета-глобина.
7. Вектор гAAV по п. 1, отличающийся тем, что универсальный промотор содержит укороченный промотор EF-1 α и один или несколько интронов.
8. Вектор гAAV по п. 7, отличающийся тем, что один или более интронов получены из генов куриного β -актина и/или кроличьего β -глобина.
9. Вектор гAAV по п. 4, отличающийся тем, что капсид AAV9 является встречающимся в природе или модифицированным.
10. Вектор гAAV по п. 2, отличающийся тем, что последовательность WPRE является модифицированной.
11. Вектор гAAV по п. 10, отличающийся тем, что последовательность WPRE представляет собой mut6delATG WPRE.
12. Вектор гAAV по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что поли А представляет собой поли А бычьего гормона роста (BGH).
13. Вектор гAAV по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая фермент α -GAL, является кодон-оптимизированной.
14. Вектор гAAV по п. 13, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая фермент α -GAL, является кодон-оптимизированной в отношении клеток человека.
15. Вектор гAAV по любому из пп. 1–13, отличающийся тем, что фермент α -GAL имеет немодифицированную последовательность.
16. Способ лечения болезни Фабри, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, рекомбинантного аденоассоциированного вирусного вектора (гAAV) по любому из

предыдущих пунктов.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая вектор гAAV по любому из пп. 1-15.
18. Клетка, содержащая вектор гAAV по любому из пп. 1-15.
19. Способ лечения болезни Фабри, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, рекомбинантного аденоассоциированного вирусного вектора (гAAV), упакованного в капсид с широким тропизмом к тканям, причем вектор содержит:
 - a. 5'-инвертированный концевой повтор (ITR);
 - b. универсальный промотор, содержащий энхансер цитомегаловируса (ЦМВ), промотор куриного бета-актина и интрон кроличьего бета-глобина;
 - c. нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL;
 - d. поли A; и
 - e. 3'-ITR.
20. Способ лечения болезни Фабри, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, рекомбинантного аденоассоциированного вирусного вектора (гAAV), упакованного в капсид с широким тропизмом к тканям, причем вектор содержит:
 - a. 5'-инвертированный концевой повтор (ITR);
 - b. универсальный промотор, содержащий энхансер цитомегаловируса (ЦМВ), промотор куриного бета-актина и интрон кроличьего бета-глобина;
 - c. нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL;
 - d. посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE);
 - e. поли A; и
 - f. 3'-ITR.
21. Способ по п. 19 или п. 20, отличающийся тем, что капсид AAV представляет собой капсид AAV с широким тропизмом, выбранный из капсида AAV1, капсида AAV2, капсида AAV3, капсида AAV4, капсида AAV5, капсида AAV6, капсида AAV7, капсида AAV8 или капсида AAV9.
22. Рекомбинантный вектор гAAV по п. 21, отличающийся тем, что капсид AAV с широким тропизмом представляет собой AAV9.

23. Способ по п. 19 или п. 20, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая фермент α -GAL, является кодон-оптимизированной.
24. Способ по п. 19 или п. 20, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая фермент α -GAL, является сконструированной.
25. Способ по п. 24, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая фермент α -GAL, является сконструированной или кодон-оптимизированной.
26. Способ по любому из пп. 19–22, отличающийся тем, что фермент α -GAL имеет немодифицированную последовательность.
27. Способ по п. 20, отличающийся тем, что WPRE представляет собой mut6delATG WPRE.
28. Способ по п. 20, отличающийся тем, что поли А представляет собой поли А бычьего гормона роста (BGH).
29. Способ по любому из пп. 19-28, отличающийся тем, что вектор гAAV вводят внутривенно, подкожно или трансдермально.
30. Способ по п. 29, отличающийся тем, что трансдермальное введение осуществляют с помощью генной пушки.
31. Способ по любому из пп. 19-30, отличающийся тем, что вектор гAAV является эписомальным после введения.
32. Способ по п. 19 или п. 20, отличающийся тем, что вектор гAAV обеспечивает терапевтический эффект при более низкой дозе, чем вектор гAAV, содержащий капсид AAV1, капсид AAV2, капсид AAV3, капсид AAV4, капсид AAV5, капсид AAV6, капсид AAV7 или капсид AAV8, который специфически нацелен на печень с использованием специфического для печени промотора.

33. Способ по любому из пп. 19-32, отличающийся тем, что после введения вектора гAAV у субъекта обнаруживают α -GAL в сыворотке в течение по меньшей мере 5 недель, 10 недель, 15 недель, 26 недель, 1 года, 5 лет, 10 лет или 15 лет.

34. Способ по п. 33, отличающийся тем, что у субъекта обнаруживают α -GAL в сыворотке в течение более 15 недель.

35. Способ по любому из пп. 19-34, отличающийся тем, что введение приводит к экспрессии фермента α -GAL в одном или нескольких из печени, почек, сердца и желудочно-кишечного тракта субъекта.

36. Способ по любому из пп. 19-34, отличающийся тем, что введение вектора гAAV приводит к снижению уровней глоботриаозилцерамида (gb3) в одном или нескольких из печени, сердца, почек и ЖК-тракта субъекта.

37. Способ экспрессии фермента α -GAL в клетке, включающий введение вектора гAAV, упакованного в капсид AAV9, причем указанный вектор содержит:

- a. 5'-инвертированный концевой повтор (ITR);
- b. универсальный промотор, содержащий энхансер цитомегаловируса (ЦМВ), промотор куриного бета-актина и интрон кроличьего бета-глобина;
- c. нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL;
- d. поли А бычьего гормона роста (BGH); и
- e. 3'-ITR.

38. Способ экспрессии фермента α -GAL в клетке, включающий введение вектора гAAV, упакованного в капсид AAV9, причем указанный вектор содержит:

- a. 5'-инвертированный концевой повтор (ITR);
- b. универсальный промотор, содержащий энхансер цитомегаловируса (ЦМВ), промотор куриного бета-актина и интрон кроличьего бета-глобина;
- c. нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL;
- d. посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE), имеющий мутацию mut6delATG;
- e. поли А бычьего гормона роста (BGH); и
- f. 3'-ITR.

39. Рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, причем указанный вектор содержит

- a. 5'-инвертированный концевой повтор (ITR);
- b. специфичный для печени промотор;
- c. нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL;
- d. поли A; и
- e. 3'-ITR.

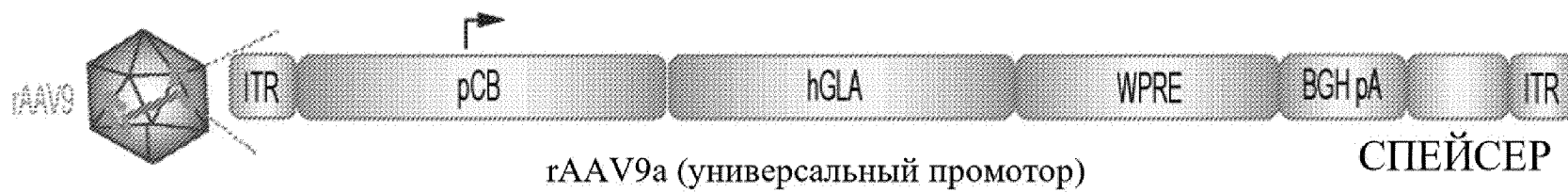
40. Рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, упакованный в капсид AAV, обладающий широким тропизмом к тканям, причем указанный вектор содержит

- a. 5'-инвертированный концевой повтор (ITR);
- b. специфичный для печени промотор;
- c. нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент α -GAL;
- d. посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE);
- e. поли A; и
- f. 3'-ITR.

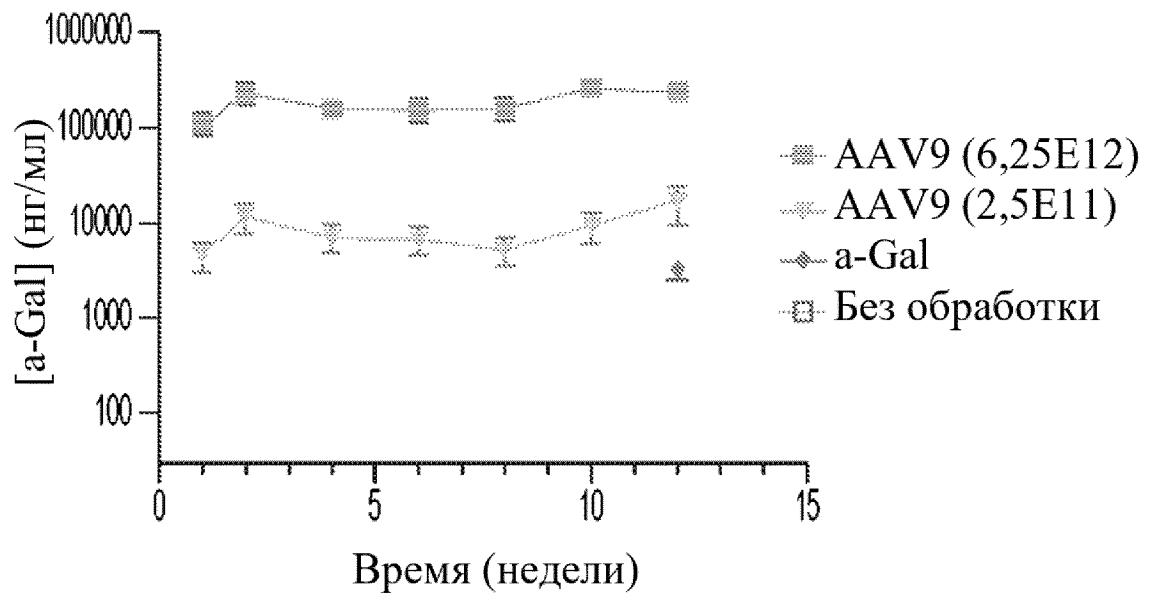
41. Вектор по п. 39 или п. 40, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая фермент α -GAL, является кодон-оптимизированной.

42. Вектор по п. 39 или п. 40, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая фермент α -GAL, является сконструированной.

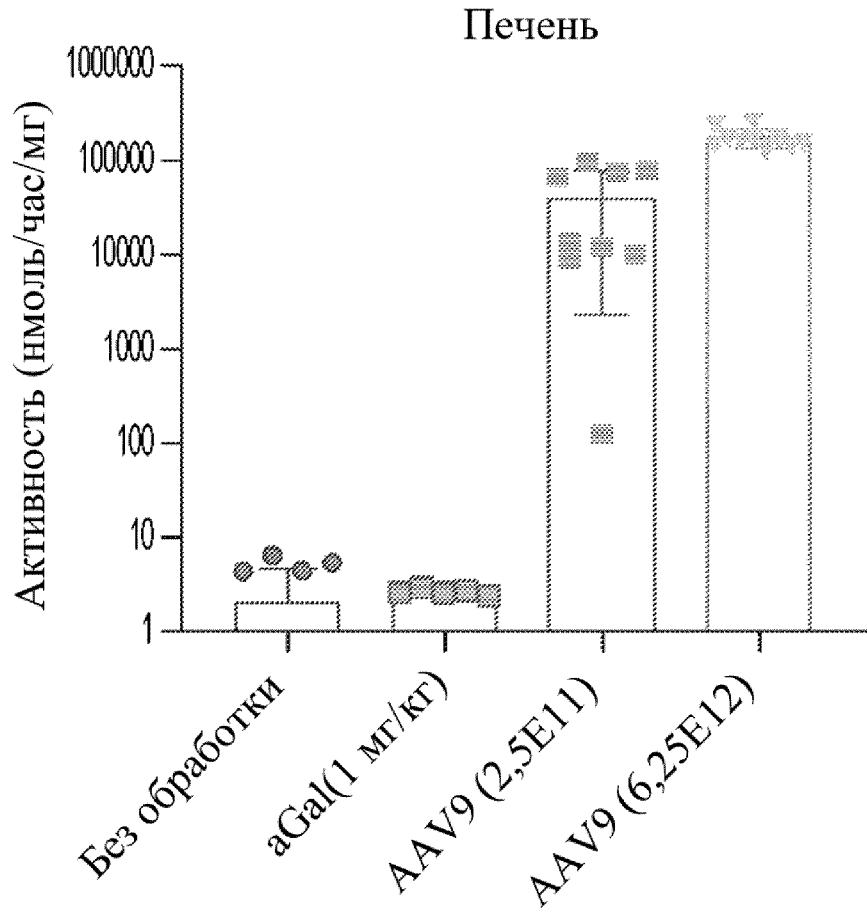
43. Вектор по п. 39 или п. 40, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая фермент α -GAL, является кодон-оптимизированной и сконструированной.



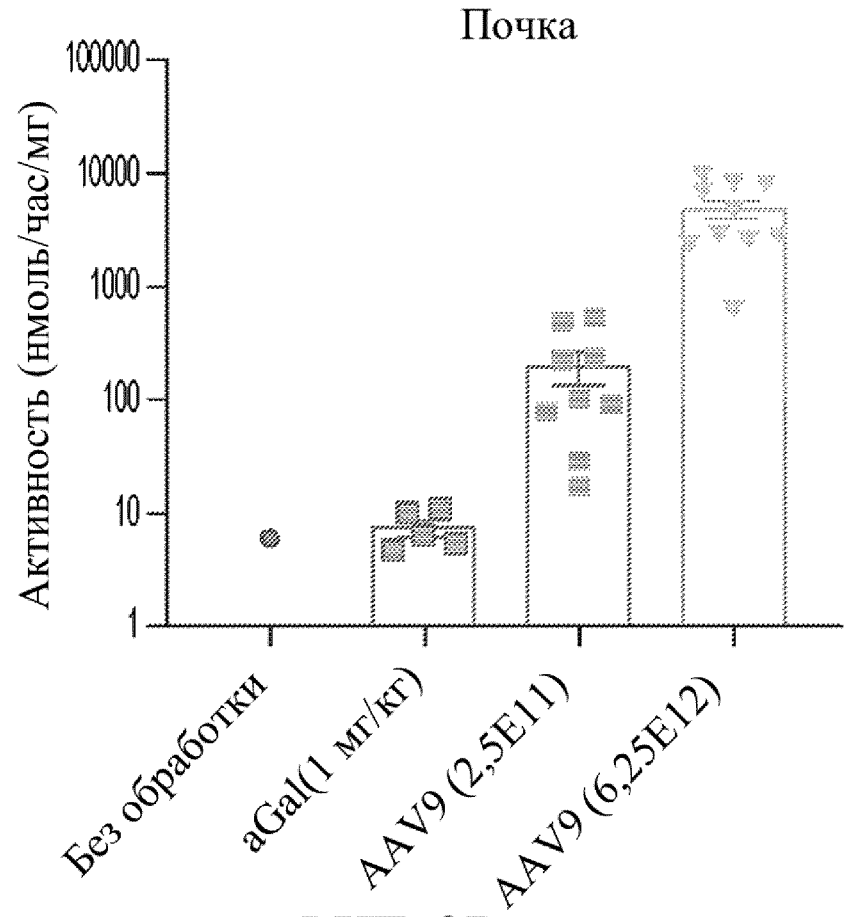
ФИГ. 1



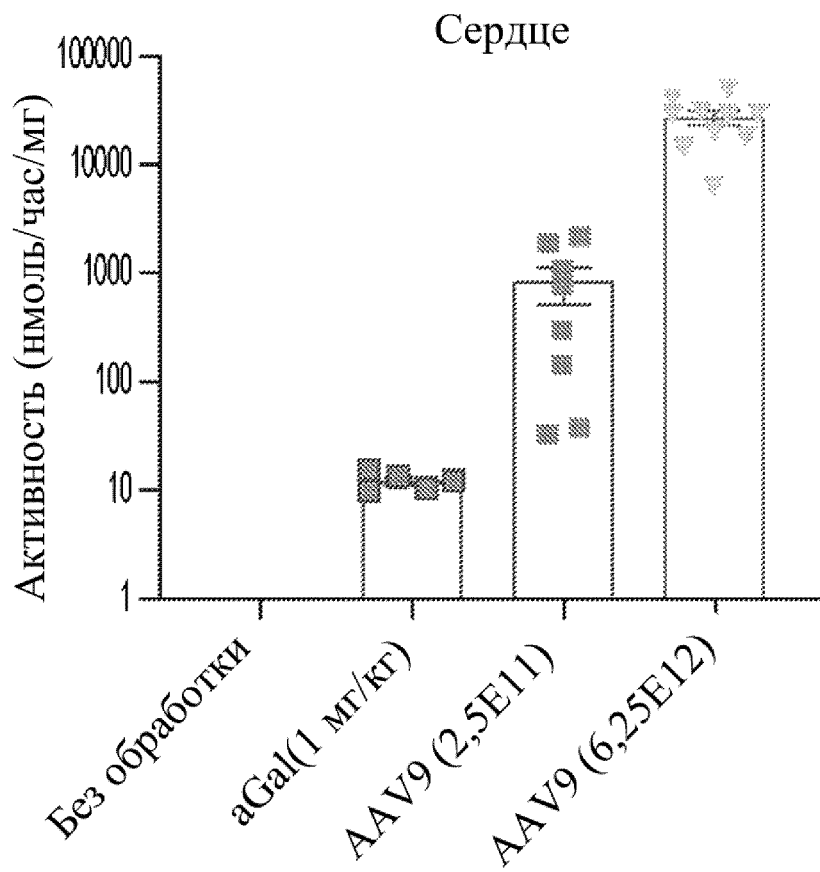
ФИГ. 2



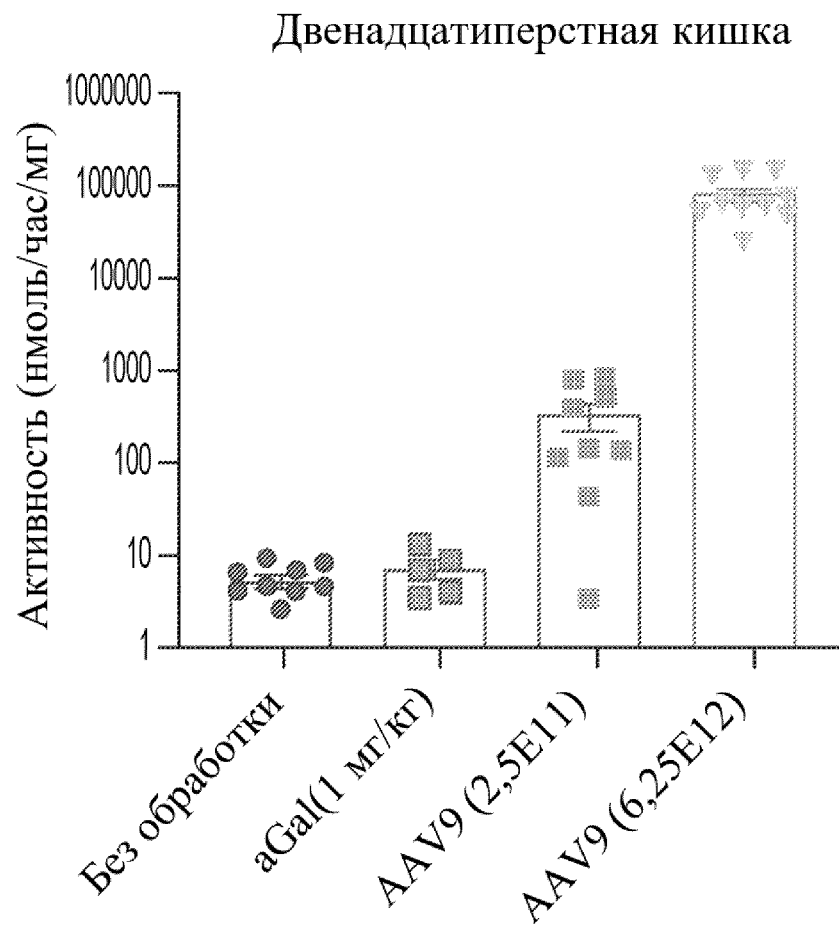
ФИГ. 3А



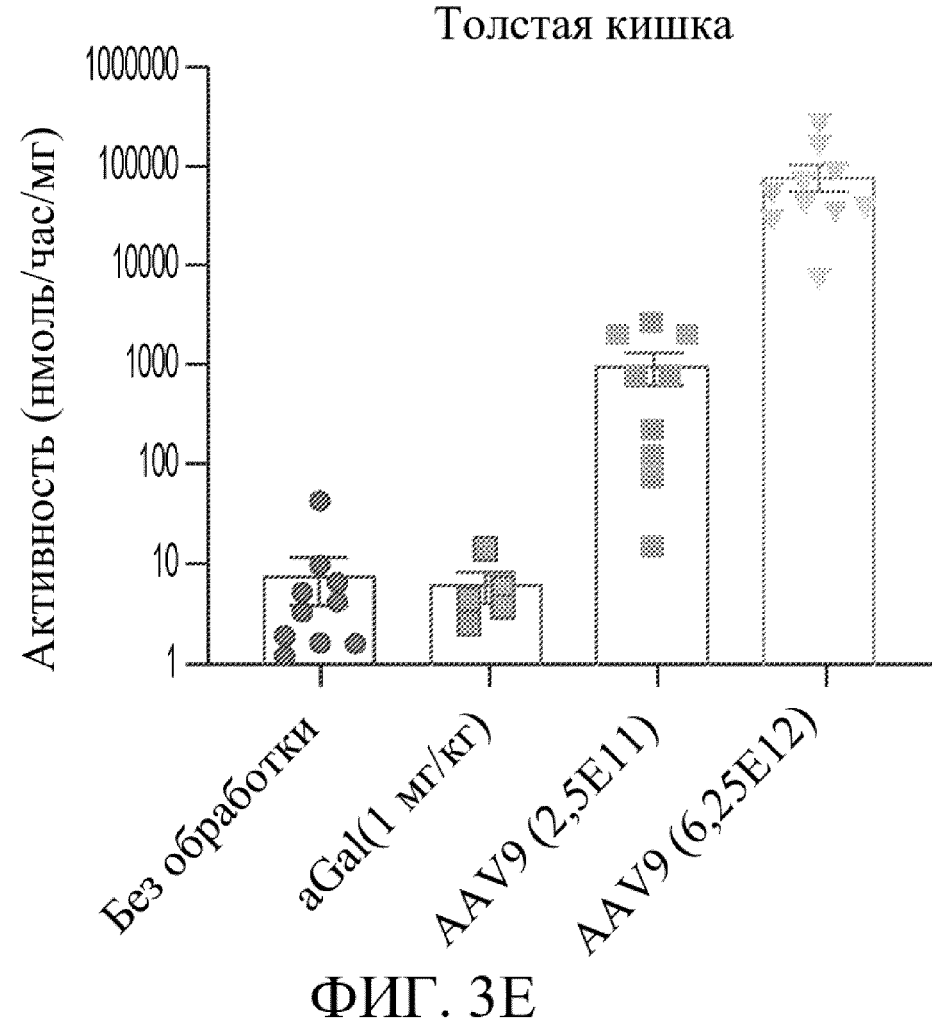
ФИГ. 3В

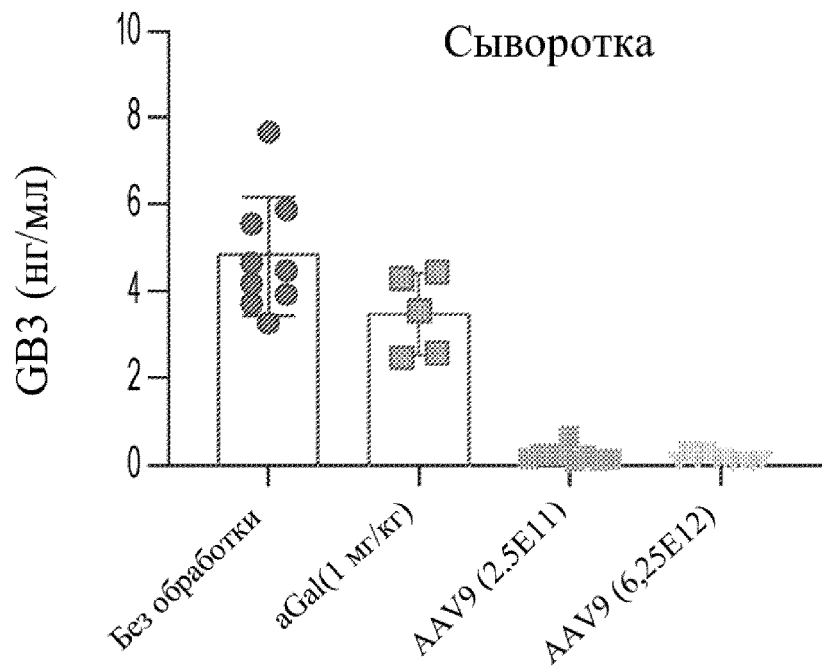


ФИГ. 3С

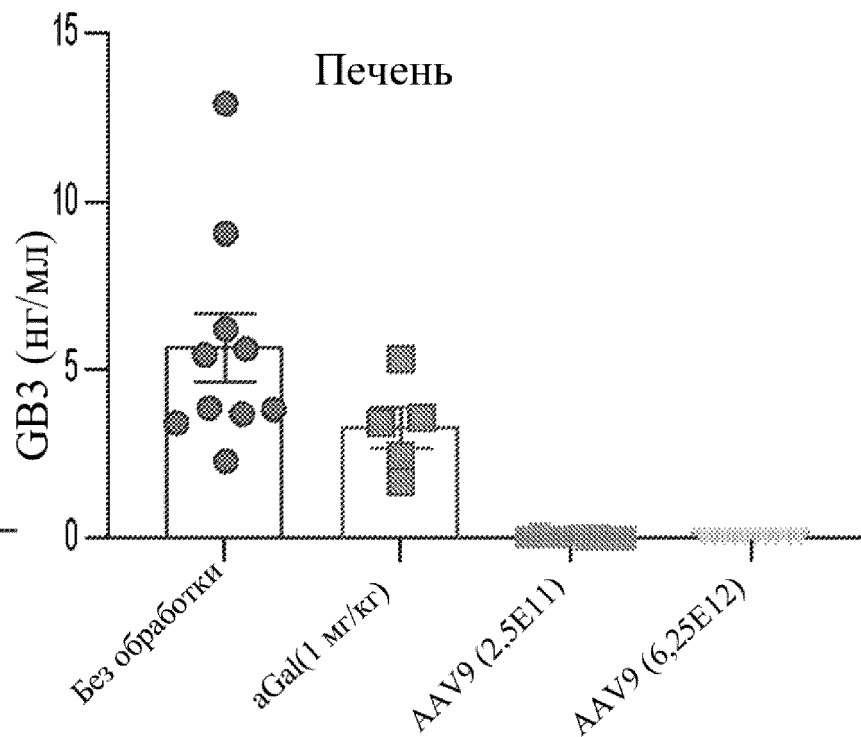


ФИГ. 3D

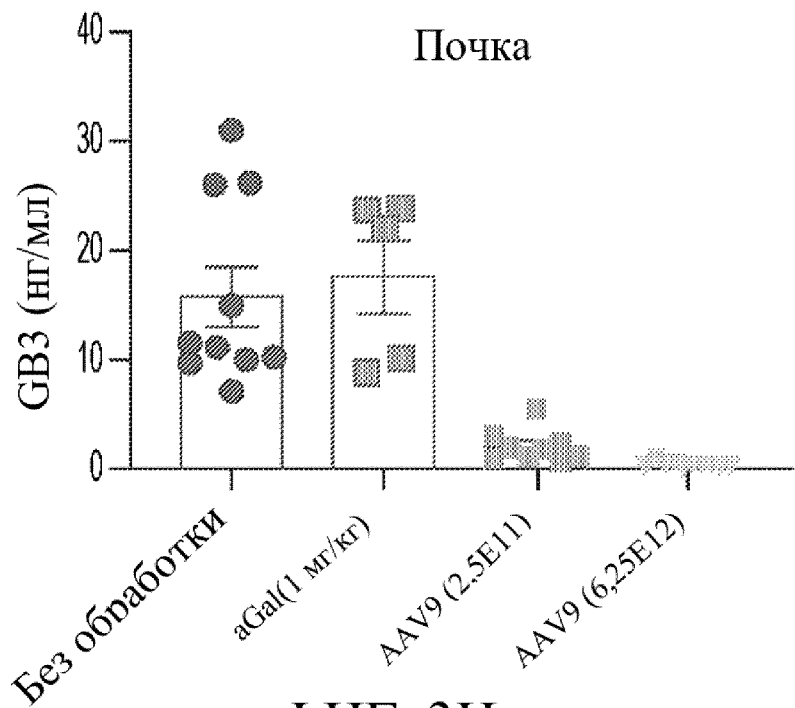




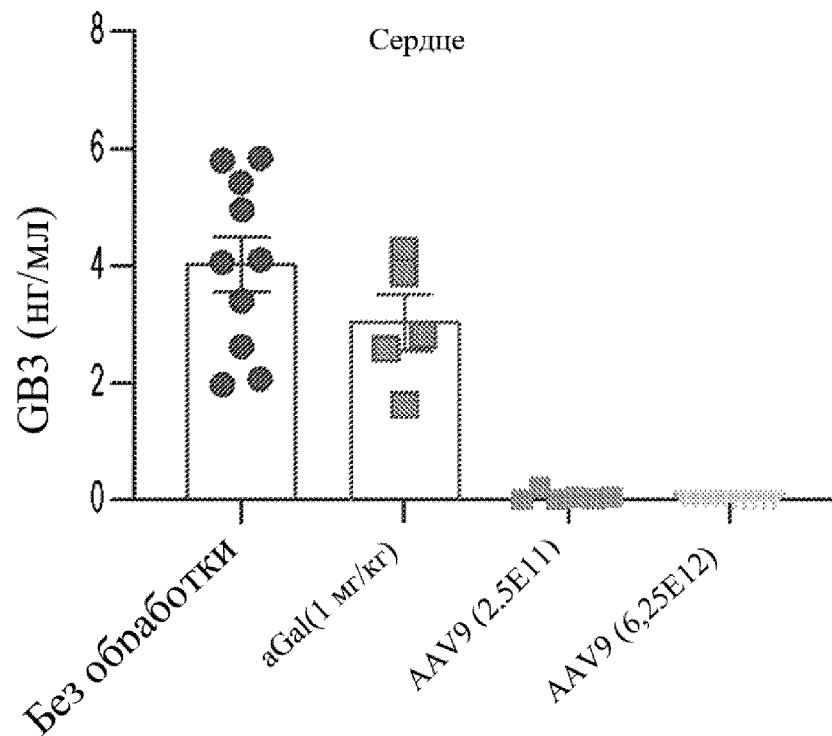
ФИГ. 3F



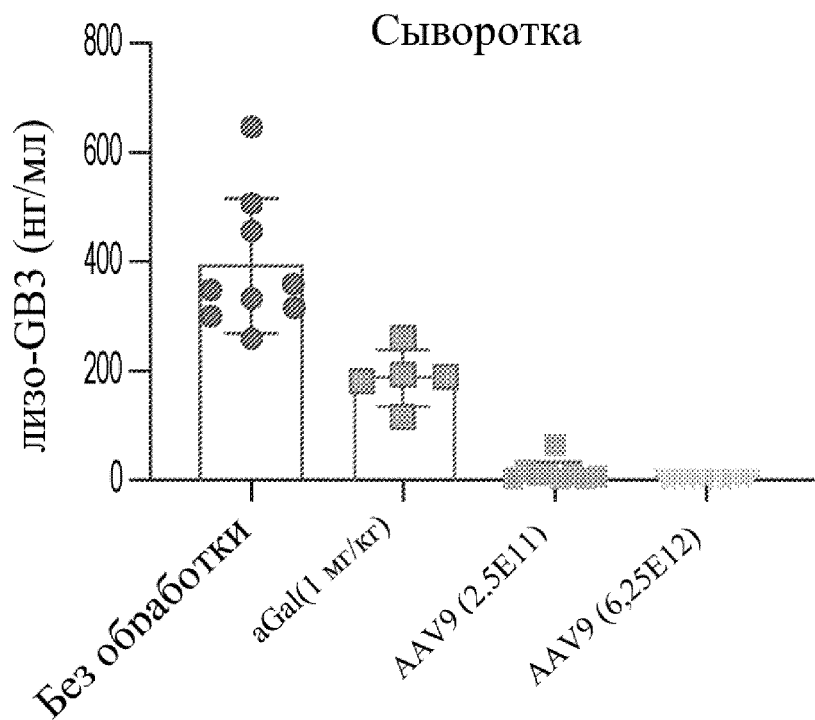
ФИГ. 3G



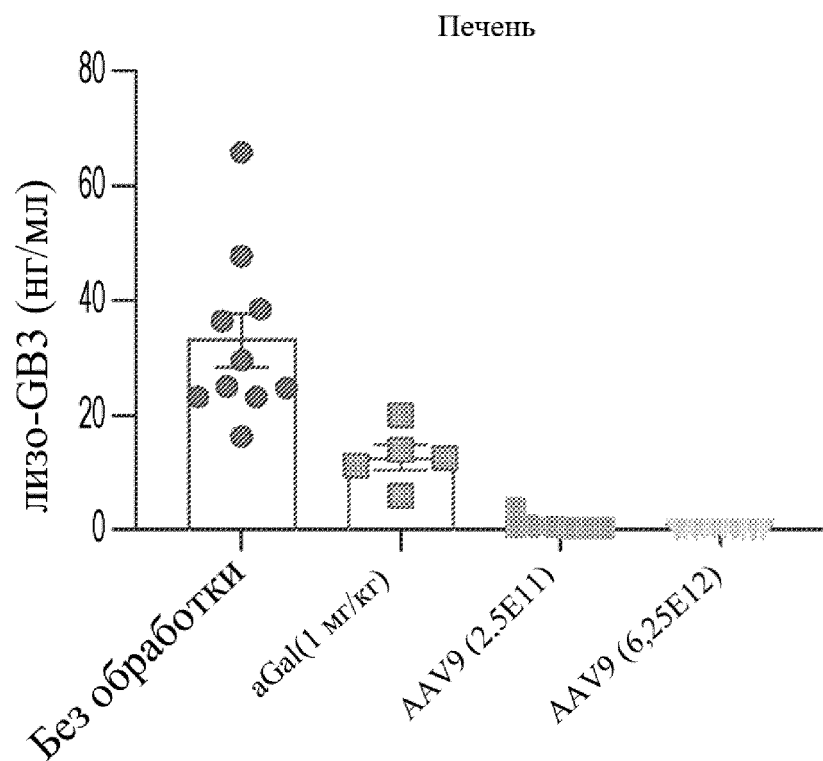
ФИГ. 3H



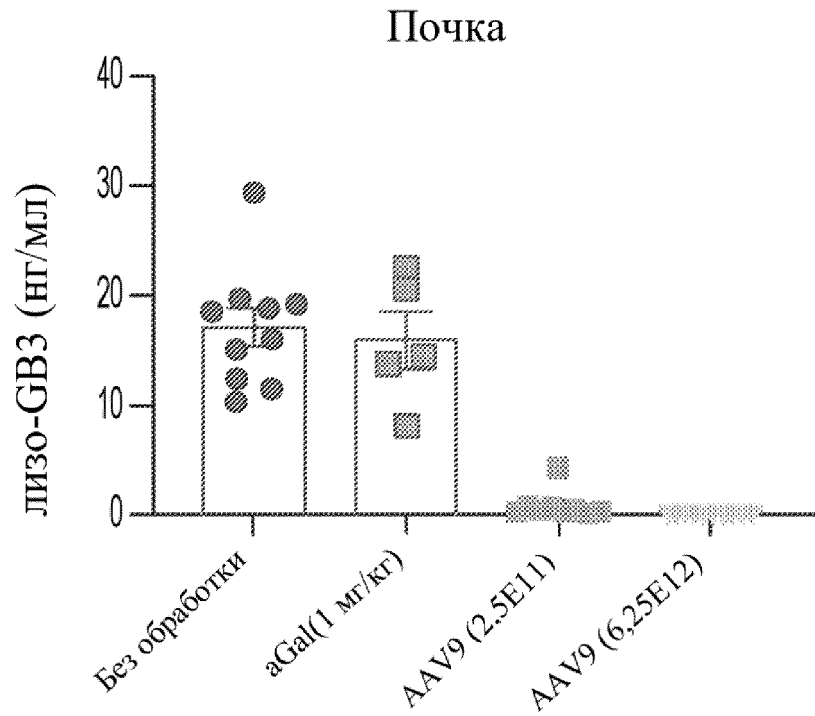
ФИГ. 3I



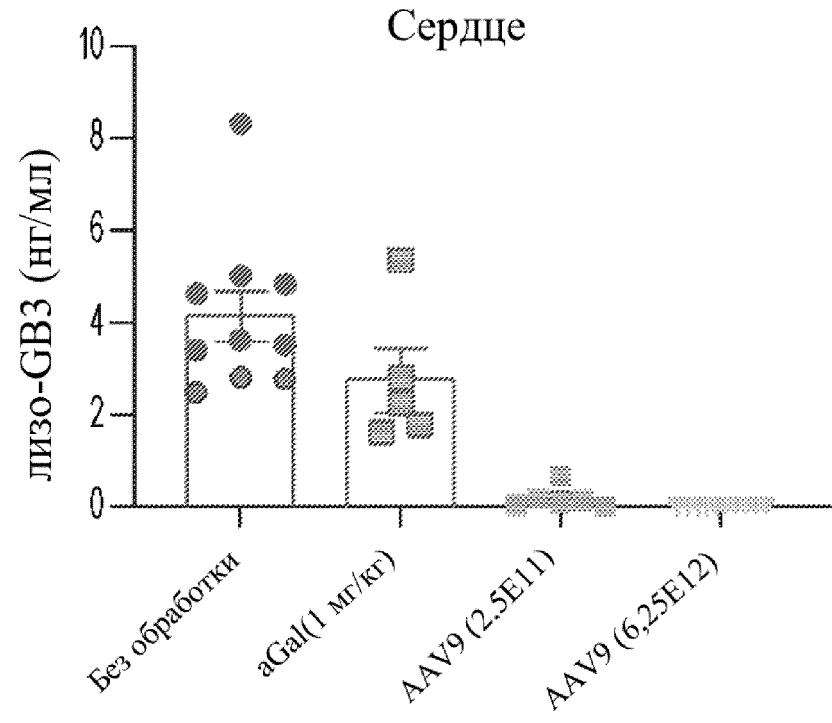
ФИГ. 3J



ФИГ. 3K

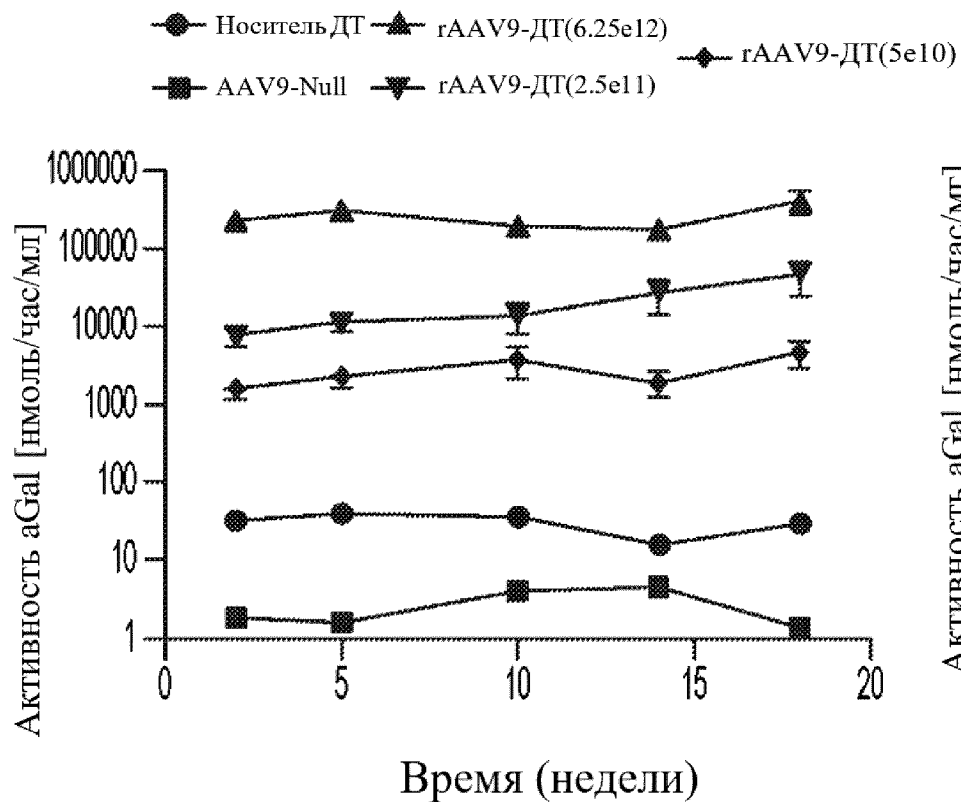


ФИГ. 3L

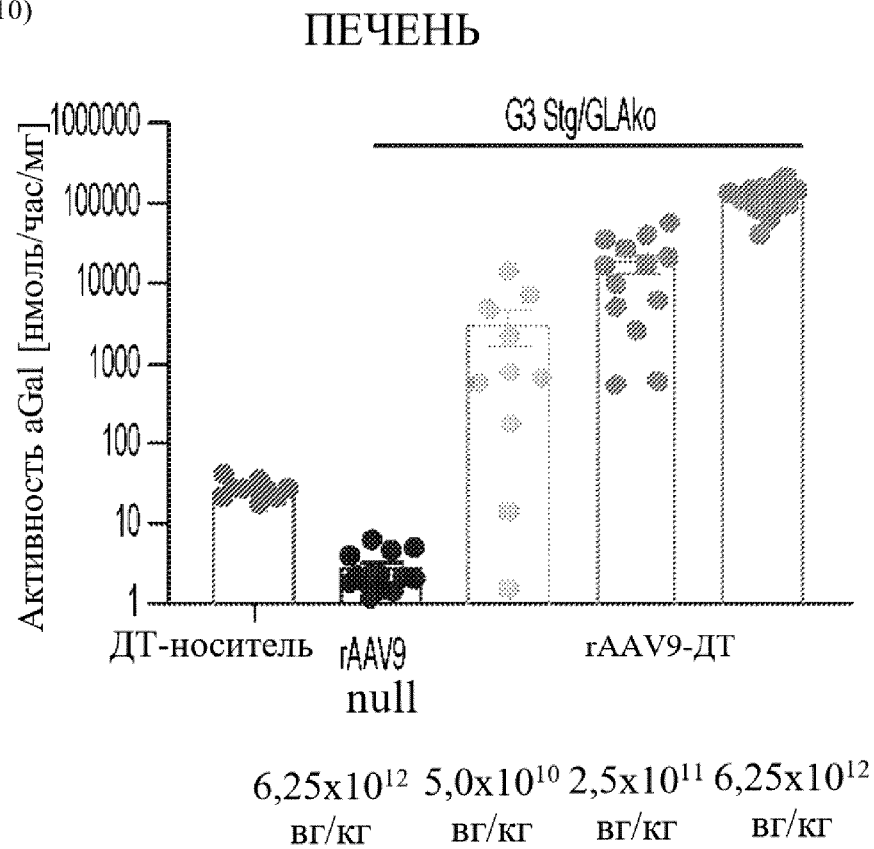


ФИГ. 3M

ЗАМІНЯЮЩІЙ ЛІСТ (ПРАВИЛО 26)

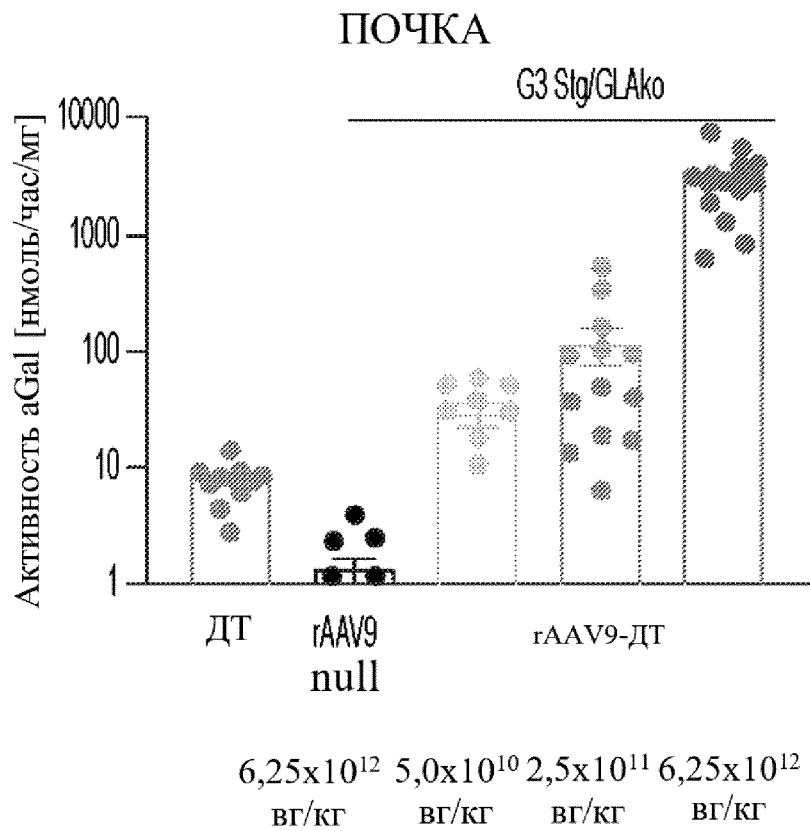


ФИГ. 4А

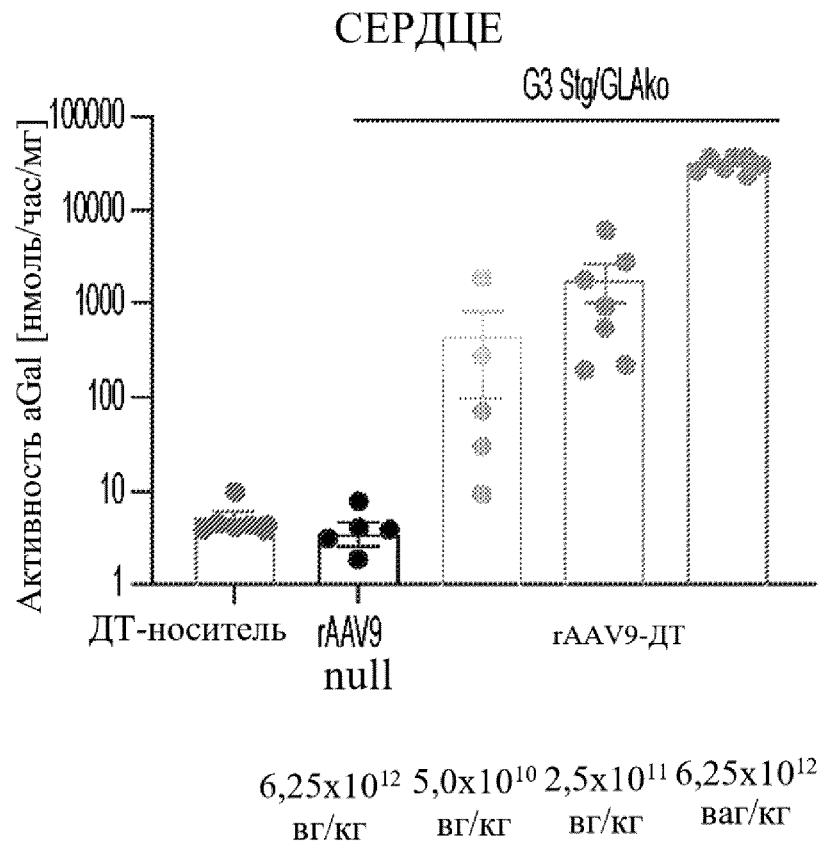


10/54

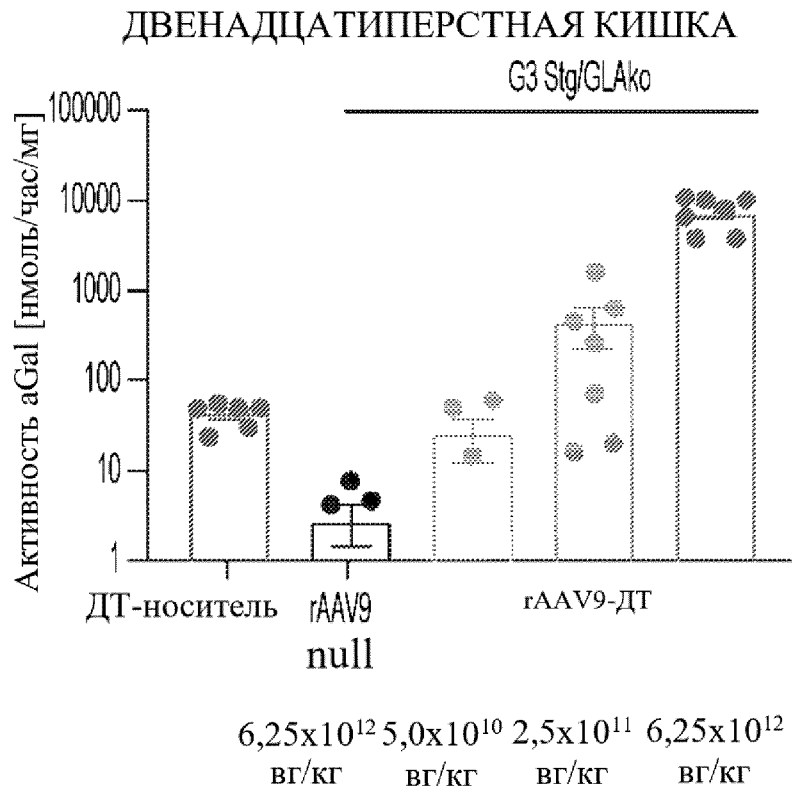
ФИГ. 4В



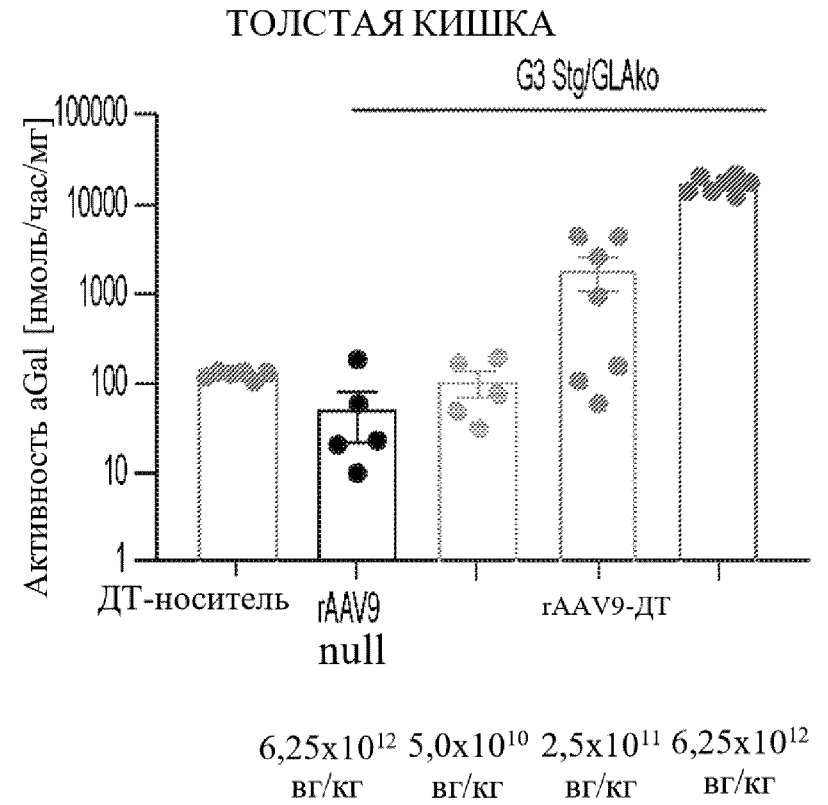
ФИГ. 4С



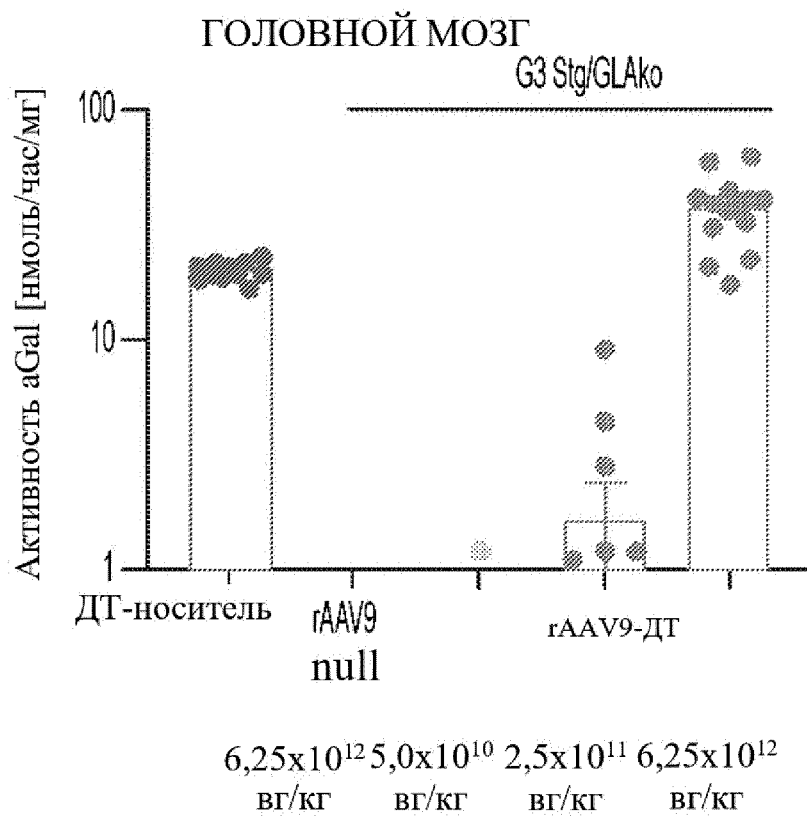
ФИГ. 4D



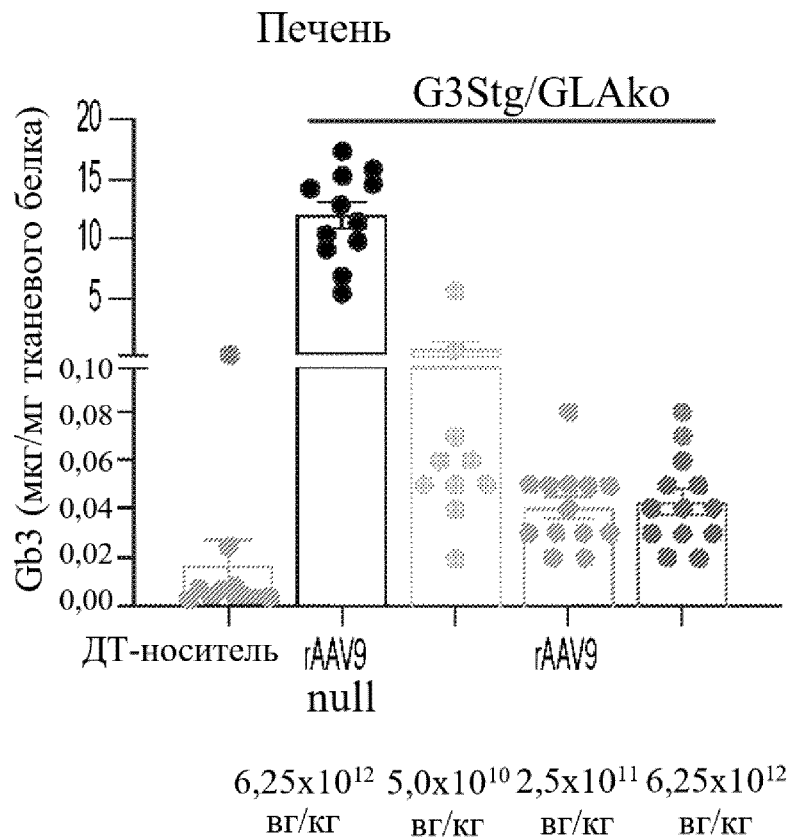
ФИГ. 4E



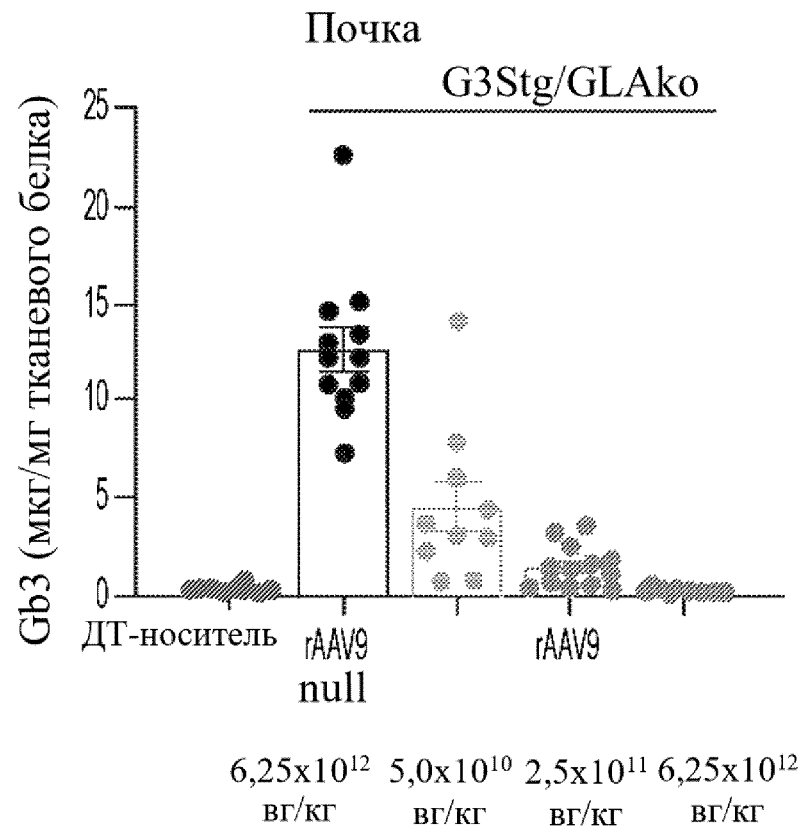
ФИГ. 4F



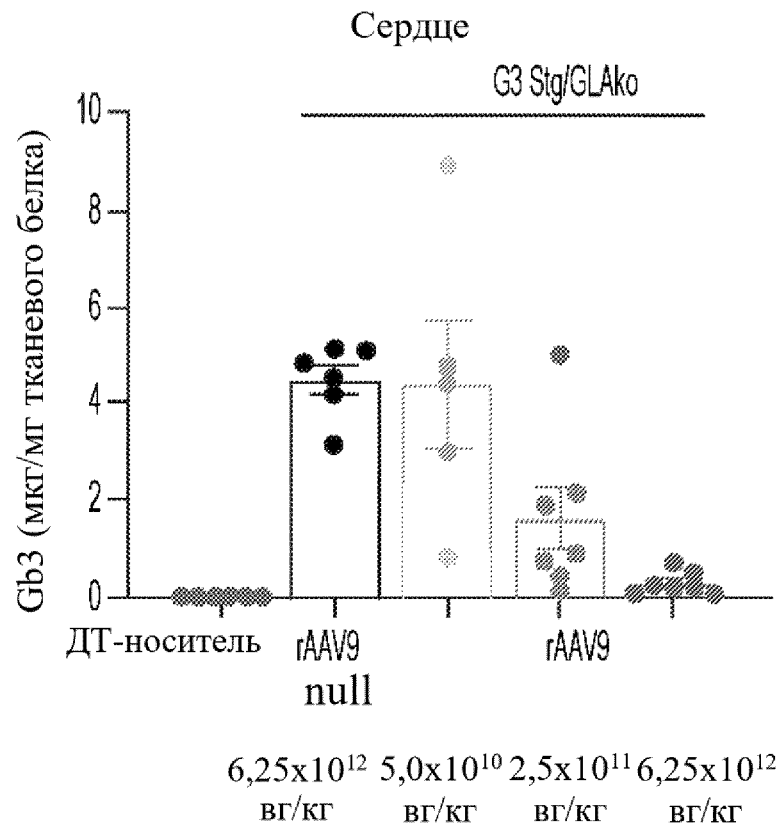
ФИГ. 4G



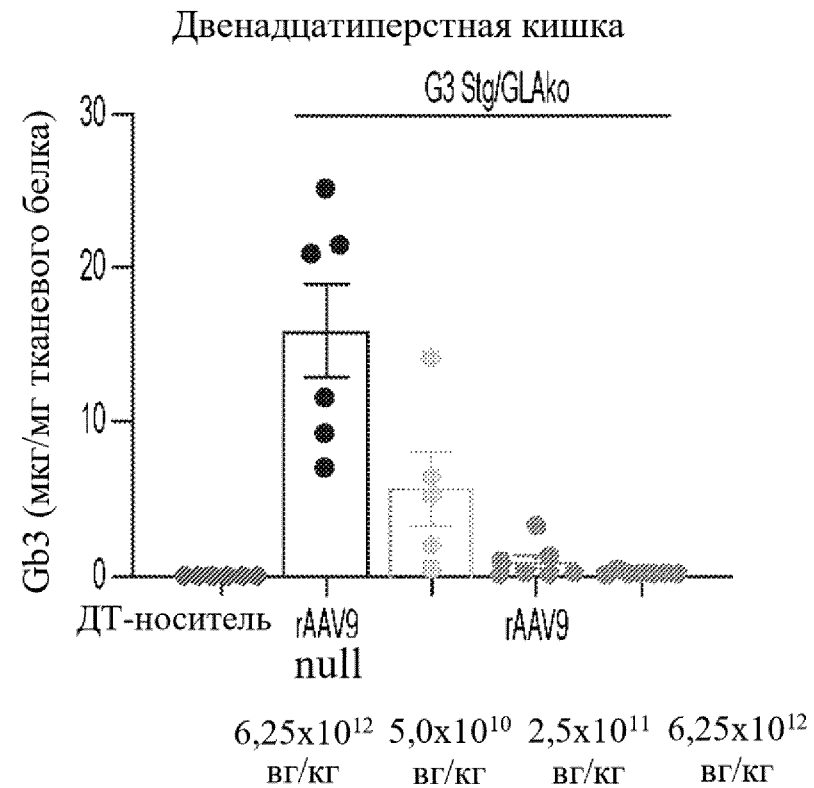
ФИГ. 5А



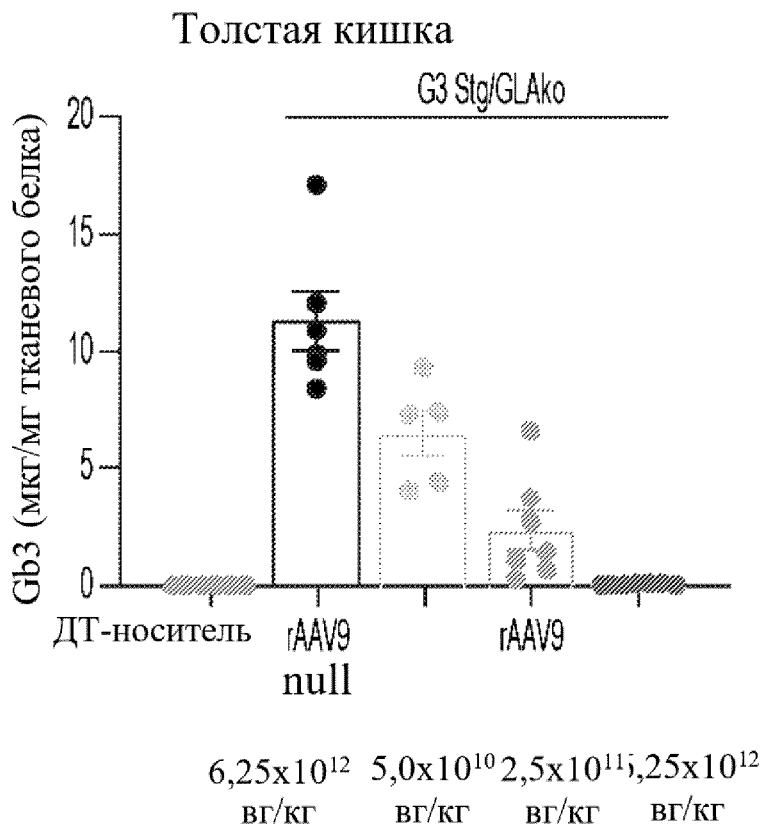
ФИГ. 5В



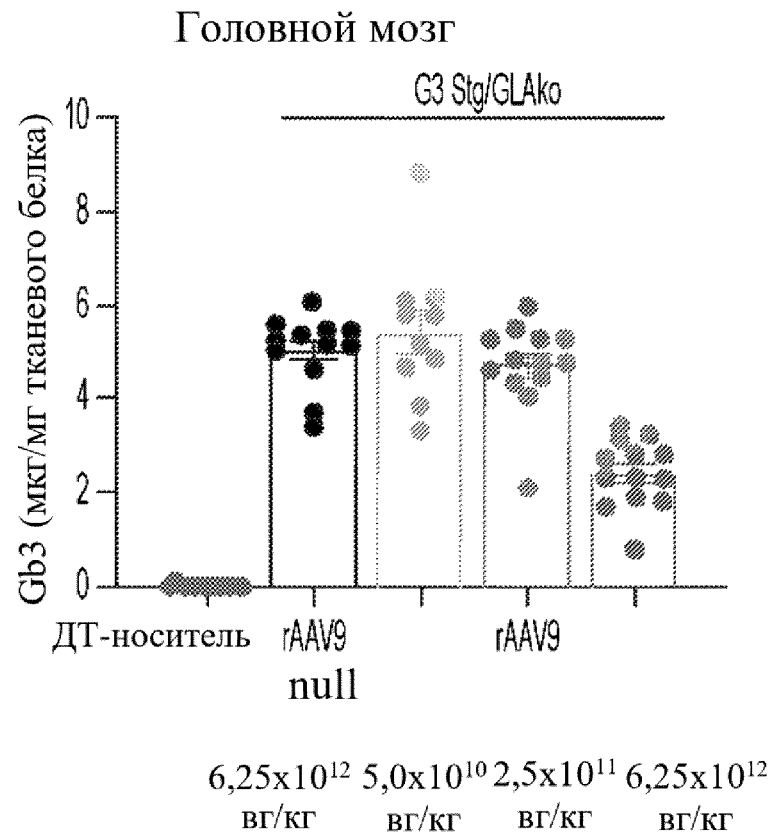
ФИГ. 5С



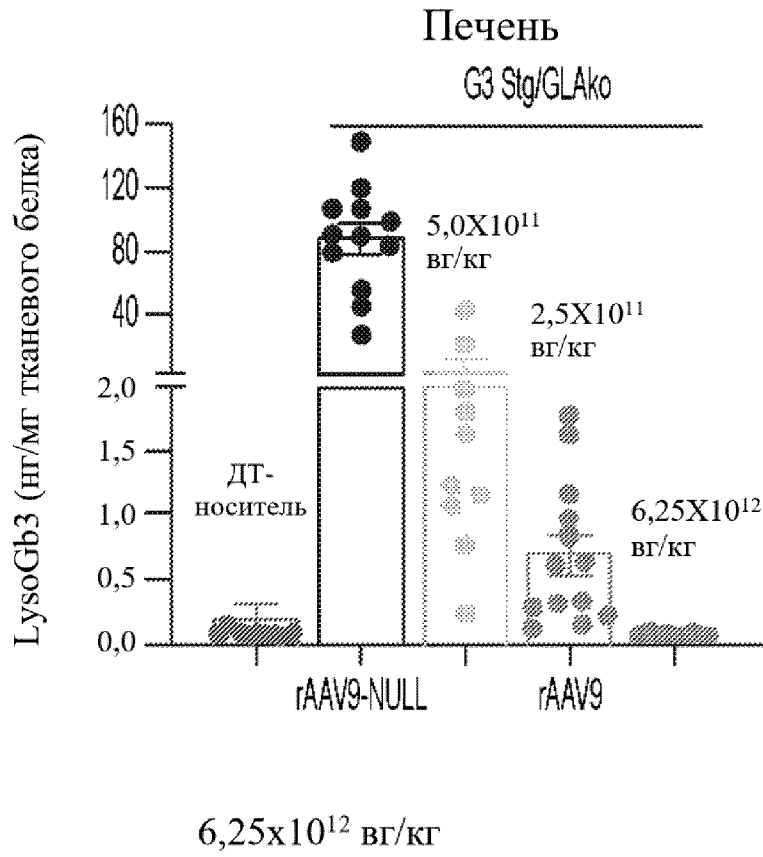
ФИГ. 5D



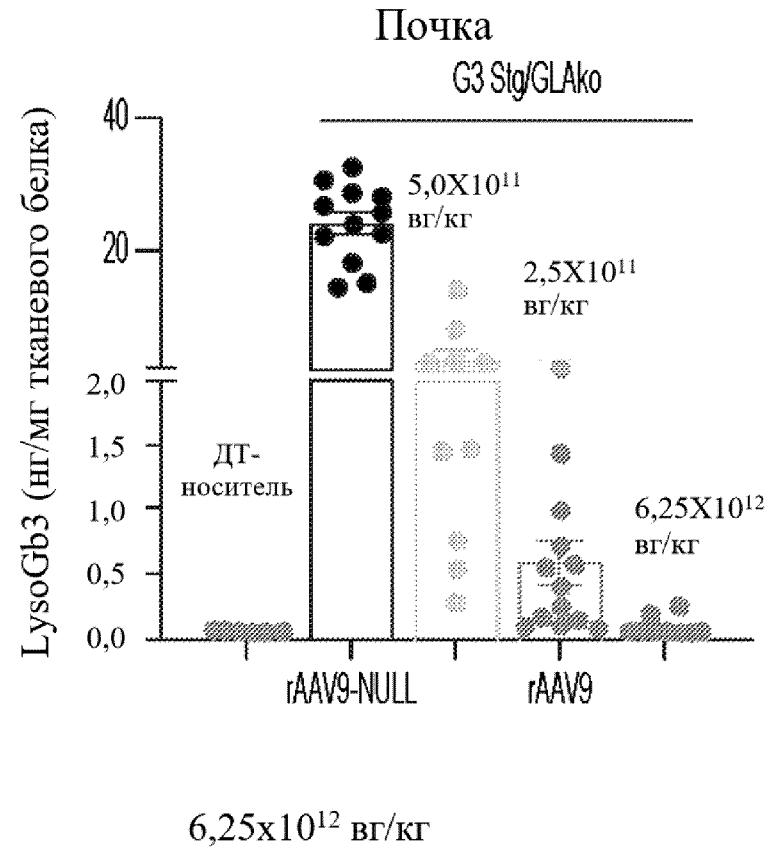
ФИГ. 5E



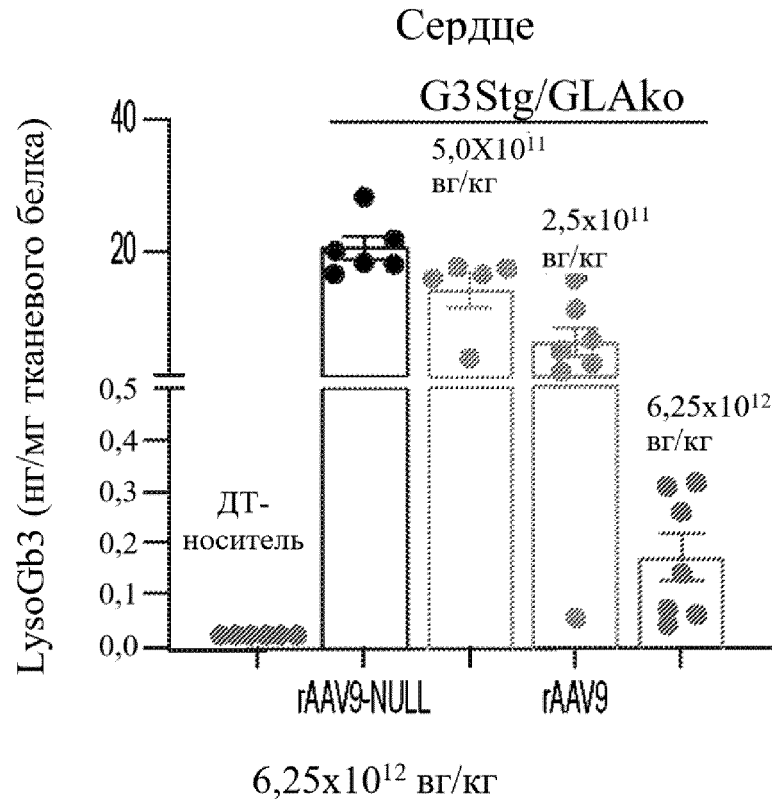
ФИГ. 5F



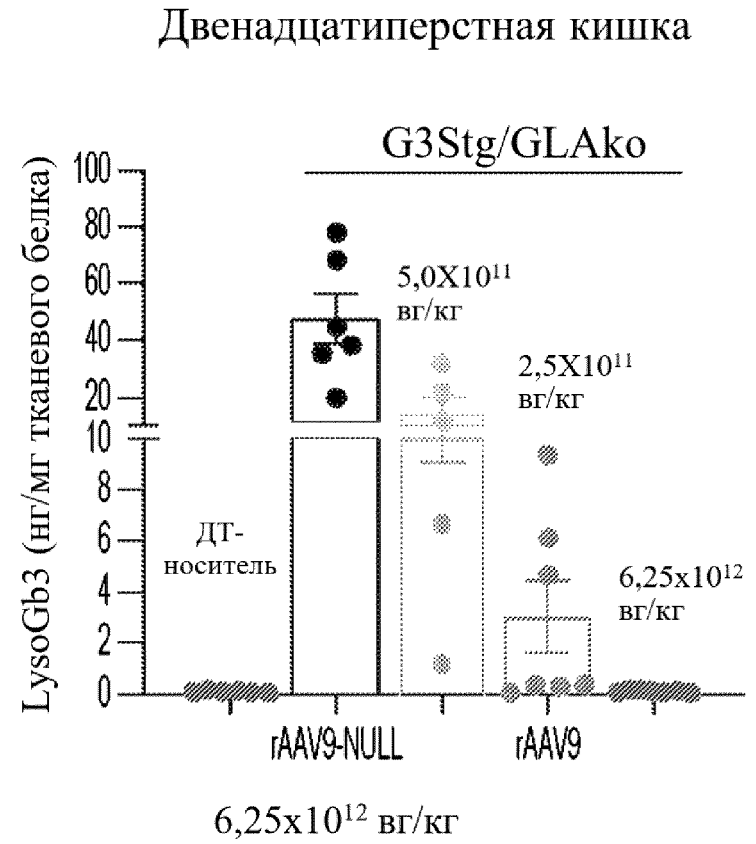
ФИГ. 5G



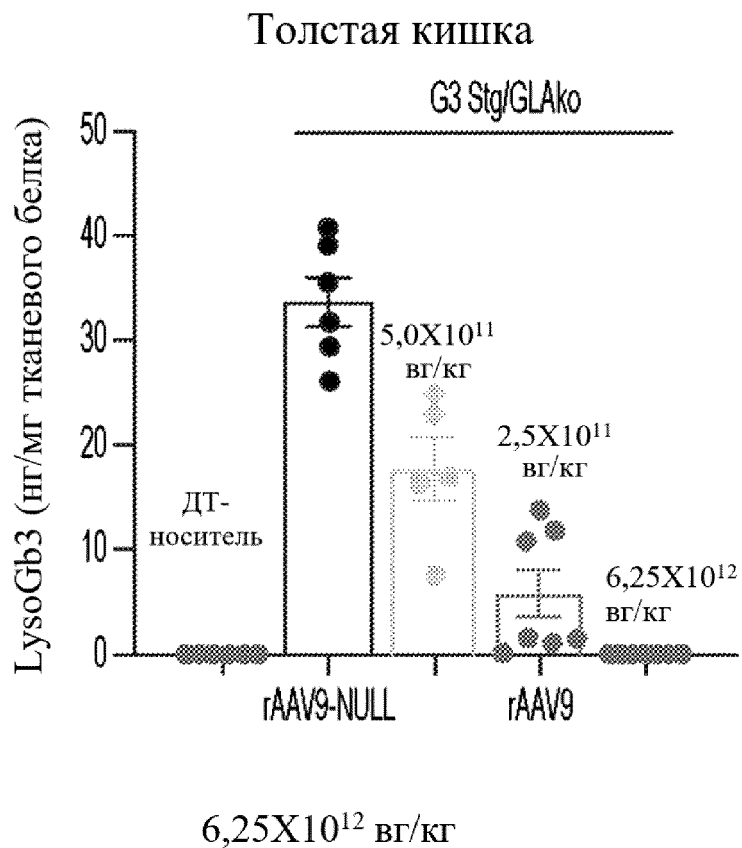
ФИГ. 5H



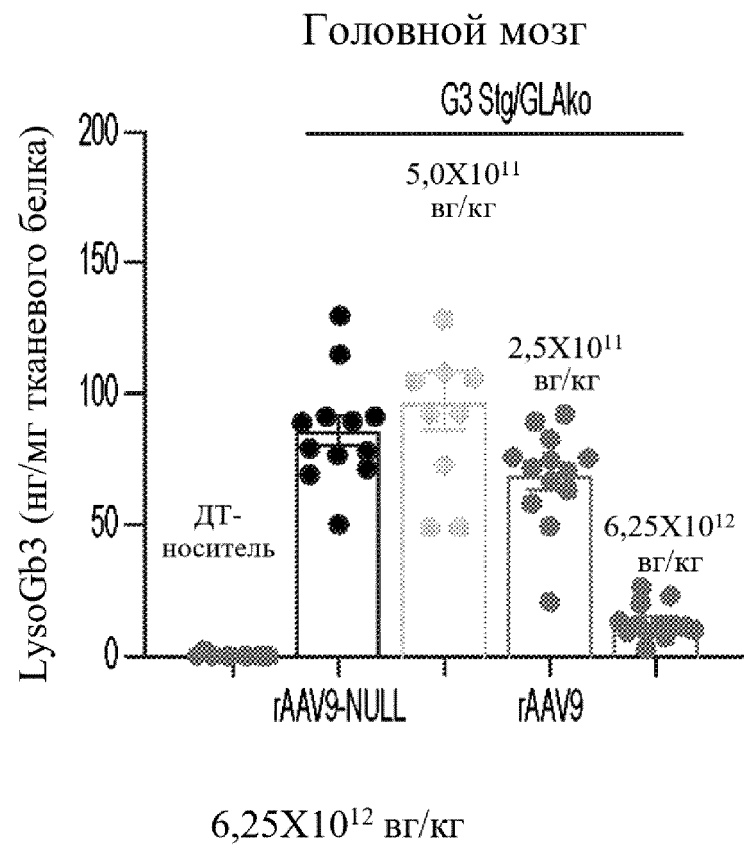
ФИГ. 5I



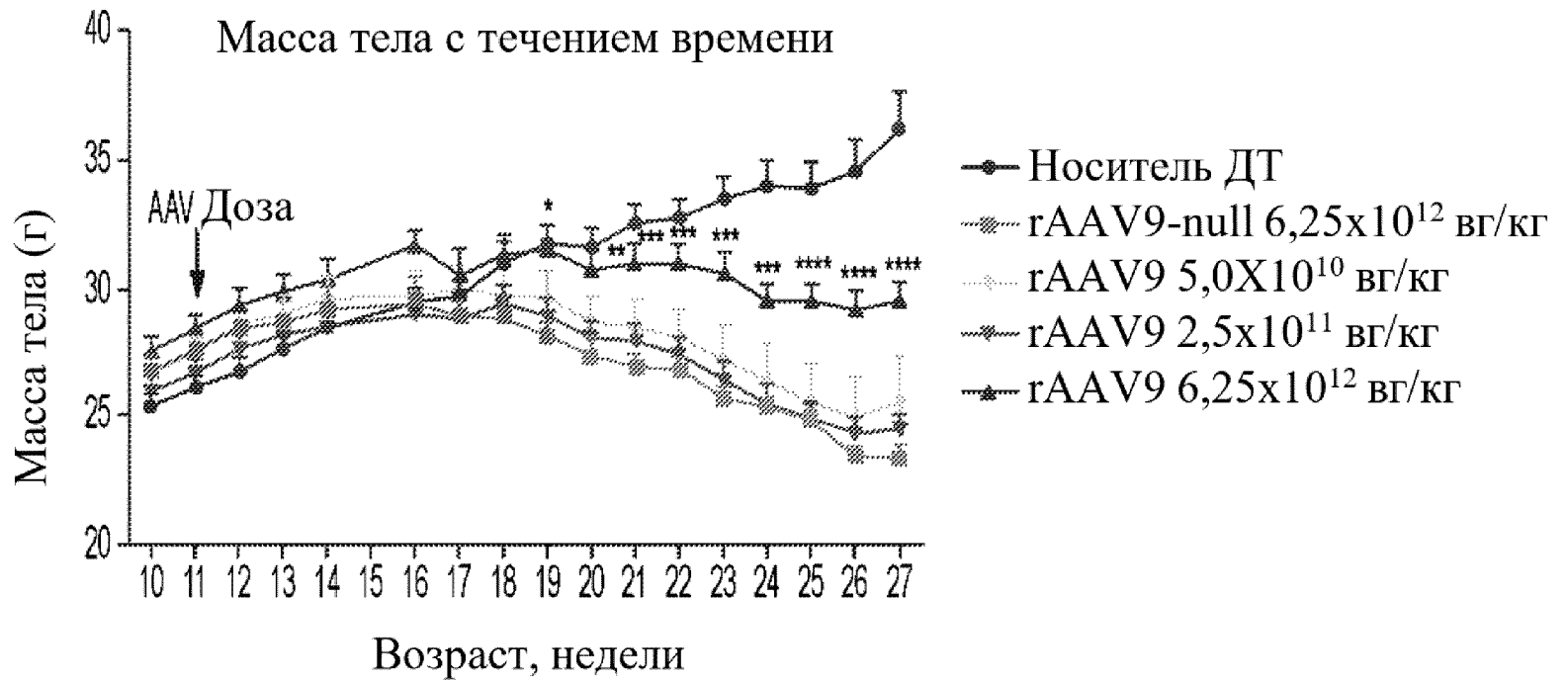
ФИГ. 5J



ФИГ. 5К

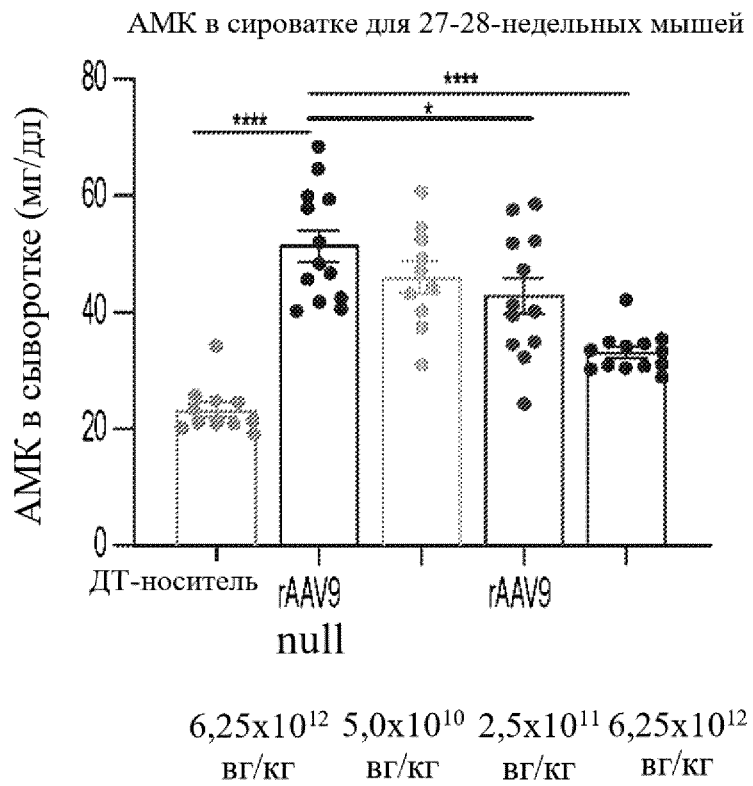


ФИГ. 5L



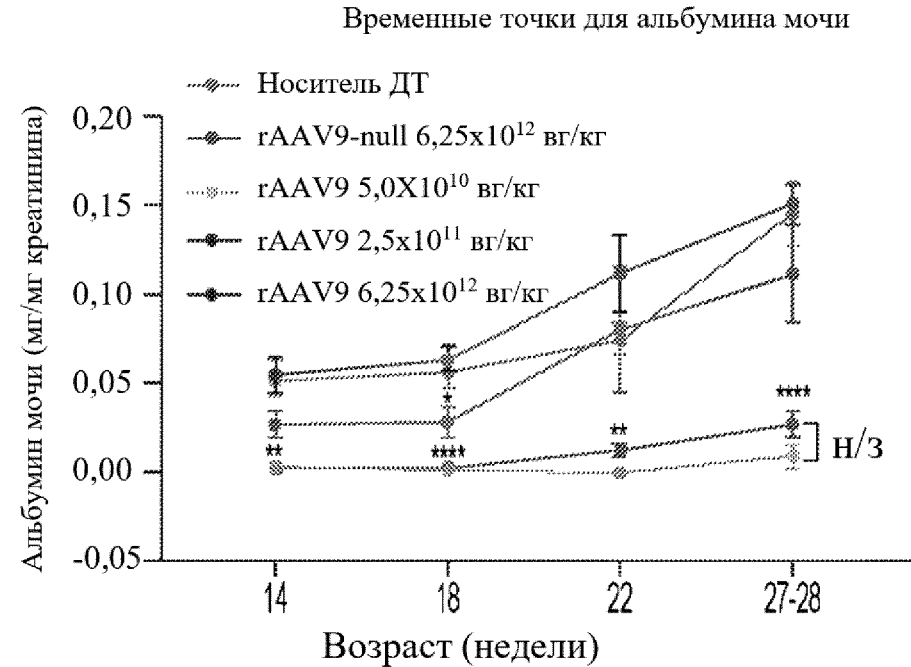
P < 0,01, *P < 0,001, ****P < 0,0001 vs. MY011, ANOVA

ФИГ. 6



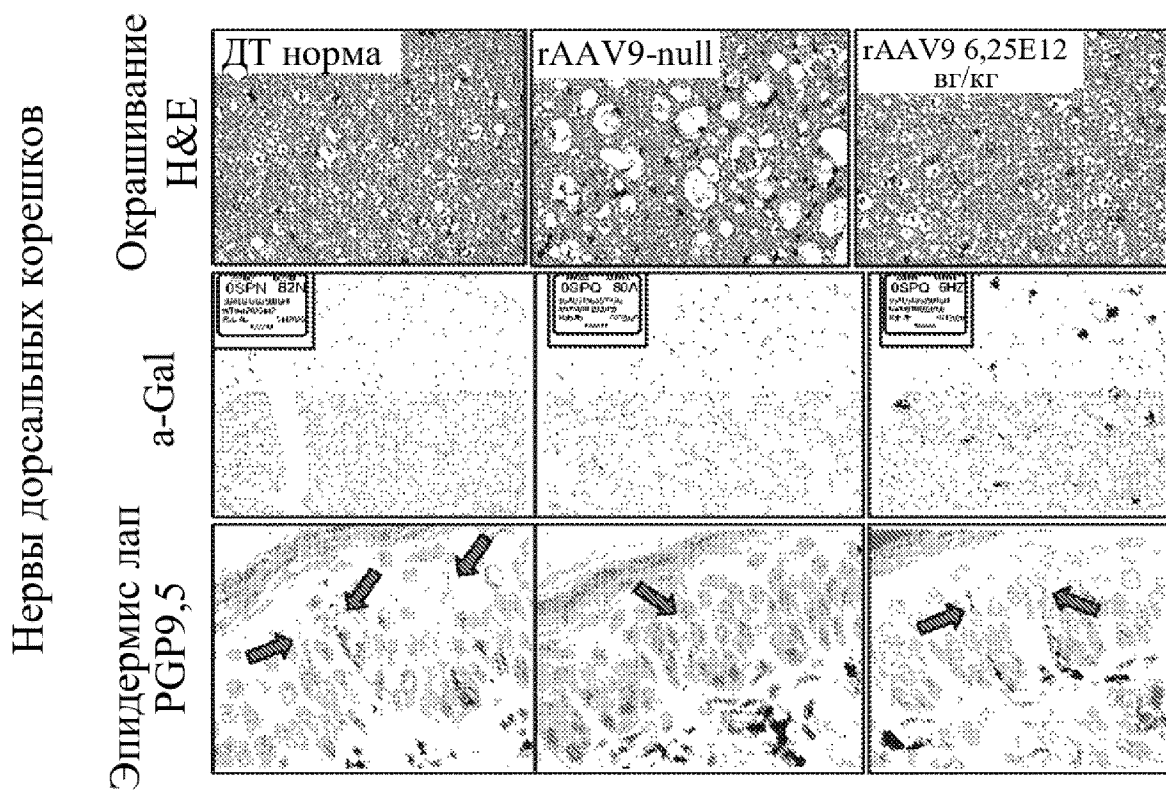
ФИГ. 7А

*P < 0,05, ***P < 0,0001, vs. rAAV9-MY011, односторонний дисперсионный анализ (ANOVA)

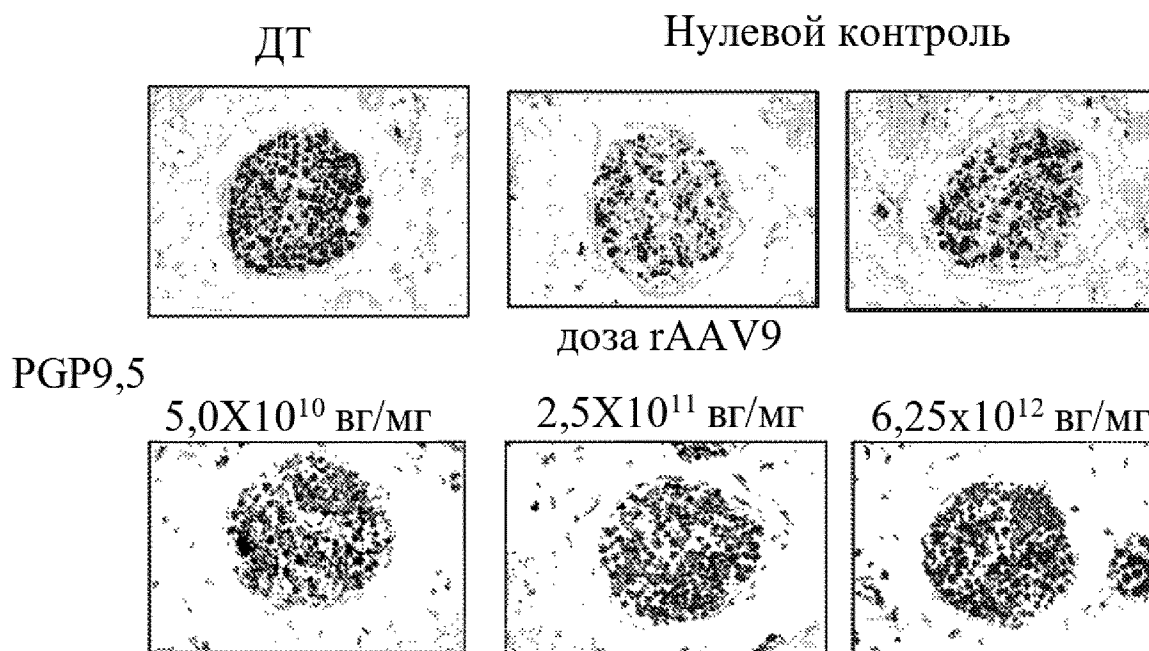


*P < 0,05, **P < 0,01, ****P < 0,0001, vs. rAAV9-MY011, двусторонний дисперсионный анализ (ANOVA) со смешанными эффектами

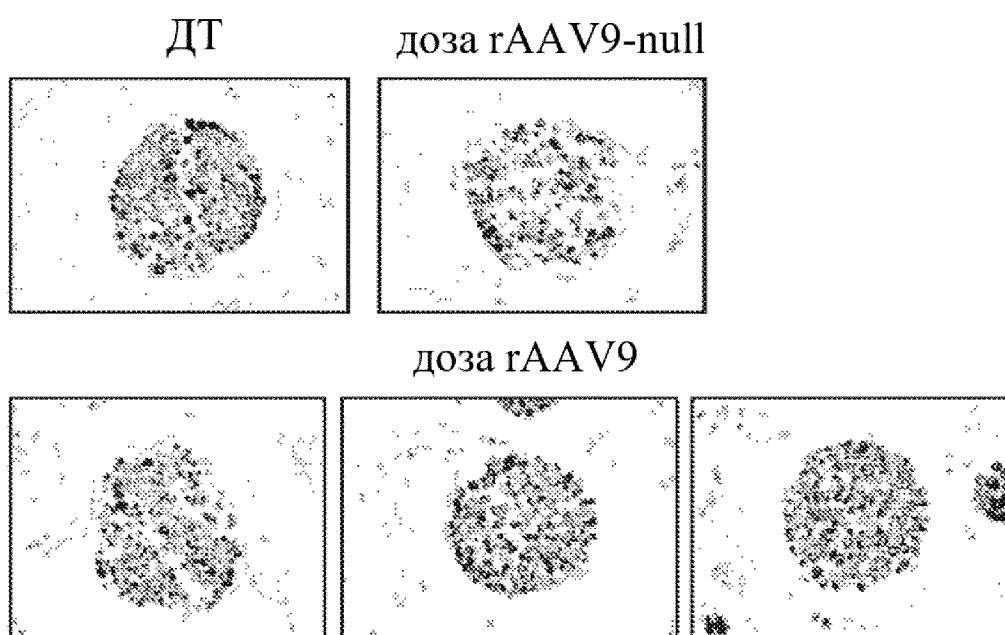
ФИГ. 7В



ФИГ. 8А



ФИГ. 8В



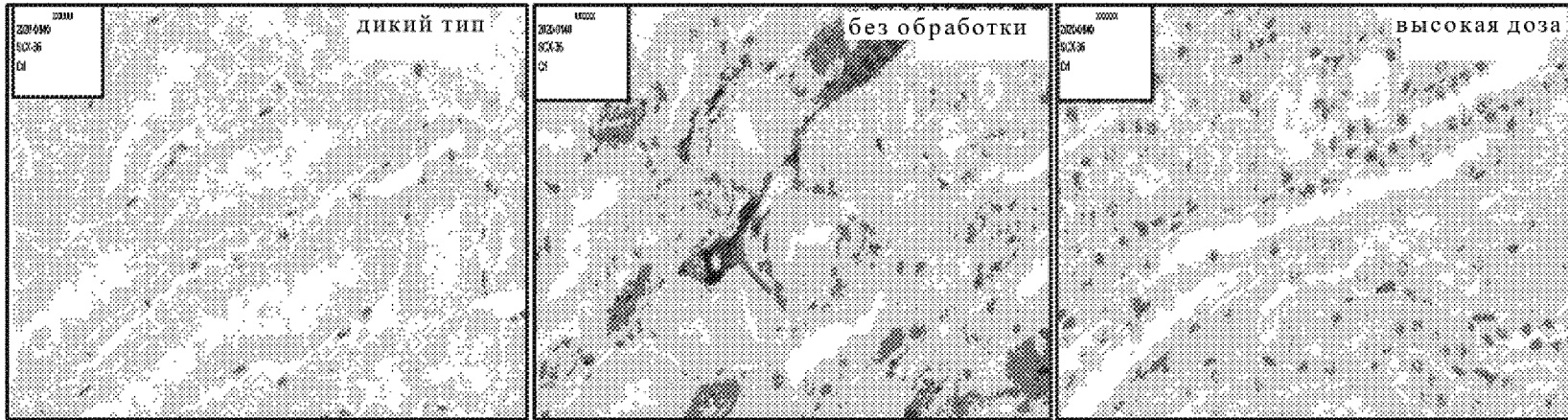
ФИГ. 8С

Почка

ДИКИЙ ТИП

Без обработки

ВЫСОКАЯ ДОЗА

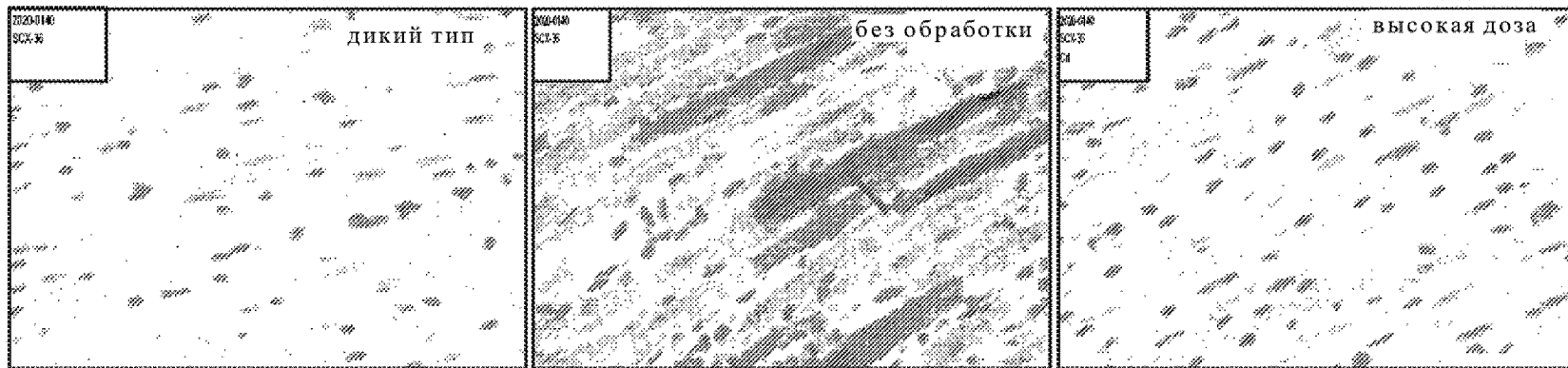


ФИГ. 9А
ДИКИЙ ТИП

ФИГ. 9В
Без обработки

ФИГ. 9С
ВЫСОКАЯ ДОЗА

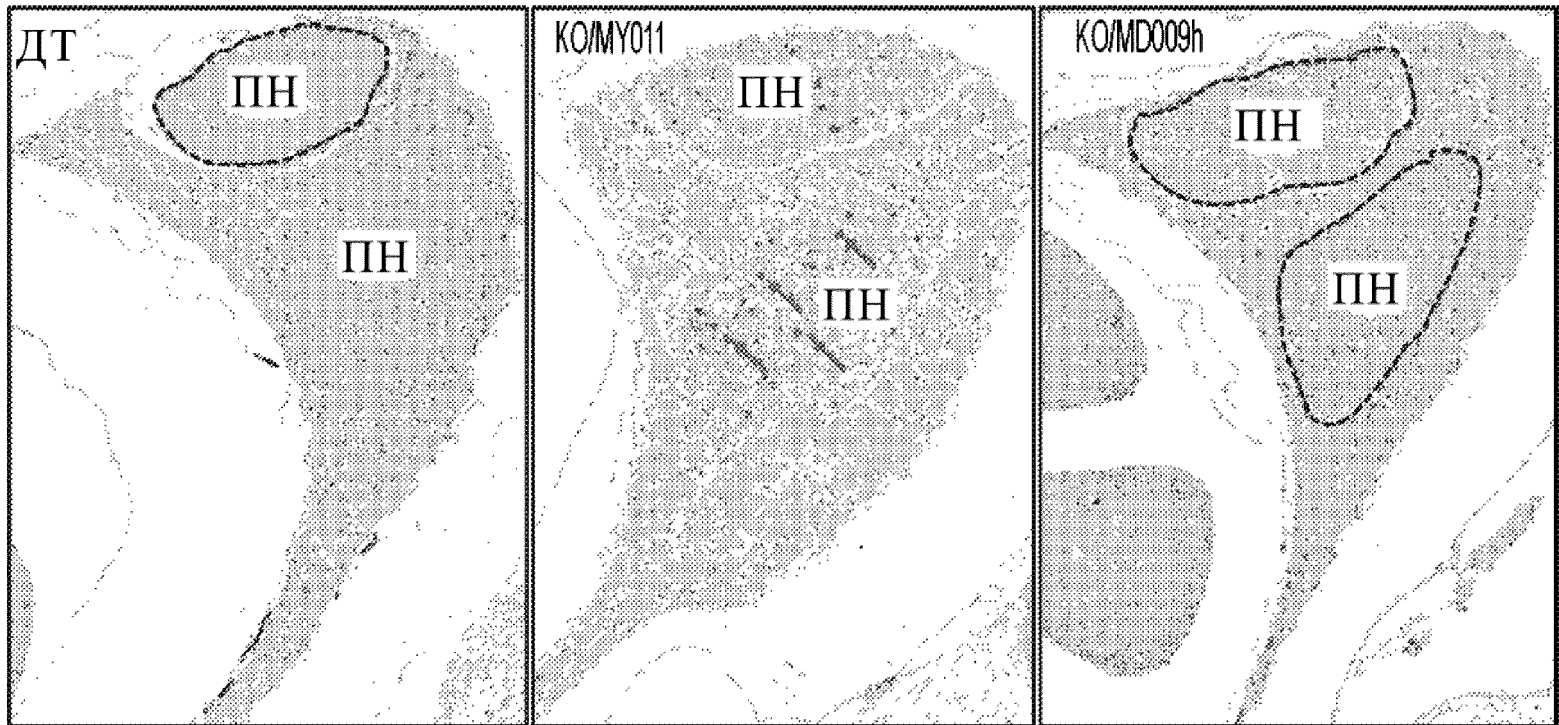
сердце



ФИГ. 9D

ФИГ. 9E

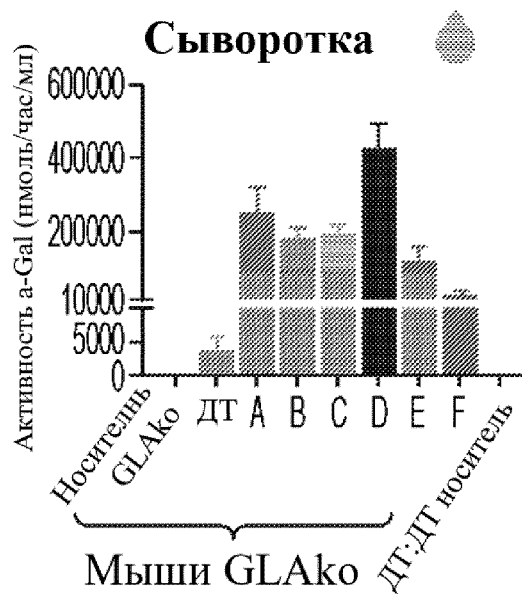
ФИГ. 9F



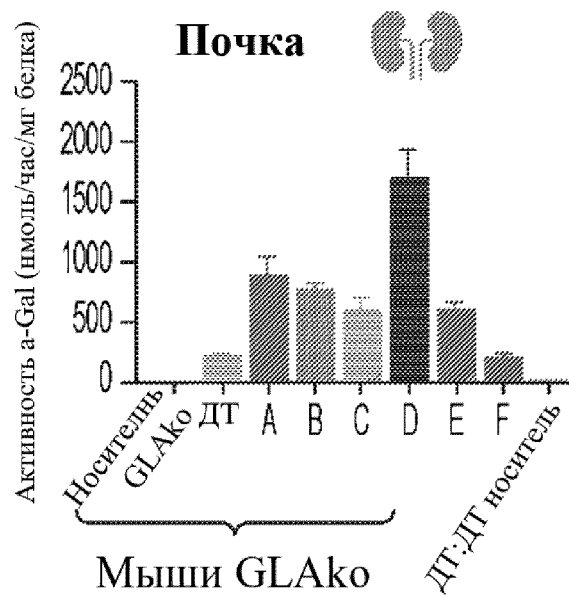
ФИГ. 9Г

ФИГ. 9Н

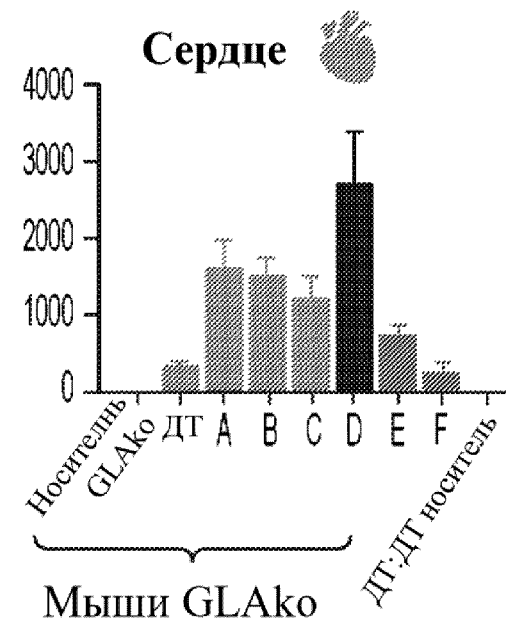
ФИГ. 9І



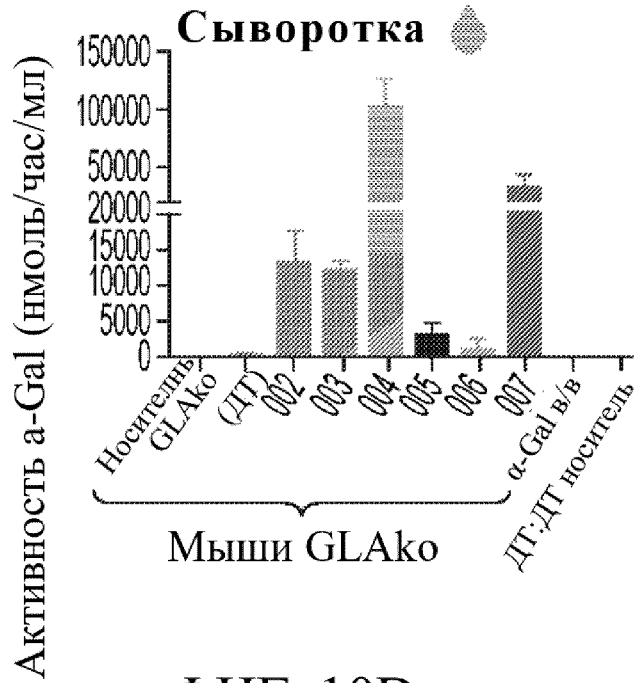
ФИГ. 10А



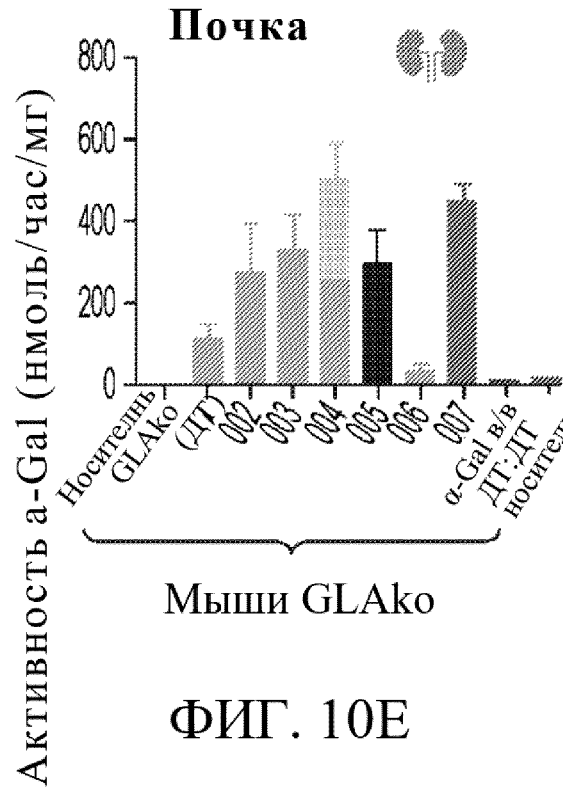
ФИГ. 10В



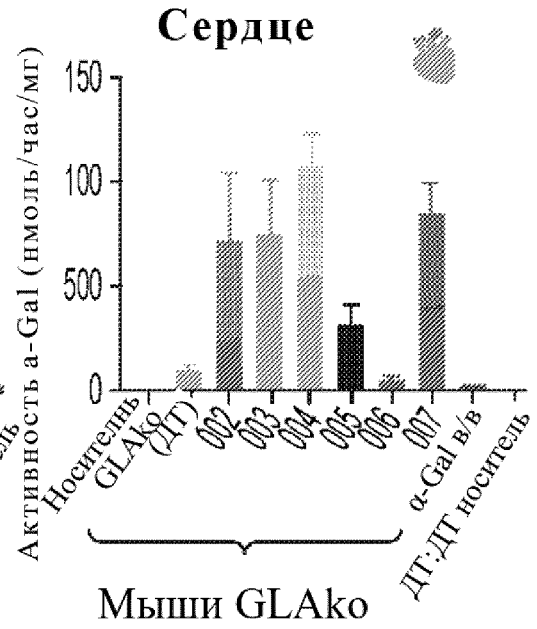
ФИГ. 10С



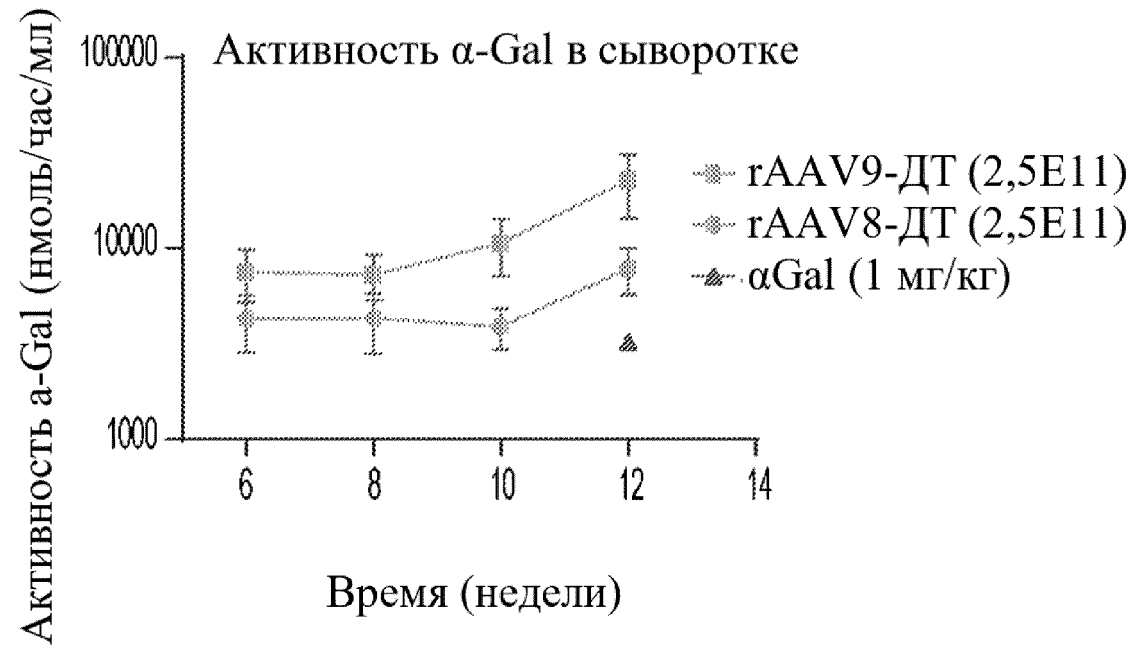
ФИГ. 10D



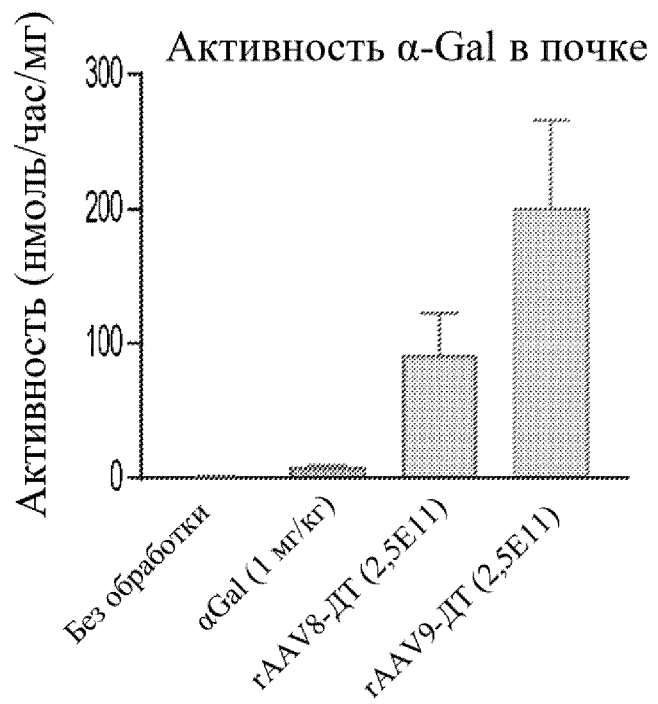
ФИГ. 10E



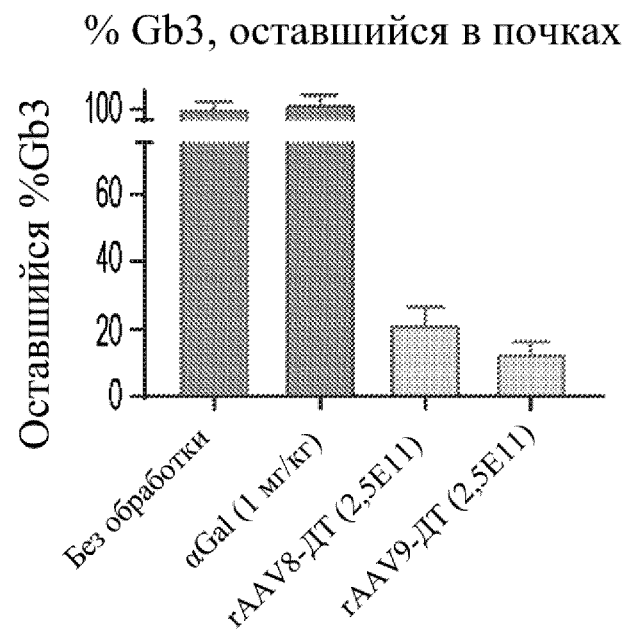
ФИГ. 10F



ФИГ. 11А

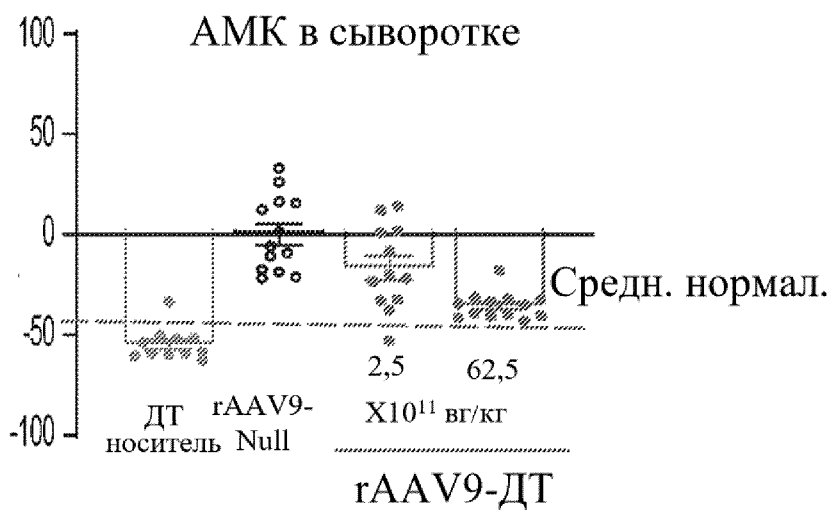


ФИГ. 11В

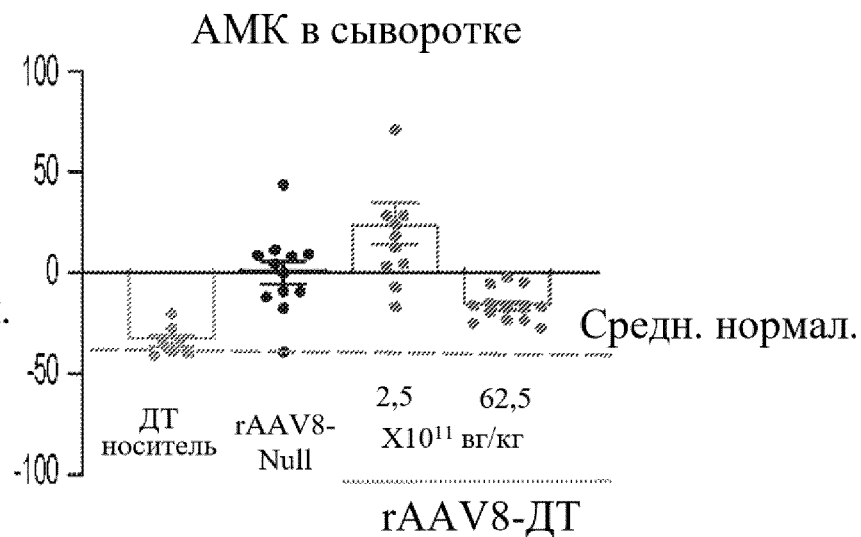


ФИГ. 11С

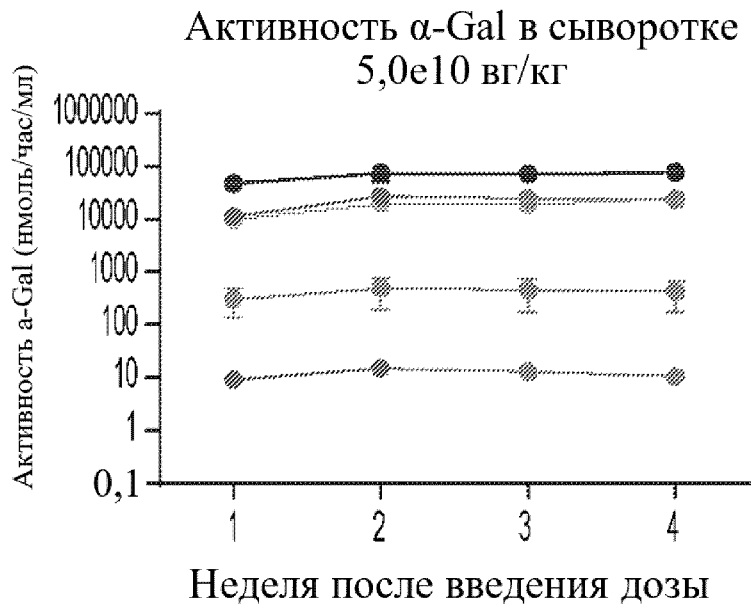
% изменения по сравнению с нулевым контролем



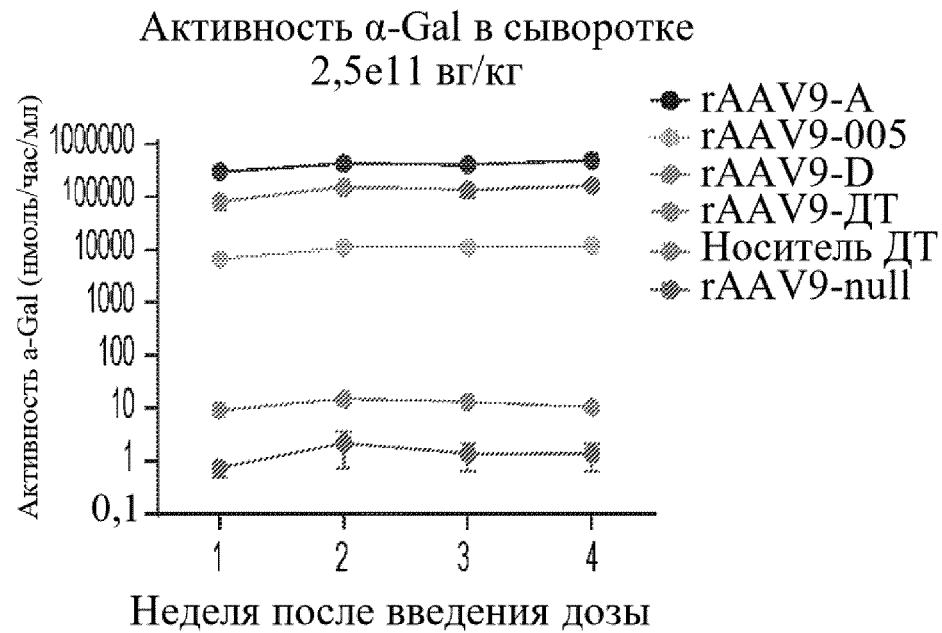
ФИГ. 12А



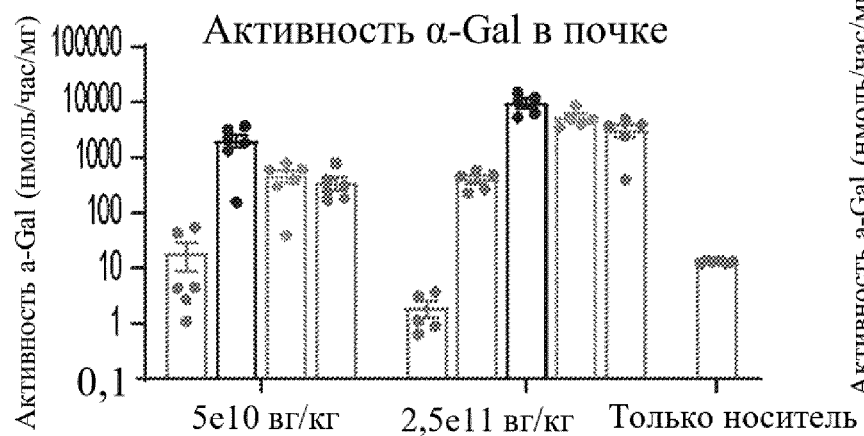
ФИГ. 12В



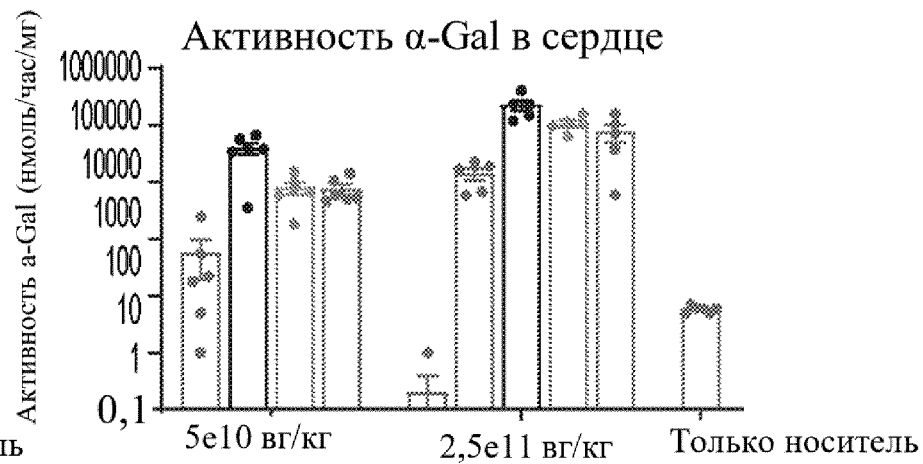
ФИГ. 13А



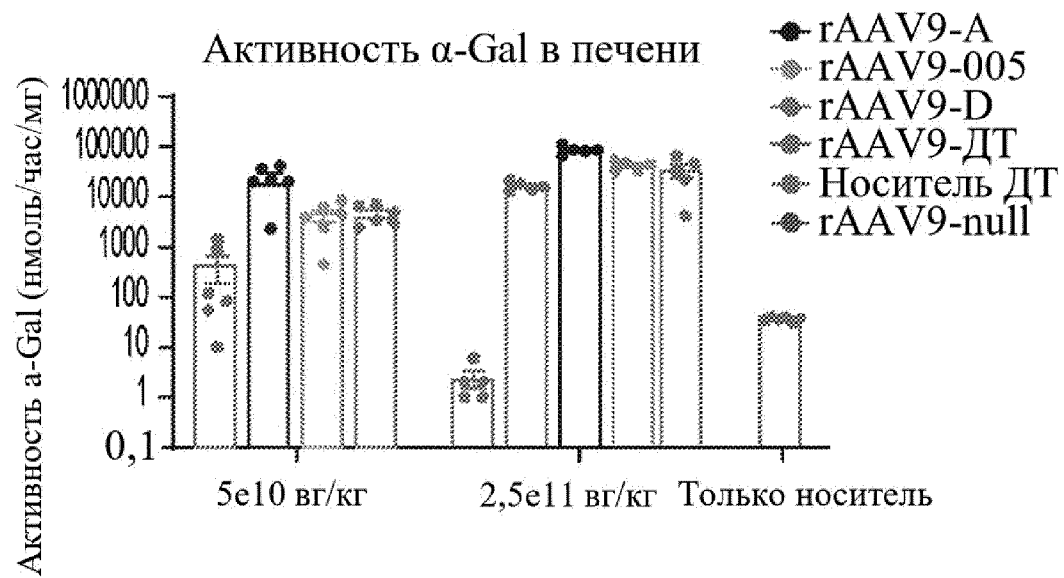
ФИГ. 13В



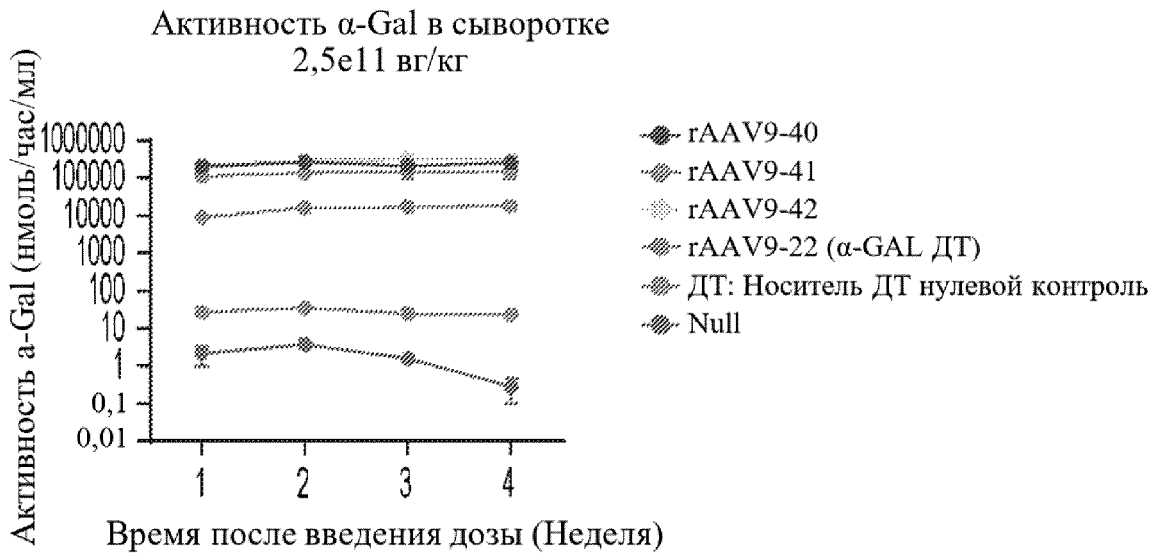
ФИГ. 13С



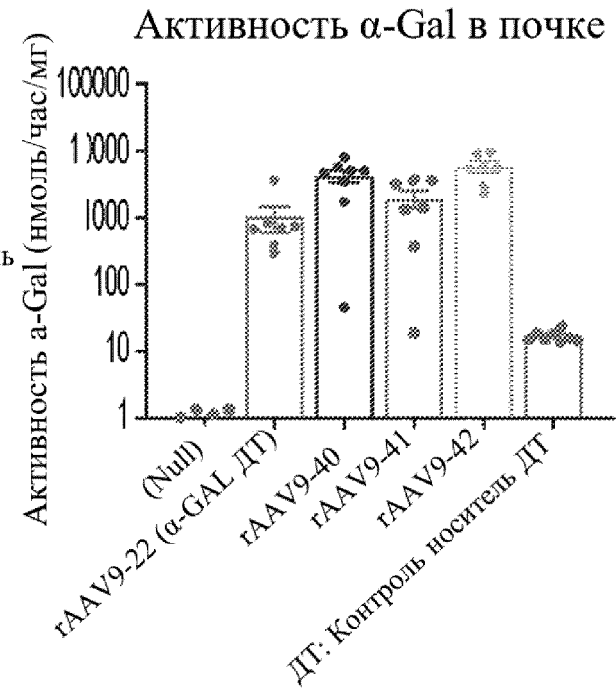
ФИГ. 13D



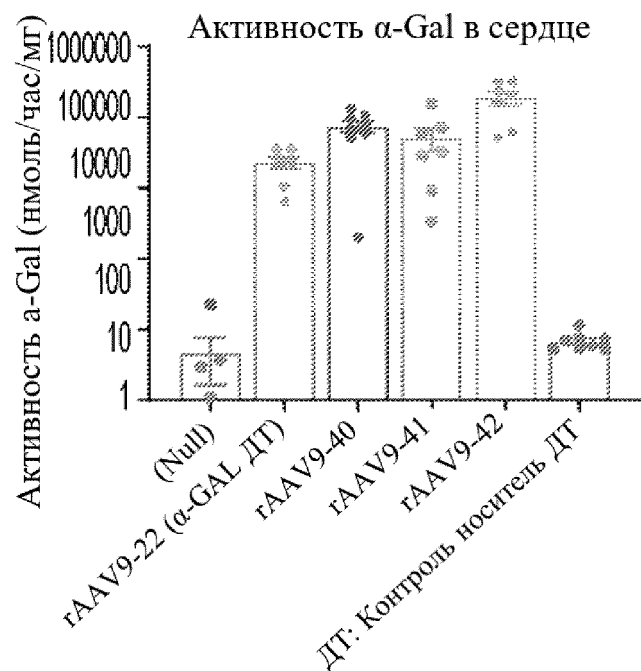
ФИГ. 13Е



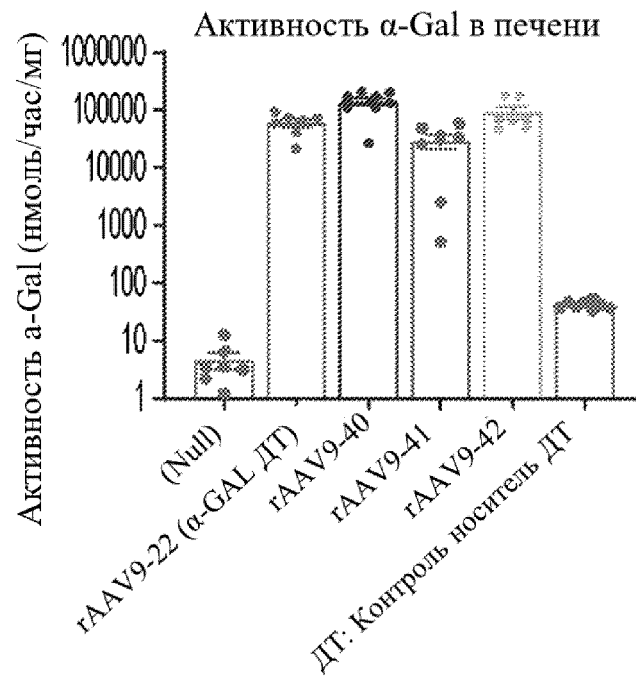
ФИГ. 14А



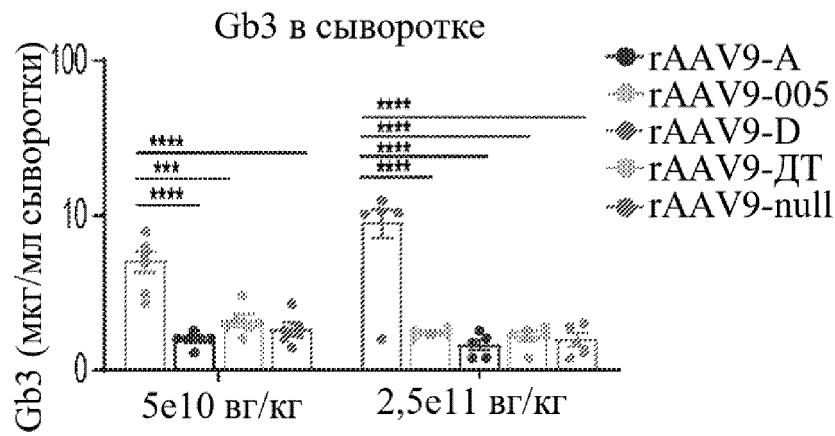
ФИГ. 14В



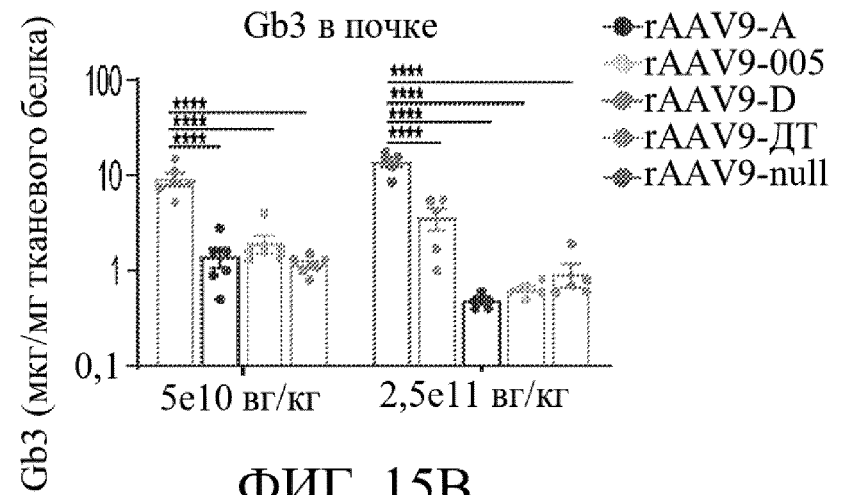
ФИГ. 14С



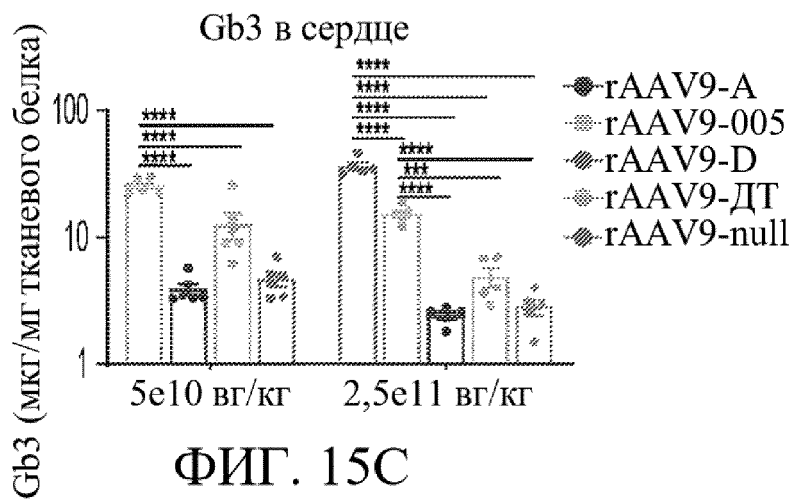
ФИГ. 14D



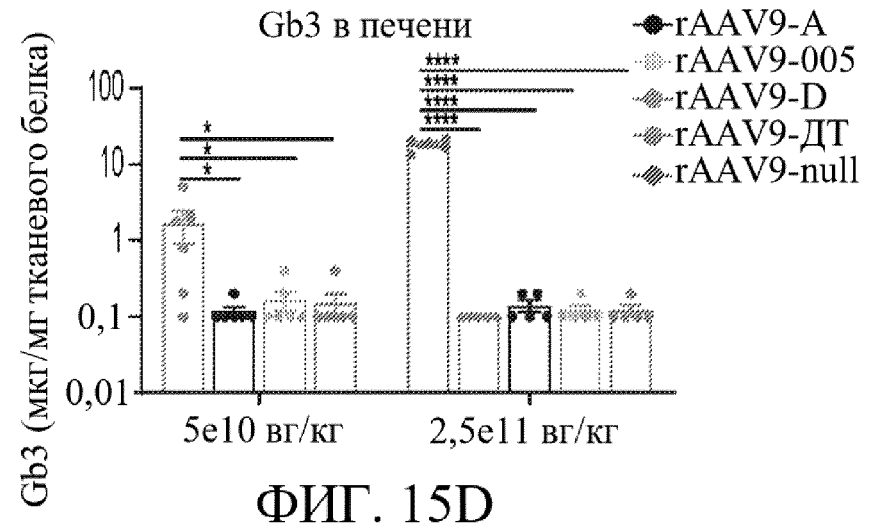
ФИГ. 15А



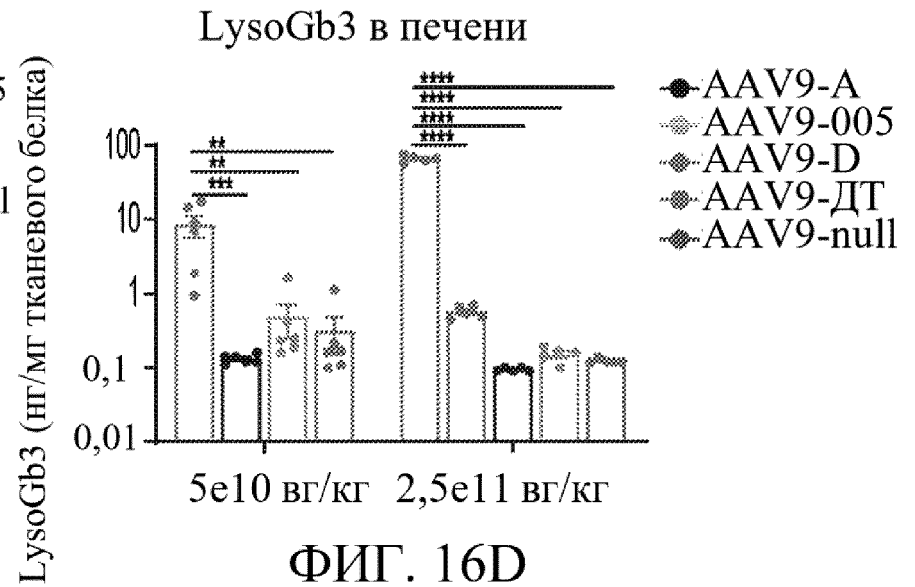
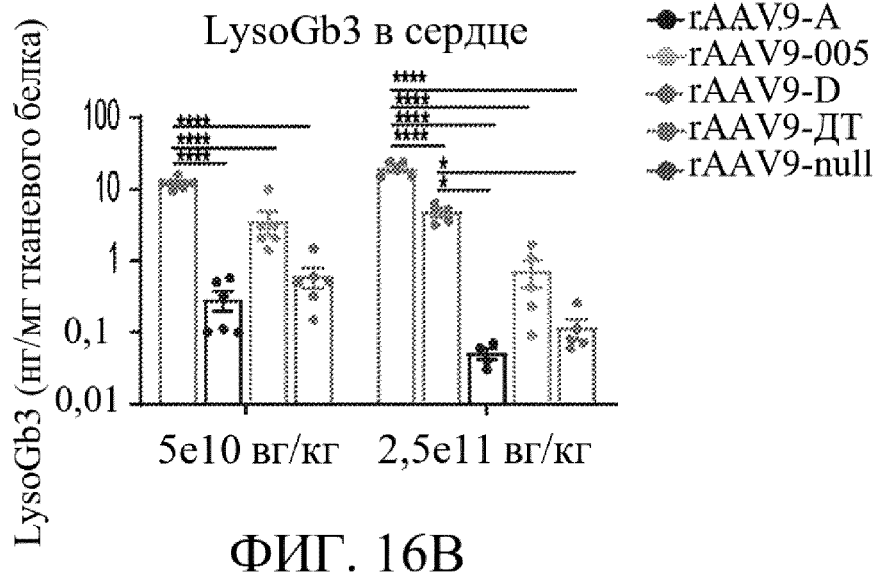
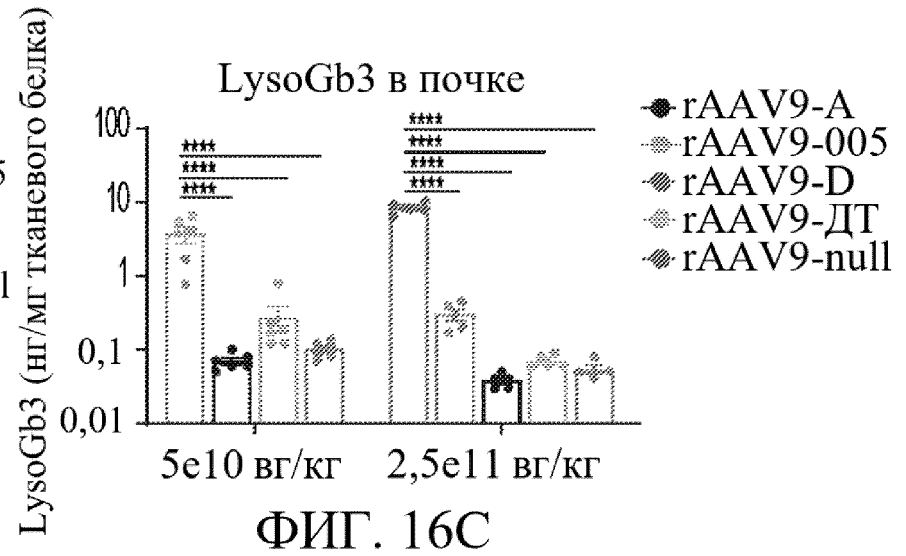
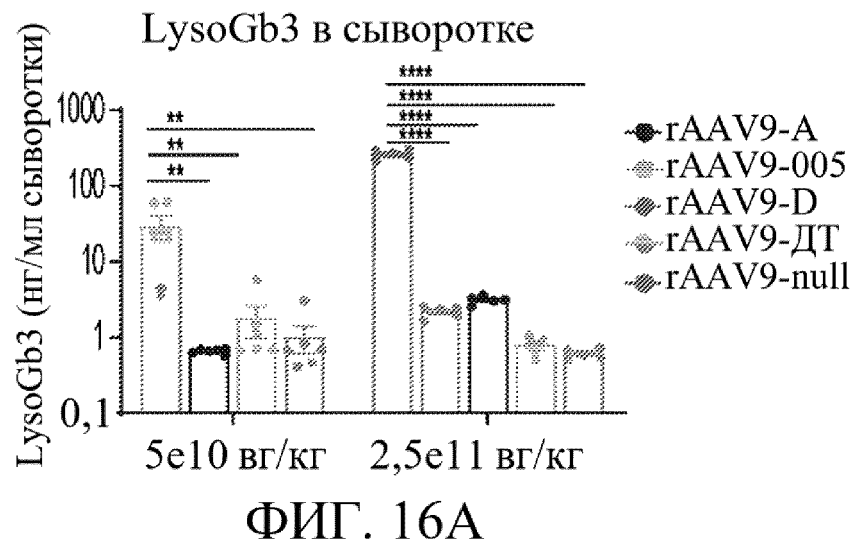
ФИГ. 15В

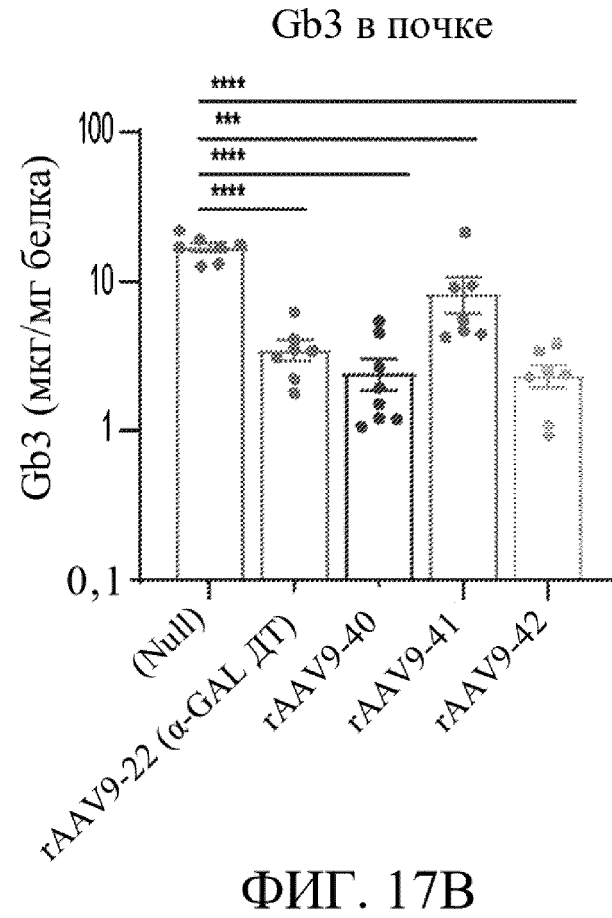
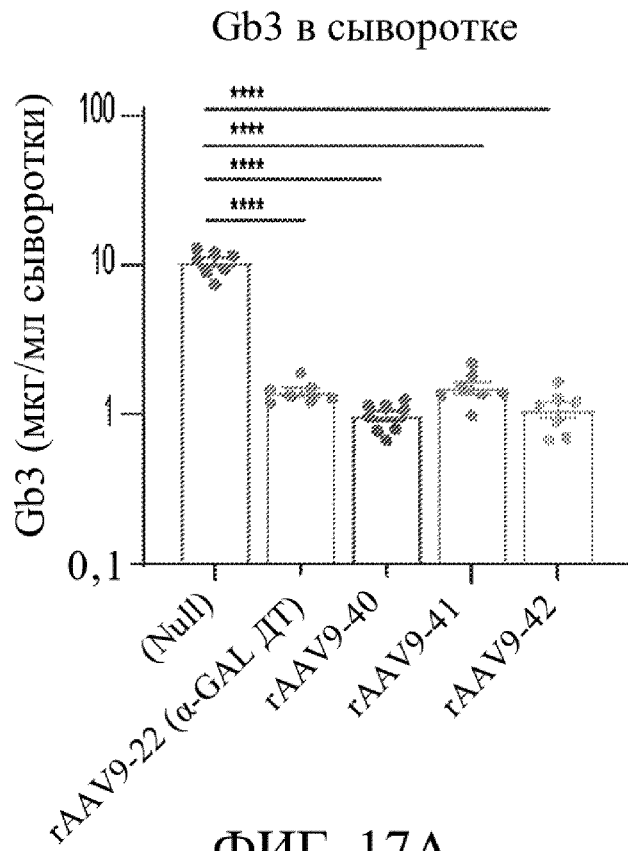


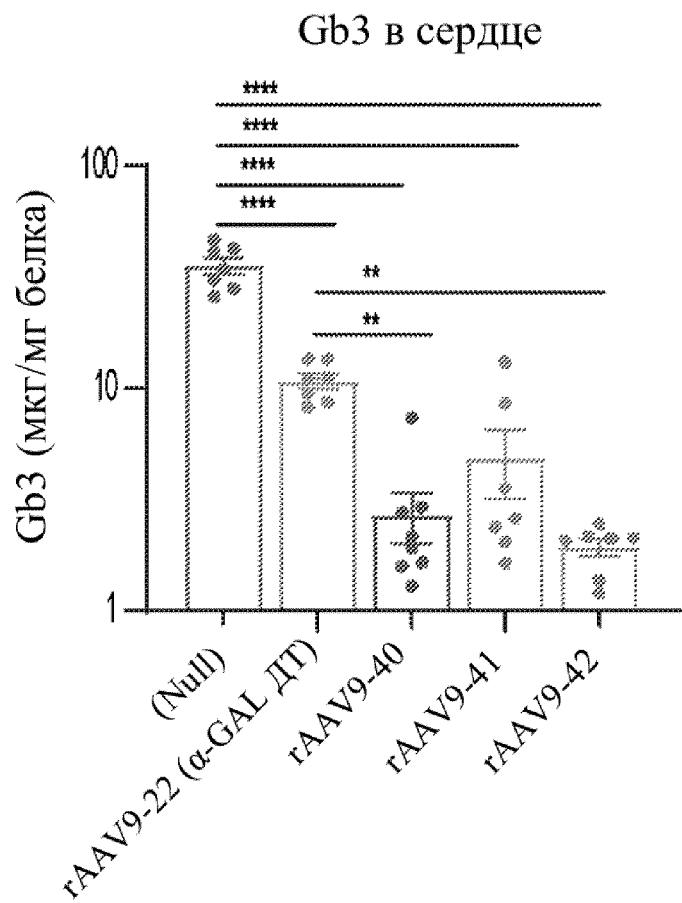
ФИГ. 15С



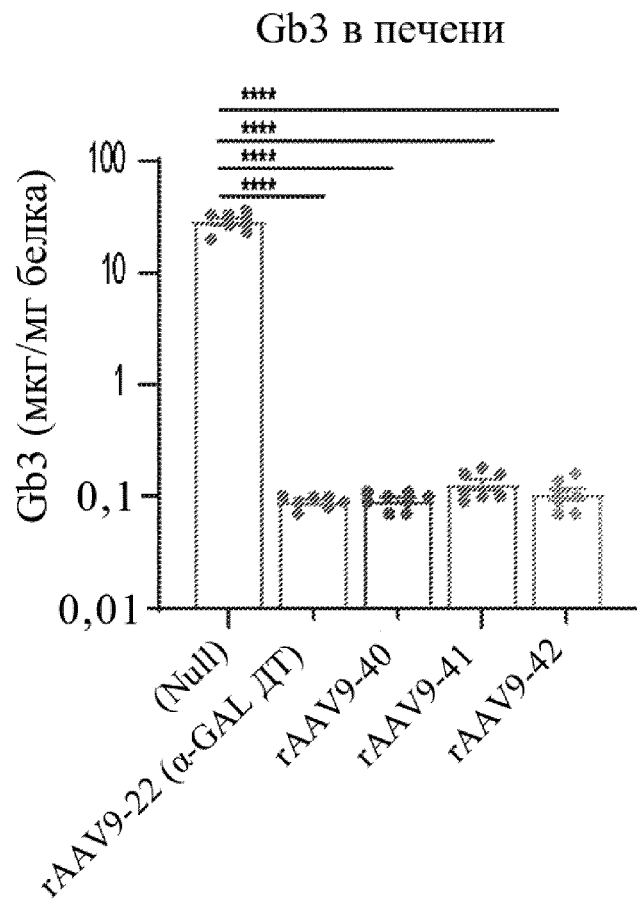
ФИГ. 15D





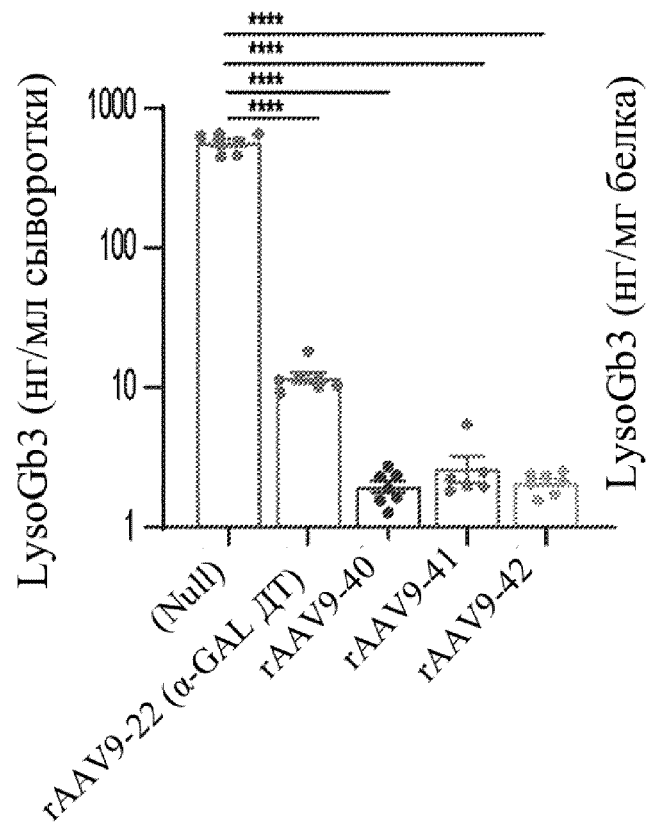


ФИГ. 17С



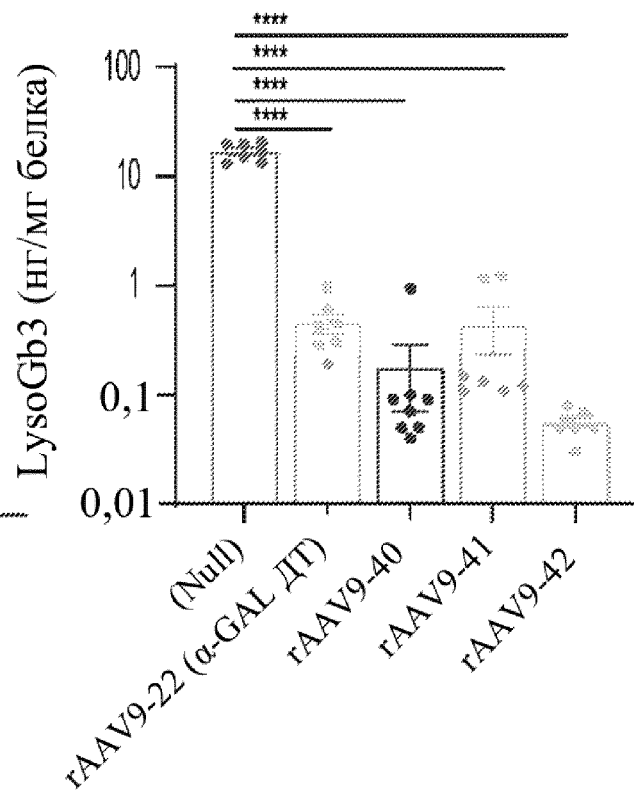
ФИГ. 17D

LysoGb3 в сыворотке

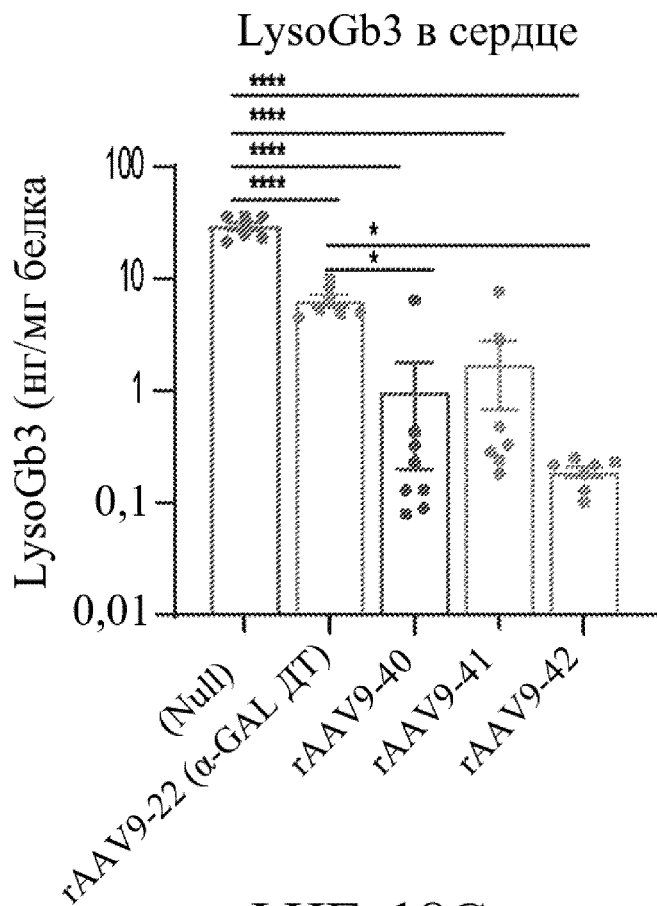


ФИГ. 18А

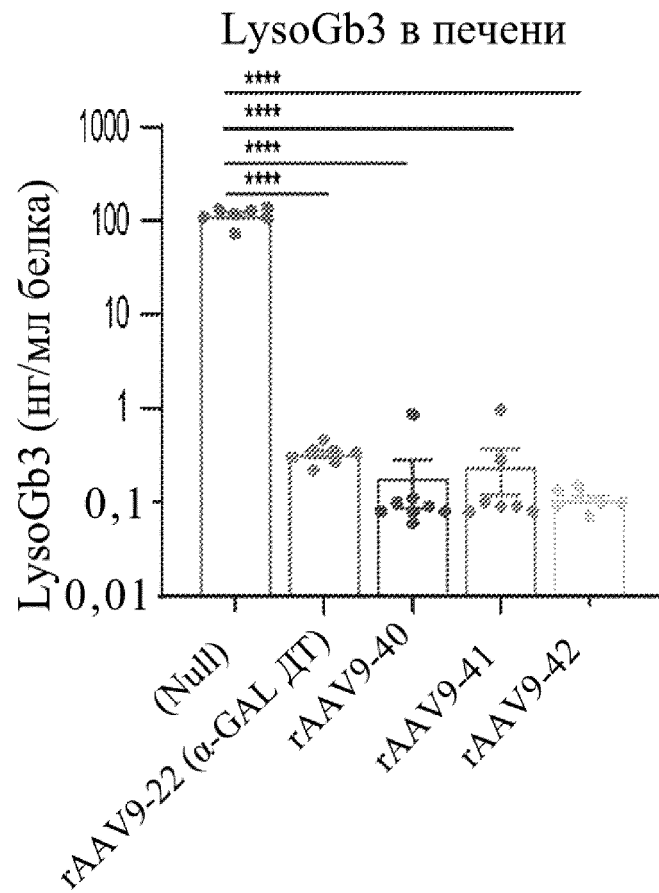
LysoGb3 в почке



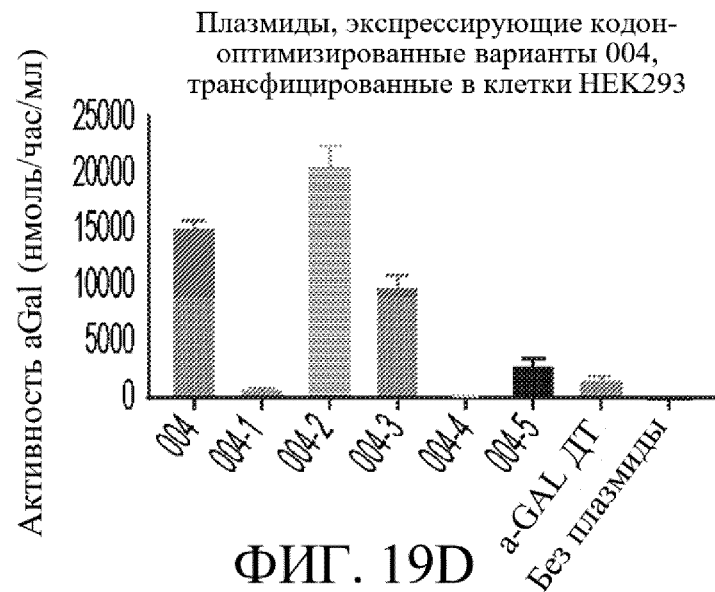
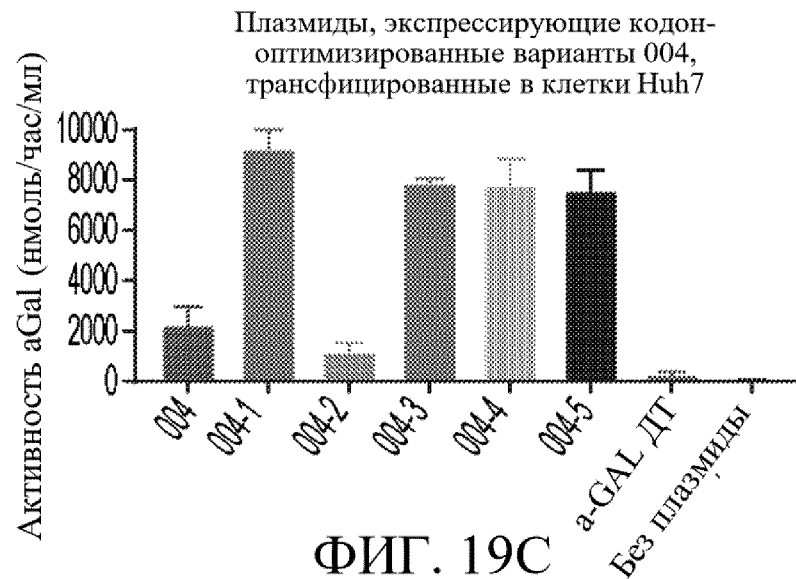
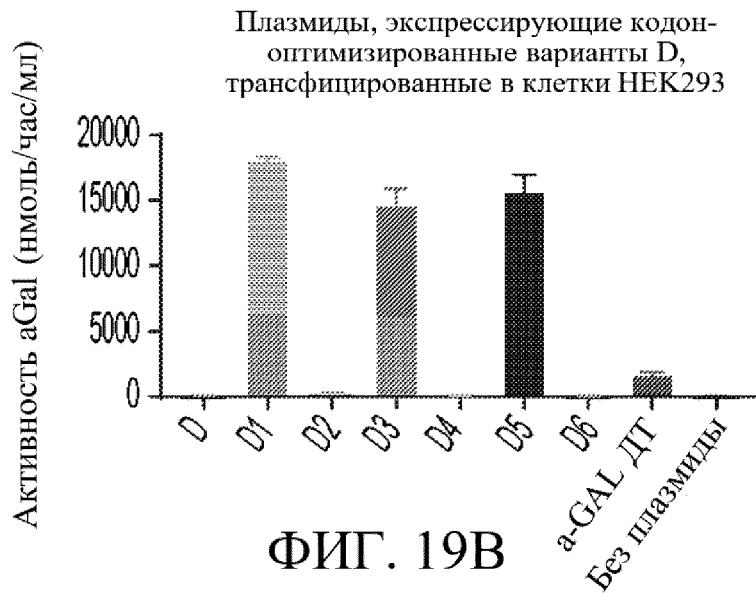
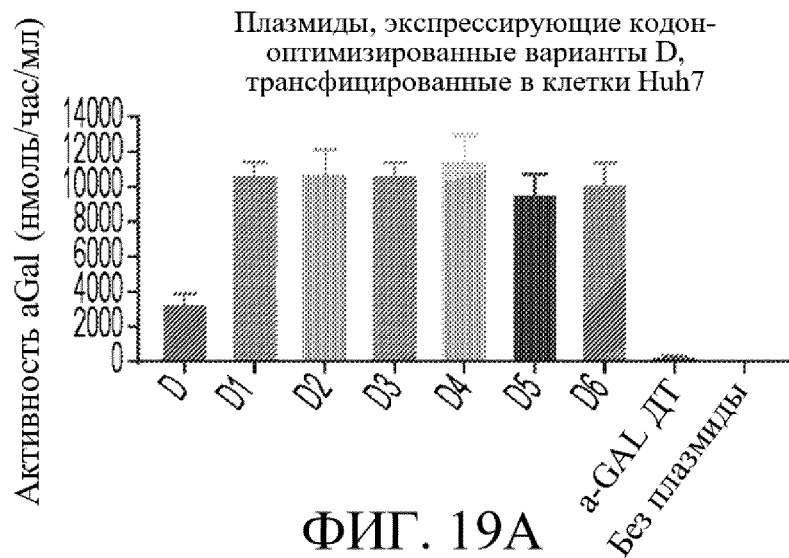
ФИГ. 18В



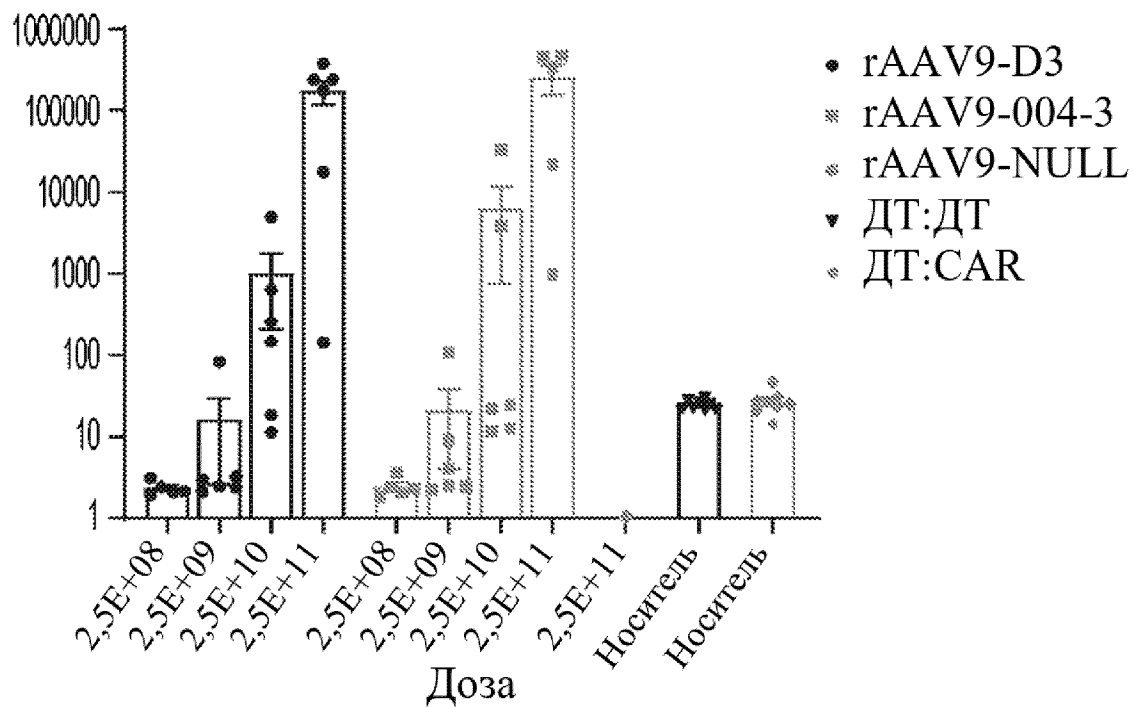
ФИГ. 18С



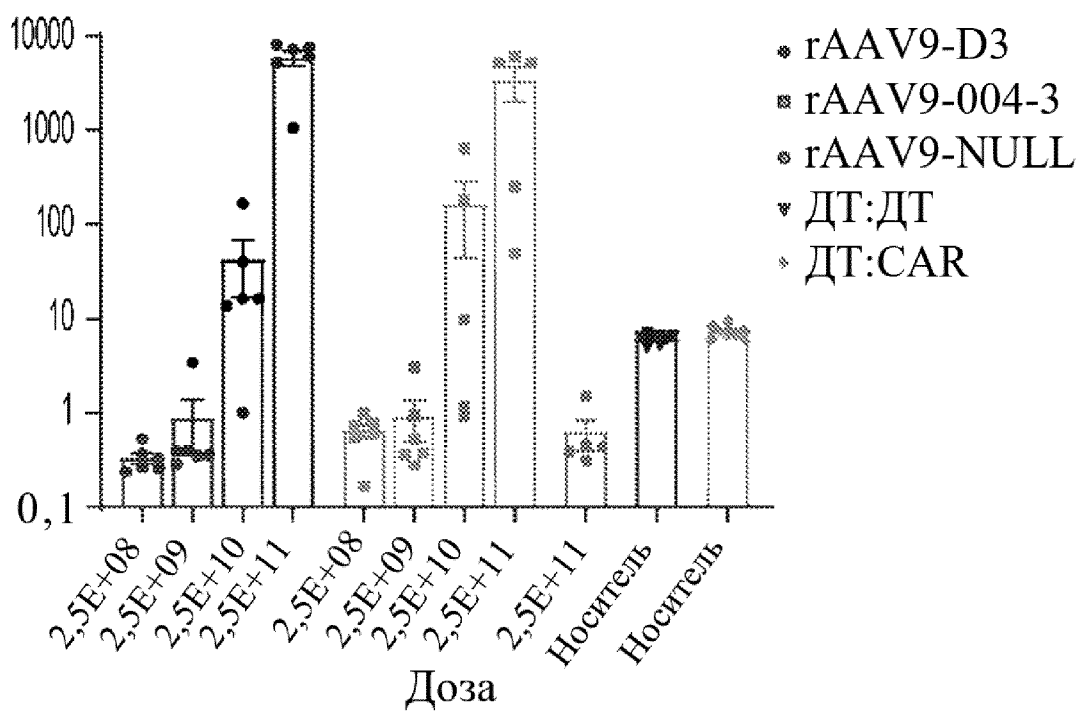
ФИГ. 18D



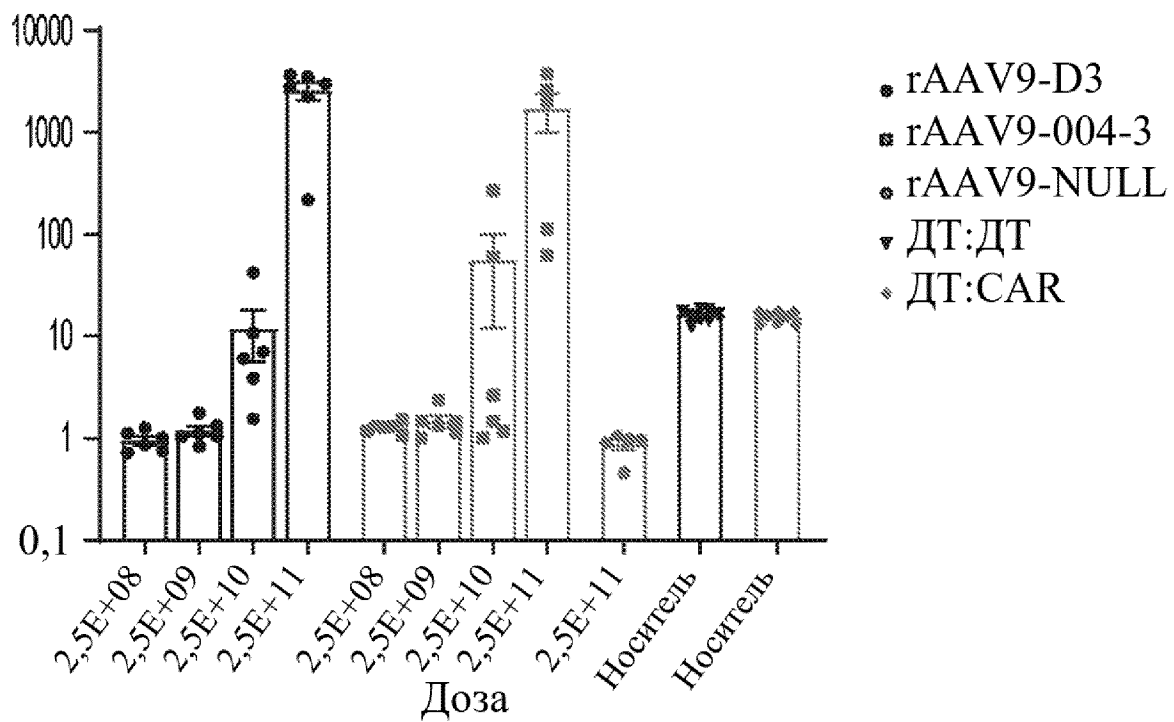
Конечная активность α -GAL в сыворотке



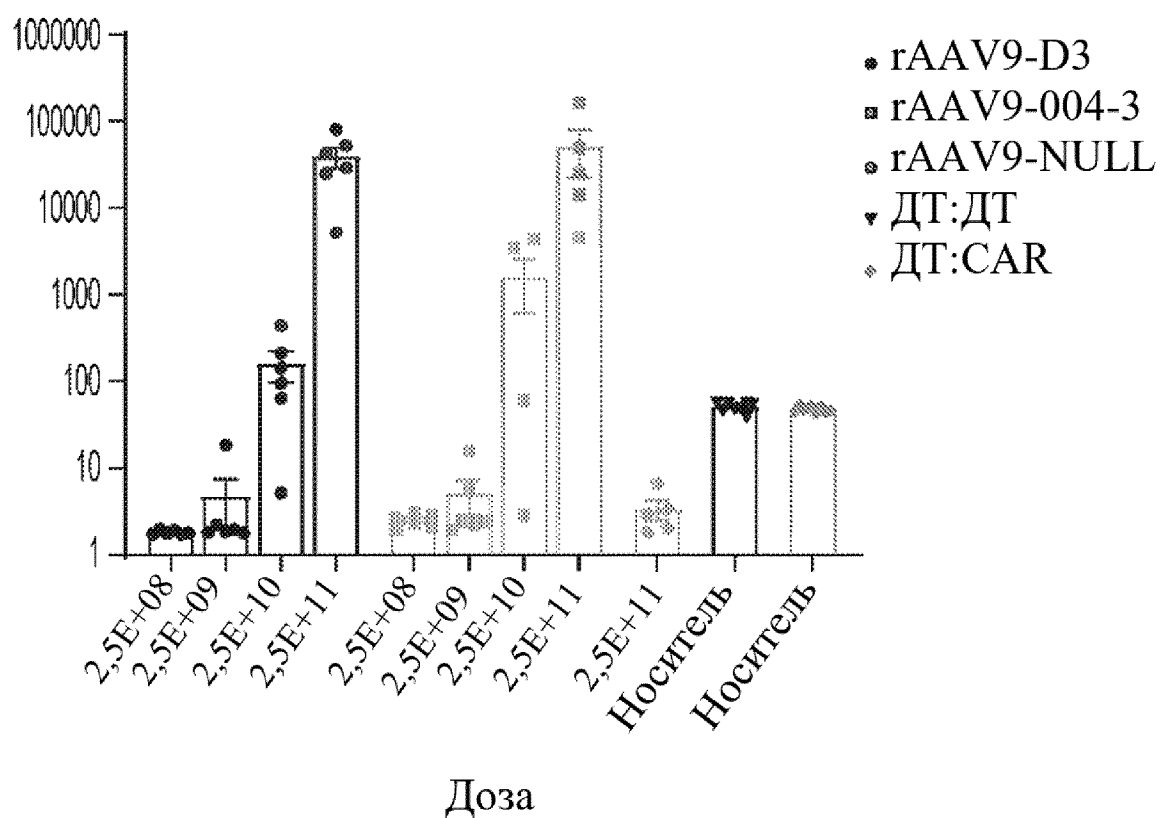
ФИГ. 20А

Активность α -GAL в сердце

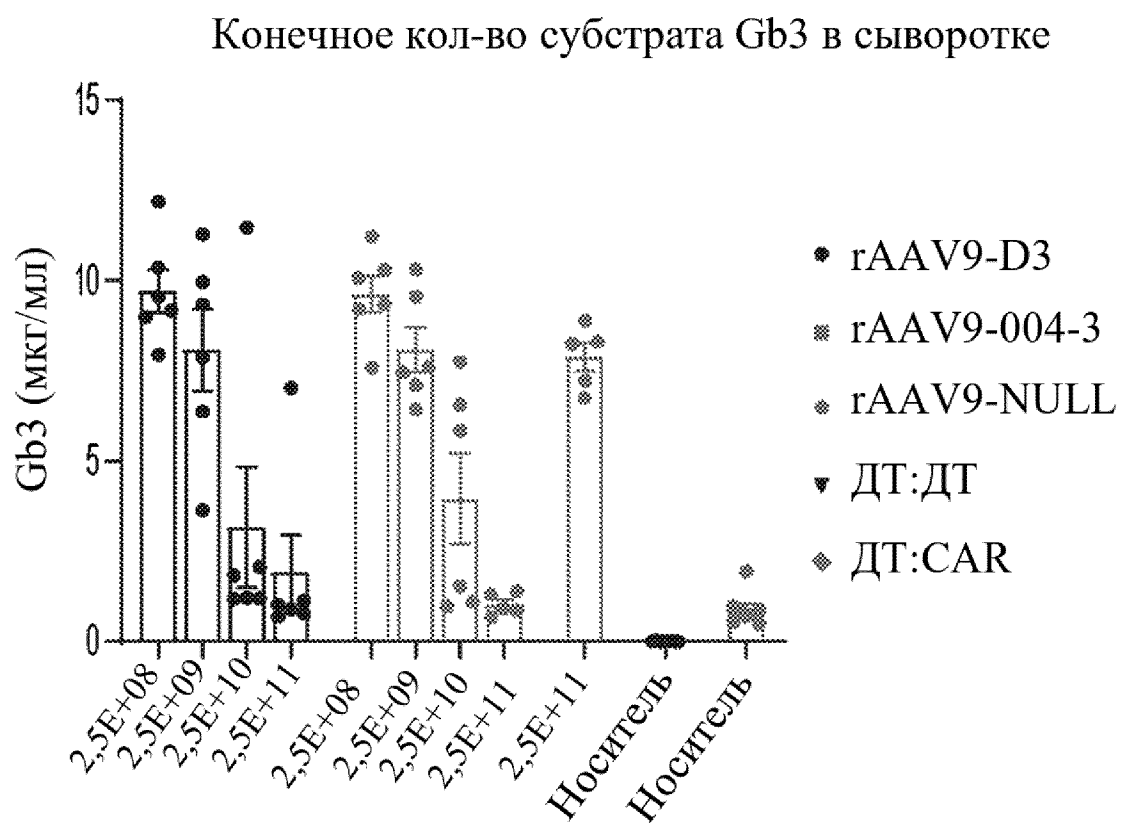
ФИГ. 20В

Активность α -GAL в почке

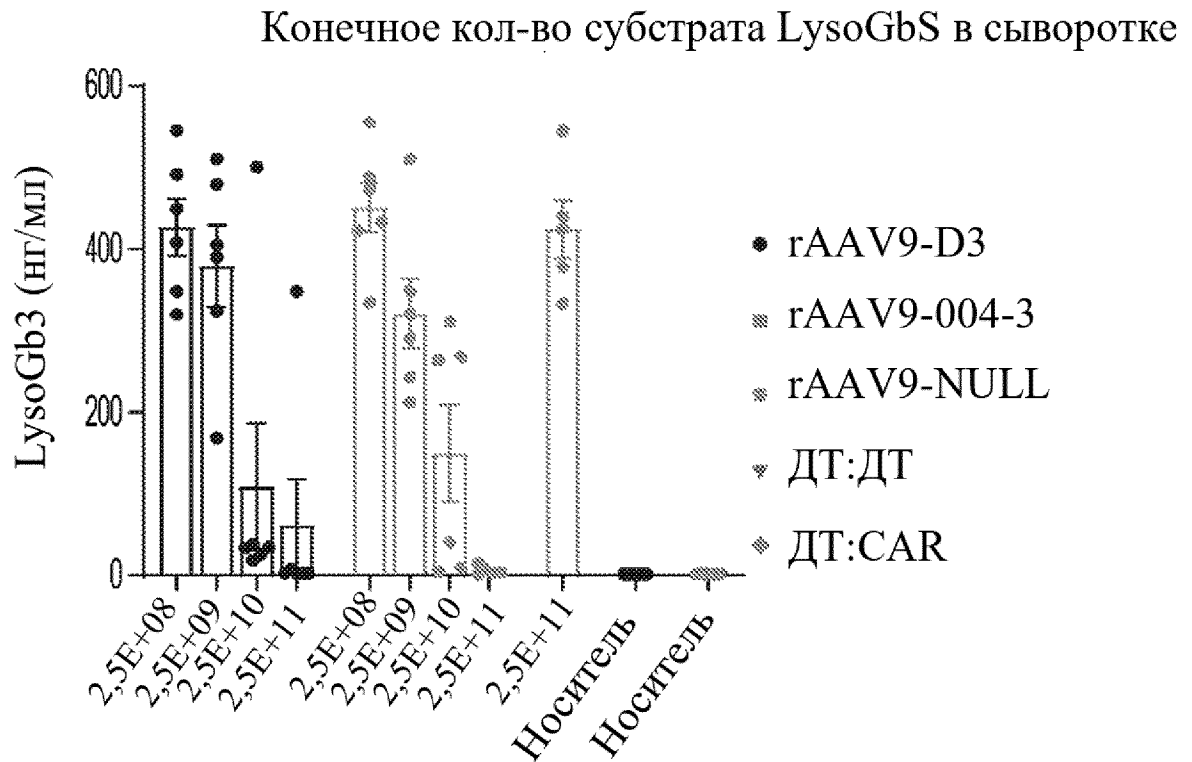
ФИГ. 20С

Активность α -GAL в печени

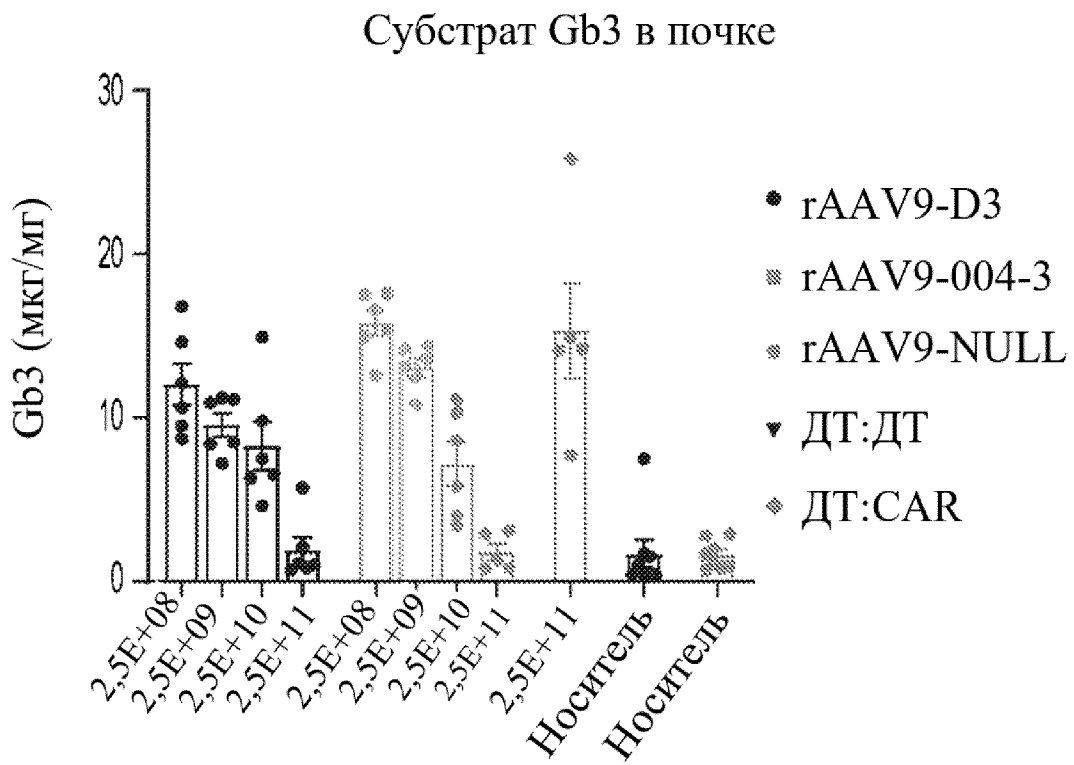
ФИГ. 20D



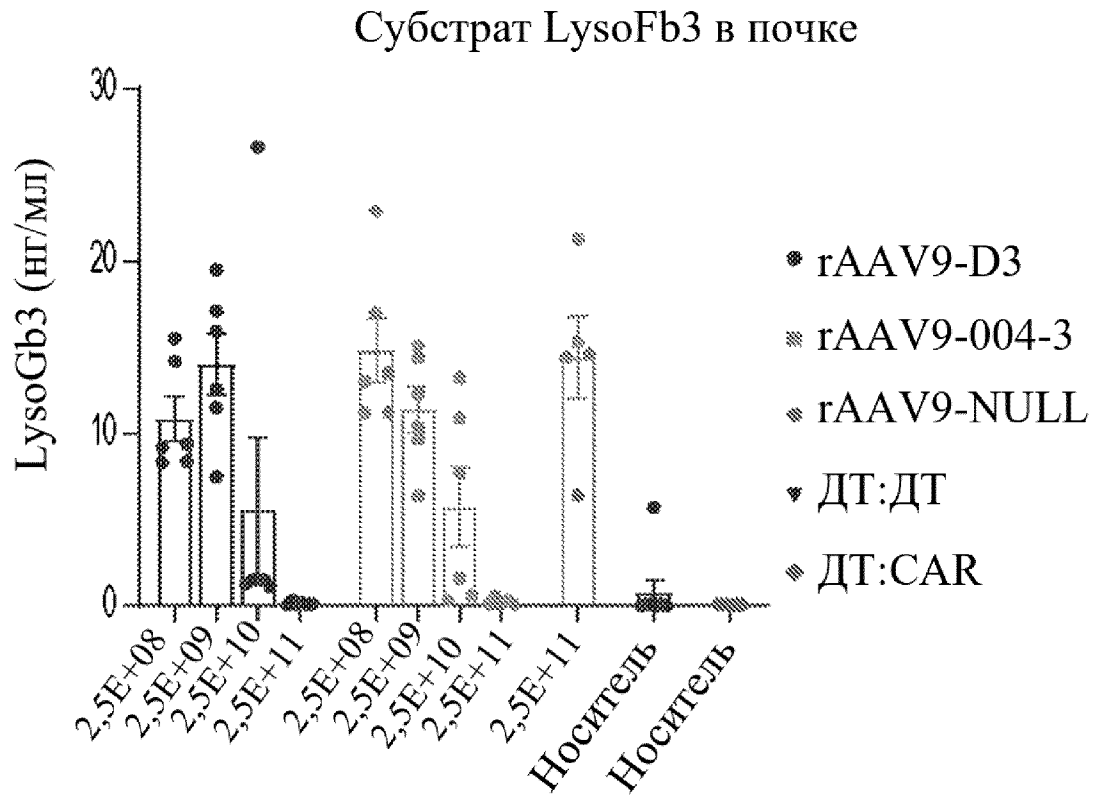
ФИГ. 21А



ФИГ. 21В

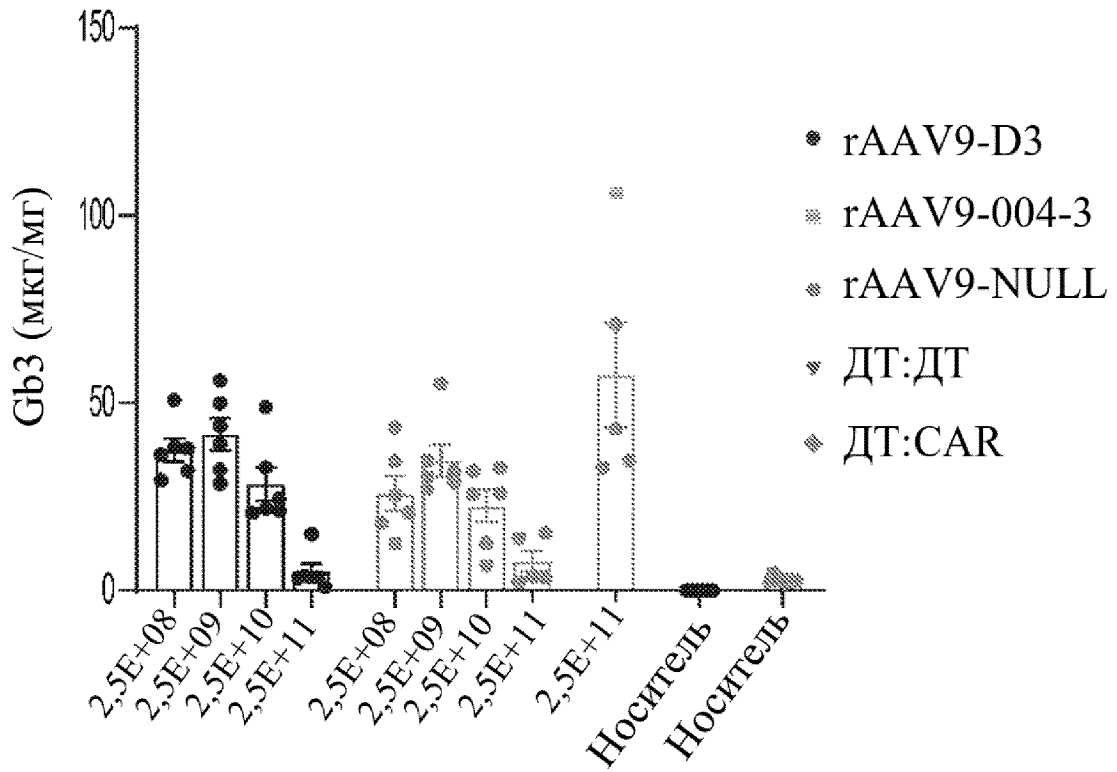


ФИГ. 21С

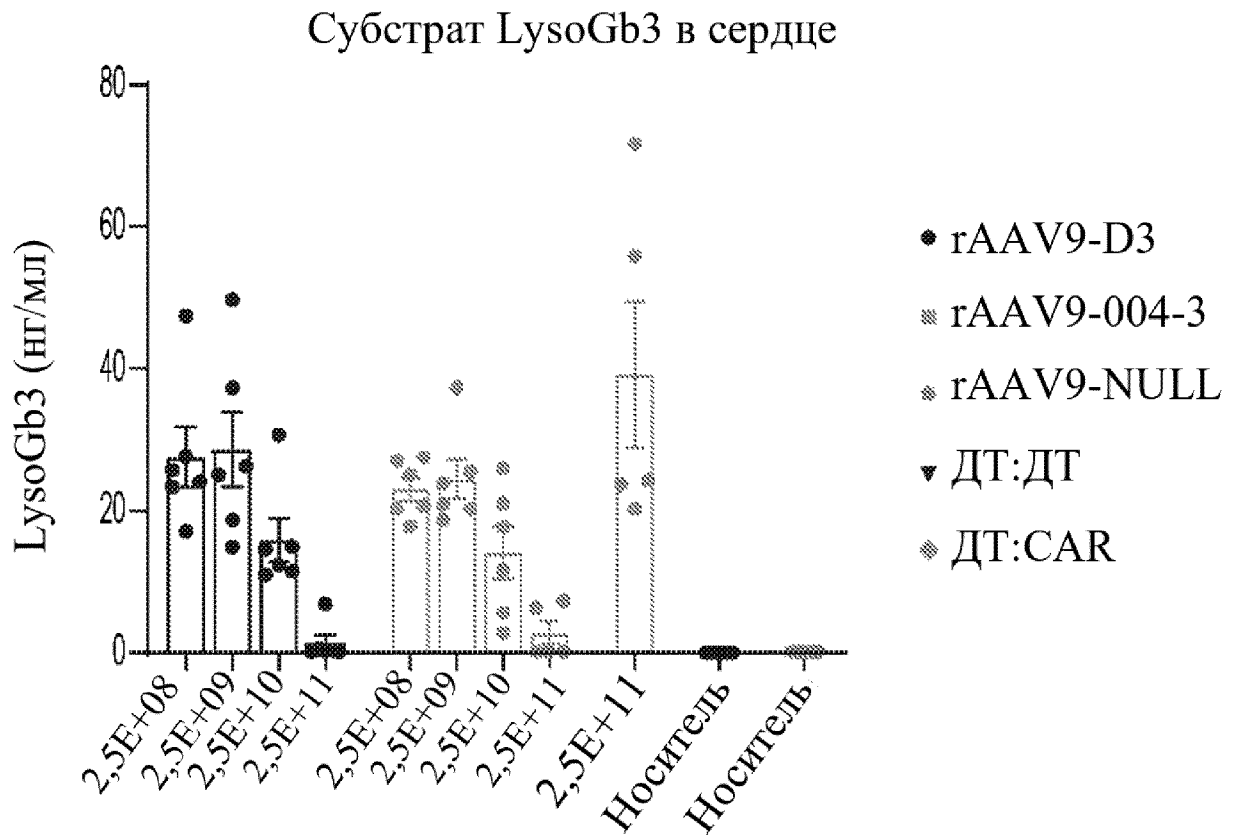


ФИГ. 21D

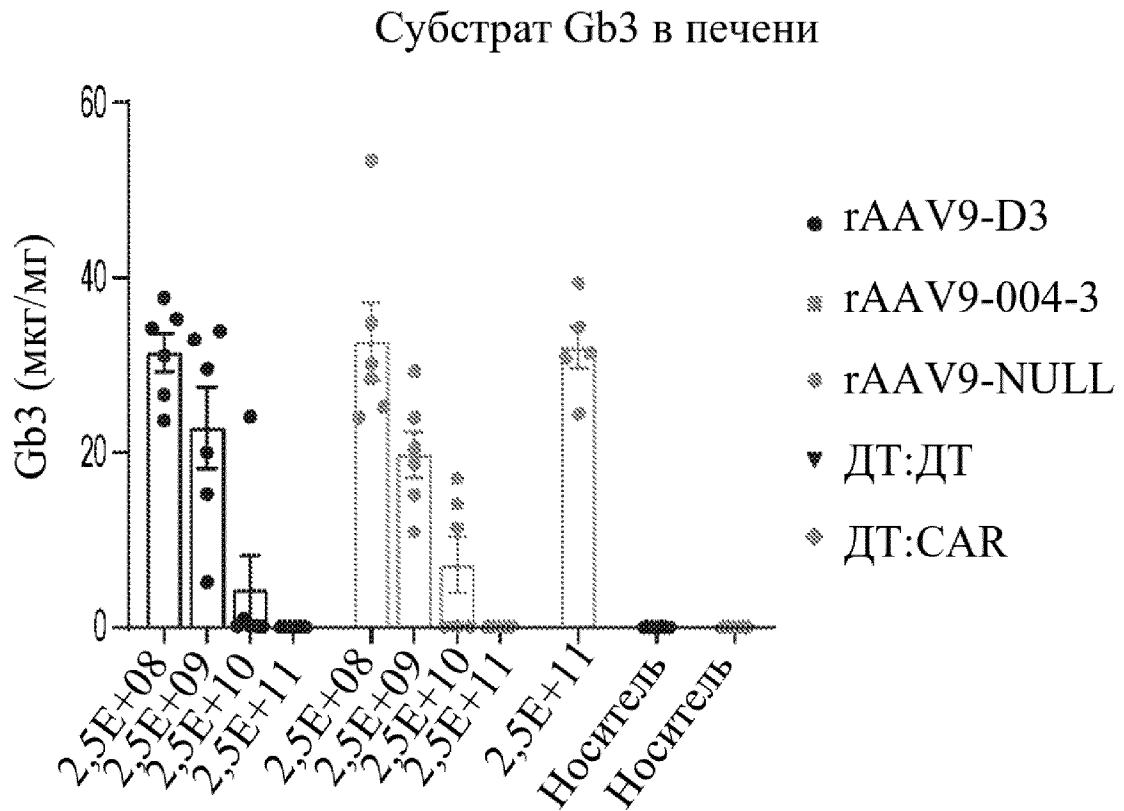
Субстрат Gb3 в сердце



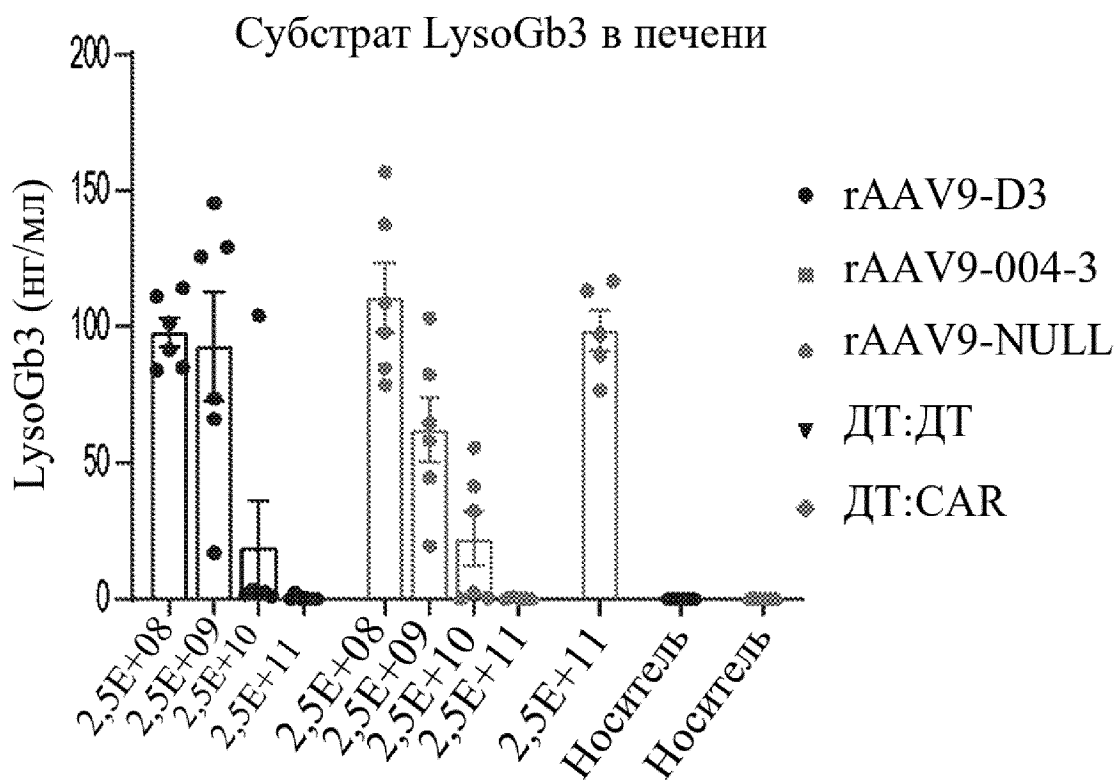
ФИГ. 21Е



ФИГ. 21F



ФИГ. 21G



ФИГ. 21Н