

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202491872** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.10.07

(51) Int. Cl. *A61K 35/761* (2015.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2023.01.18

(54) **ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ БОЛЕЗНИ ГОШЕ**

(31) **63/267,046; 63/382,502**

(32) **2022.01.21; 2022.11.05**

(33) **US**

(86) **PCT/IB2023/050426**

(87) **WO 2023/139496 2023.07.27**

(71) Заявитель:
**АСТРАЗЕНЕКА АЙЭЛЕНД
ЛИМИТЕД (IE)**

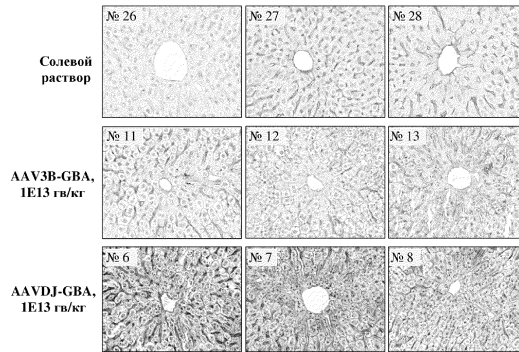
(72) Изобретатель:

**Белл Роберт Д., Ченг Тинг-Вэн,
Нарула Джатин, Пан Кларк Цюнь,
Соманатхан Сурьянараян, Соуза
Дэвид Уэйн, Табет Рикардос (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В настоящем изобретении описываются улучшенные векторы, такие как векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV), для экспрессии бета-глокоцереброзидазы (GСазы) в трансдуцированных клетках, а также применение таких векторов для увеличения количества GСазы у субъектов, испытывающих дефицит GСазы, таких как субъекты с болезнью Гоше типа 1.



202491872
A1

202491872
A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-581784EA/022

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ БОЛЕЗНИ ГОШЕ

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0001] Болезнь Гоше (GD) - аутомно-рецессивная лизосомная болезнь накопления, возникающая в результате мутаций гена (GBA), кодирующего β -глюкоцереброзидазу. Недостаточная активность этого фермента в лизосомах приводит к внутриклеточному накоплению гликолипида глюкоцереброзида во всем организме, в частности, в костном мозге, селезенке и печени. Хотя симптомы, возраст начала и степень тяжести сильно различаются у разных людей, общие симптомы включают гепатоспленомегалию, анемию, тромбоцитопению и аномалии скелета.

[0002] Болезнь Гоше представлена тремя основными клиническими подтипами. Тип 1, который является наиболее распространенным, не затрагивает нервную систему, тогда как тип 2 (острый нейропатический) и тип 3 (подострый нейропатический) приводят к накоплению глюкоцереброзидов в головном мозге и, следовательно, ассоциированы с неврологическими осложнениями. Также известны две менее распространенные формы нарушения, включающие перинатальную летальную GD и сердечно-сосудистую GD.

[0003] На сегодняшний день были разработаны два подхода к лечению GD. Ферментозаместительная терапия (ERT) для лечения GD направлена на компенсацию недостаточной активности β -глюкоцереброзидазы путем осуществления внутривенной инфузии рекомбинантных версий фермента. Примеры одобренных лекарственных средств ERT для лечения GD типа 1 включают имиглюцеразу и велаглюцеразу альфа. Хотя ERT эффективна для снижения по меньшей мере некоторых симптомов GD, инфузии необходимо проводить в среднем каждые две недели, и терапия является пожизненной. Кроме того, у пациентов с GD, проходящих ERT, нередко вырабатываются нейтрализующие антитела против экзогенно поставляемой GСазы, что снижает эффективность или может потребовать прекращения ERT. Второй и недавно разработанный подход - субстрат-редуцирующая терапия (SRT) - предполагает пероральное введение низкомолекулярных лекарственных средств, которые ингибируют биосинтез GlcCer, субстрата GСазы. Примеры одобренных лекарственных средств SRT для лечения GD типа 1 включают элиглустат и миглустат. Однако SRT одобрена только у взрослых пациентов с GD, а не у детей, она ассоциирована с рядом побочных эффектов, а также требует пожизненного лечения для контроля патологического процесса и симптомов, ассоциированных с GD.

[0004] Ввиду недостатков, ассоциированных с нынешним стандартом лечения, в данной области существует потребность в улучшенных способах лечения болезни Гоше типа 1 и, в частности, в методах лечения, которые требуют менее частого введения.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Для удовлетворения потребности в данной области в настоящем

изобретении предусмотрены улучшенные векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV) для экспрессии белка бета-глюкоцереброзидазы (ГСазы), способы получения таких векторов на основе AAV и способы применения таких векторов на основе AAV для предупреждения или лечения заболеваний или нарушений у субъектов, характеризующихся дефицитом количества белка ГСазы и/или ферментативной активности белка ГСазы, включая без ограничения болезнь Гоше типа 1.

[0006] Определенные пронумерованные неограничивающие варианты осуществления (E) настоящего изобретения изложены в данном документе ниже. Эти и родственные варианты осуществления описаны более подробно в разделе "Подробное описание", включающем раздел "Примеры" и "Графические материалы". Специалисты в данной области техники распознают или будут способны определить, используя лишь стандартный экспериментальный подход, эквиваленты конкретных вариантов осуществления, описанных в данном документе.

E1. Геном вектора на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (AAV), содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую белок бета-глюкоцереброзидазы (ГСазы).

E2. Геном вектора на основе AAV по **E1**, где указанный белок ГСазы содержит последовательность сигнального пептида секреции и зрелую полипептидную последовательность.

E3. Геном вектора на основе AAV по **E1-E2**, где зрелая полипептидная последовательность указанного белка ГСазы получена из белка ГСазы человека дикого типа.

E4. Геном вектора на основе AAV по **E1-E3**, где зрелая полипептидная последовательность указанного белка ГСазы содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:40, , состоит по сути или состоит из нее.

E5. Геном вектора на основе AAV по **E1-E4**, где указанная последовательность сигнального пептида секреции получена из белка ГСазы человека дикого типа.

E6. Геном вектора на основе AAV по **E5**, где указанная последовательность сигнального пептида секреции содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:39.

E7. Геном вектора на основе AAV по **E1-E4**, где указанная последовательность сигнального пептида секреции получена из белка, отличного от ГСазы.

E8. Геном вектора на основе AAV по **E7**, где указанная последовательность сигнального пептида секреции получена из белка иммуноглобулина.

E9. Геном вектора на основе AAV по **E8**, где указанная последовательность сигнального пептида секреции содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:38.

E10. Геном вектора на основе AAV по **E1-E4**, где аминокислотная последовательность указанного белка ГСазы представлена аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:16.

E11. Геном вектора на основе AAV по **E1-E10**, где указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая зрелую полипептидную последовательность указанного белка GCазы, представляет собой нуклеотидную последовательность дикого типа.

E12. Геном вектора на основе AAV по **E1-E10**, где указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая зрелую полипептидную последовательность указанного белка GCазы, представляет собой кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность.

E13. Геном вектора на основе AAV по **E12**, где кодон-оптимизированная нуклеотидная последовательность характеризуется уменьшенным числом динуклеотидов CpG по сравнению с нуклеотидной последовательностью дикого типа, кодирующей зрелую полипептидную последовательность указанного белка GCазы.

E14. Геном вектора на основе AAV по **E13**, где нуклеотидная последовательность, кодирующая белок GCазы, характеризуется на 1-50, 1-45, 1-40, 1-35, 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10 или 1-5 меньшим числом динуклеотидов CpG по сравнению с нуклеотидной последовательностью дикого типа, кодирующей зрелую полипептидную последовательность указанного белка GCазы.

E15. Геном вектора на основе AAV по **E13-E14**, где указанная нуклеотидная последовательность дикого типа, кодирующая зрелую полипептидную последовательность указанного белка GCазы, содержится в нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31 или SEQ ID NO:32.

E16. Геном вектора на основе AAV по **E13**, где нуклеотидная последовательность, кодирующая белок GCазы, не содержит никаких динуклеотидов CpG.

E17. Геном вектора на основе AAV по **E1-E13**, где нуклеотидная последовательность, кодирующая зрелую полипептидную последовательность указанного белка GCазы, на по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% идентична нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:13.

E18. Геном вектора на основе AAV по **E1-E13**, где нуклеотидная последовательность, кодирующая зрелую полипептидную последовательность указанного белка GCазы, идентична нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:13.

E19. Геном вектора на основе AAV по **E1-E13**, где нуклеотидная последовательность, кодирующая указанный белок GCазы, идентична нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:41.

E20. Геном вектора на основе AAV по **E1-E19**, где указанный геном содержит по меньшей мере один инвертированный концевой повтор (ITR) AAV.

E21. Геном вектора на основе AAV по **E20**, где нуклеотидная последовательность указанного ITR относится к дикому типу.

E22. Геном вектора на основе AAV по **E20**, где нуклеотидная последовательность указанного ITR является модифицированной.

E23. Геном вектора на основе AAV по **E22**, где нуклеотидная последовательность указанного ITR модифицирована для уменьшения или устранения способности ITR подвергаться концевому расщеплению.

E24. Геном вектора на основе AAV по **E22**, где нуклеотидная последовательность указанного ITR модифицирована для инактивации сайта концевого расщепления.

E25. Геном вектора на основе AAV по **E22**, где нуклеотидная последовательность указанного ITR модифицирована для уменьшения или устранения способности ITR поддерживать упаковку в капсид.

E26. Геном вектора на основе AAV по **E22**, где нуклеотидная последовательность указанного ITR модифицирована для инактивации D-области.

E27. Геном вектора на основе AAV по **E20-E21**, где указанный ITR представляет собой ITR AAV2.

E28. Геном вектора на основе AAV по **E27**, где указанный ITR AAV2 является усеченным.

E29. Геном вектора на основе AAV по **E20**, где указанный ITR содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18 или SEQ ID NO:19 или комплементарную или обратно-комплементарную последовательность каждой из указанных последовательностей, состоит по сути или состоит из них.

E30. Геном вектора на основе AAV по **E20-E21**, где указанный ITR отличается от ITR AAV2.

E31. Геном вектора на основе AAV по **E1-E30**, где указанный геном вектора содержит первый ITR AAV, расположенный на его 5'-конце, и второй ITR AAV, расположенный на его 3'-конце.

E32. Геном вектора на основе AAV по **E31**, где указанный геном вектора дополнительно содержит третий ITR AAV.

E33. Геном вектора на основе AAV по **E32**, где указанный третий ITR модифицирован для инактивации сайта концевого расщепления.

E34. Геном вектора на основе AAV по **E1-E33**, где указанный геном вектора дополнительно содержит область контроля транскрипции, функционально связанную с указанной нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок GCазы.

E35. Геном вектора на основе AAV по **E34**, где указанная область контроля транскрипции является конститутивной.

E36. Геном вектора на основе AAV по **E34**, где указанная область контроля транскрипции является индуцируемой.

E37. Геном вектора на основе AAV по **E34**, где указанная область контроля транскрипции является тканеспецифичной.

E38. Геном вектора на основе AAV по **E37**, где указанная область контроля транскрипции является специфичной для ткани печени.

E39. Геном вектора на основе AAV по **E34-E38**, где указанная область контроля транскрипции содержит последовательность промотора.

E40. Геном вектора на основе AAV по **E39**, где указанная область контроля транскрипции дополнительно содержит последовательность энхансера.

E41. Геном вектора на основе AAV по **E40**, где указанная последовательность энхансера расположена с 5'-конца от промотора.

E42. Геном вектора на основе AAV по **E40**, где указанная последовательность энхансера расположена с 3'-конца от промотора.

E43. Геном вектора на основе AAV по **E39**, где указанная последовательность промотора является специфичной для ткани печени.

E44. Геном вектора на основе AAV по **E40**, где указанная последовательность энхансера является специфичной для ткани печени.

E45. Геном вектора на основе AAV по **E40**, где каждая из указанных последовательности промотора и последовательности энхансера является специфичной для ткани печени.

E46. Геном вектора на основе AAV по **E39**, где указанная последовательность промотора получена из гена альбумина (ALB) человека.

E47. Геном вектора на основе AAV по **E40**, где указанная последовательность энхансера получена из гена альбумина (ALB) человека или гена предшественника альфа-1-микроглобулина/бикунина (AMBIP).

E48. Геном вектора на основе AAV по **E46**, где указанная последовательность промотора содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:10 или функциональную подпоследовательность промотора, ее модификацию или вариант, состоит по сути или состоит из них.

E49. Геном вектора на основе AAV по **E47**, где указанная последовательность энхансера содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:9 или SEQ ID NO:8 соответственно или функциональную подпоследовательность энхансера, ее модификацию или вариант, состоит по сути или состоит из них.

E50. Геном вектора на основе AAV по **E1-E49**, где указанный геном вектора дополнительно содержит последовательность сигнала терминации транскрипции.

E51. Геном вектора на основе AAV по **E50**, где указанная последовательность сигнала терминации транскрипции представляет собой последовательность сигнала полиаденилирования (поли(A)).

E52. Геном вектора на основе AAV по **E51**, где указанная последовательность сигнала терминации транскрипции получена из гена бычьего гормона роста (bGH).

E53. Геном вектора на основе AAV по **E52**, где указанная последовательность сигнала терминации транскрипции содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:14 или функциональную подпоследовательность сигнала терминации транскрипции, ее модификацию или вариант, состоит по сути или состоит из них.

E54. Геном вектора на основе AAV по **E1-E53**, где указанный геном вектора дополнительно содержит последовательность интрона.

E55. Геном вектора на основе AAV по **E54**, где указанная последовательность

интрона расположена в пределах нуклеотидной последовательности, кодирующей указанный белок GCазы, и прерывает ее.

E56. Геном вектора на основе AAV по **E54**, где указанная последовательность интрона не прерывает нуклеотидную последовательность, кодирующую указанный белок GCазы.

E57. Геном вектора на основе AAV по **E56**, где указанная последовательность интрона расположена с 5'-конца от нуклеотидной последовательности, кодирующей указанный белок GCазы.

E58. Геном вектора на основе AAV по **E57**, где указанная последовательность интрона расположена с 3'-конца от промотора и с 5'-конца от нуклеотидной последовательности, кодирующей указанный белок GCазы.

E59. Геном вектора на основе AAV по **E54-E58**, где указанная последовательность интрона получена из гена бета-глобина человека (HBB).

E60. Геном вектора на основе AAV по **E59**, где указанная последовательность интрона содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:11, состоит по сути или состоит из нее.

E61. Геном вектора на основе AAV по **E1-E60**, где указанный геном вектора дополнительно содержит последовательность посттранскрипционного регуляторного элемента (PRE).

E62. Геном вектора на основе AAV по **E61**, где указанная последовательность PRE расположена с 3'-конца от нуклеотидной последовательности, кодирующей указанный белок GCазы, и с 5'-конца от последовательности сигнала терминации транскрипции.

E63. Геном вектора на основе AAV по **E61-E62**, где указанная последовательность PRE представляет собой последовательность WPRE или HPRE.

E64. Геном вектора на основе AAV по **E63**, где указанная последовательность PRE содержит нуклеотидную последовательности под SEQ ID NO:27, состоит по сути или состоит из нее.

E65. Геном вектора на основе AAV по **E1-E64**, где указанный геном вектора дополнительно содержит сайт связывания для микроРНК (miRNA).

E66. Геном вектора на основе AAV по **E65**, где указанный сайт связывания miRNA расположен с 3'-конца от нуклеотидной последовательности, кодирующей указанный белок GCазы, и с 5'-конца от последовательности сигнала терминации транскрипции.

E67. Геном вектора на основе AAV по **E1-E64**, где указанный геном вектора дополнительно содержит спейсерную или филлерную нуклеотидную последовательность достаточной длины, так что полная длина указанного генома вектора на основе AAV составляет примерно 4,5-5,0 т. н.

E68. Геном вектора на основе AAV по **E1-E64**, где указанный геном вектора содержит первый ITR AAV, область контроля транскрипции, находящуюся в функциональной связи с указанной нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок GCазы, последовательность сигнала терминации транскрипции и второй ITR AAV.

E69. Геном вектора на основе AAV по **E68**, где указанный геном вектора содержит в направлении от 5' к 3' указанный первый ITR AAV, указанную область контроля транскрипции, находящуюся в функциональной связи с указанной нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок GCазы, указанную последовательность сигнала терминации транскрипции и указанный второй ITR AAV.

E70. Геном вектора на основе AAV по **E69**, где указанная область контроля транскрипции содержит промотор, расположенный с 5'-конца от указанной нуклеотидной последовательности, кодирующей белок GCазы, и энхансер, расположенный с 5'-конца от указанного промотора.

E71. Геном вектора на основе AAV по **E68-E70**, где указанный геном вектора дополнительно содержит интрон, расположенный между указанным промотором и указанной нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок GCазы.

E72. Геном вектора на основе AAV по **E68-E70**, где указанный геном вектора дополнительно содержит интрон, расположенный в пределах указанной нуклеотидной последовательности, кодирующей белок GCазы, и прерывающий ее.

E73. Геном вектора на основе AAV по **E68-E72**, где указанный геном вектора дополнительно содержит PRE, расположенный между указанной нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок GCазы, и указанной последовательностью сигнала поли(A).

E74. Геном вектора на основе AAV по **E68-E73**, где указанный первый ITR AAV расположен на 5'-конце указанного генома вектора, а указанный второй ITR AAV расположен на 3'-конце указанного генома вектора.

E75. Геном вектора на основе AAV по **E74**, где указанный геном вектора дополнительно содержит третий ITR AAV, расположенный между указанными первым и вторым ITR AAV.

E76. Геном вектора на основе AAV по **E75**, где сайт концевого расщепления указанного третьего ITR AAV является инактивированным.

E77. Геном вектора на основе AAV по **E68-E76**, где указанная область контроля транскрипции является специфичной для ткани печени.

E78. Геном вектора на основе AAV по **E77**, где указанная область контроля транскрипции содержит первую копию последовательности энхансера гена AMBP, вторую копию последовательности энхансера гена AMBP, последовательность энхансера гена ALB и последовательность промотора гена ALB.

E79. Геном вектора на основе AAV по **E78**, где каждая из указанных первой и второй копий последовательности энхансера гена AMBP содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:8, состоит по сути или состоит из нее, указанная последовательность энхансера гена ALB содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:9, состоит по сути или состоит из нее, и указанная последовательность промотора гена ALB содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:10, состоит по сути или состоит из нее.

E80. Геном вектора на основе AAV по **E71-E79**, где указанная последовательность интрона получена из гена бета-глобина человека (HBB).

E81. Геном вектора на основе AAV по **E80**, где указанная последовательность интрона содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:11, состоит по сути или состоит из нее.

E82. Геном вектора на основе AAV по **E68-E81**, где указанная последовательность сигнала терминации транскрипции получена из гена бычьего гормона роста (bGH).

E83. Геном вектора на основе AAV по **E82**, где указанная последовательность сигнала терминации транскрипции содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:14 или функциональную подпоследовательность сигнала терминации транскрипции, ее модификацию или вариант, состоит по сути или состоит из них.

E84. Геном вектора на основе AAV по **E68-E83**, дополнительно содержащий модифицированную последовательность интрона 2 TBP, расположенную с 3'-конца от указанной последовательности сигнала терминации транскрипции и с 5'-конца от указанного второго ITR AAV.

E85. Геном вектора на основе AAV по **E1-E4**, где указанный геном вектора содержит в направлении от 5' к 3':

- (a) первый ITR AAV2,
- (b) первую копию последовательности энхансера гена AMBP,
- (c) вторую копию последовательности энхансера гена AMBP,
- (d) последовательность энхансера гена ALB,
- (e) последовательность промотора гена ALB,
- (f) последовательность интрона гена бета-глобина человека (HBB),
- (g) нуклеотидную последовательность, кодирующую белок GCазы человека, функционально связанную с указанными первой и второй копиями энхансера AMBP, указанным энхансером ALB и указанным промотором ALB, где указанный белок GCазы содержит последовательность сигнального пептида секреции и зрелую полипептидную последовательность,
- (h) последовательность сигнала терминации транскрипции гена бычьего гормона роста (bGH),
- (i) модифицированную последовательность интрона 2 TBP и
- (j) второй ITR AAV2.

E86. Геном вектора на основе AAV по **E85**, где каждая из указанных первой и второй копий последовательности энхансера гена AMBP содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:8, состоит по сути или состоит из нее; указанная последовательность энхансера гена ALB содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:9, состоит по сути или состоит из нее; указанная последовательность промотора гена ALB содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:10, состоит по сути или состоит из нее; последовательность интрона гена бета-глобина человека (HBB) содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:11, состоит

по сути или состоит из нее; нуклеотидная последовательность, кодирующая белок GCазы человека, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:41, состоит по сути или состоит из нее; и указанная последовательность сигнала терминации транскрипции гена бычьего гормона роста (bGH) содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:14, состоит по сути или состоит из нее.

E87. Геном вектора на основе AAV по **E85-E86**, где каждый из указанных первого и второго ITR AAV2 содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18 или SEQ ID NO:19 или комплементарную или обратнo-комплементарную последовательность каждой из указанных последовательностей, состоит по сути или состоит из них.

E87. Геном вектора на основе AAV по **E85-E87**, где нуклеотидная последовательность указанного генома вектора содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:17 или ее обратнo-комплементарную последовательность, состоит по сути или состоит из них.

E88. Геном вектора на основе AAV по **E1-E87**, где длина указанного генома вектора равна 5 т. н. или меньше.

E89. Вектор на основе AAV, содержащий капсид AAV и геном вектора на основе AAV по **E1-E88**, где указанный геном вектора инкапсидирован указанным капсидом.

E90. Вектор на основе AAV по **E89**, где указанный капсид AAV является гепатотропным.

E91. Вектор на основе AAV по **E89-E90**, где указанный капсид AAV выбран из группы, состоящей из: AAV2, AAV3B, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV13, AAVrh.74, AAVrh.10, AAV-DJ, AAV-LK03, AAV-KP1, AAV-hu.Lvr01, AAV-hu.Lvr02, AAV-hu.Lvr03, AAV-hu.Lvr04, AAV-hu.Lvr05, AAV-hu.Lvr06, AAV-hu.Lvr07, AAV-Anc80, AAV-NP40, AAV-NP59, AAV-NP84, AAV-hu.37, AAV-rh.8, AAV-rh.64R1, RHM4-1, RHM15-1, RHM15-2, RHM15-3/RHM15-5, RHM15-4 и RHM15-6, AAVHSC7, AAVHSC15 и AAVHSC17.

E92. Вектор на основе AAV по **E89-E90**, где указанный капсид AAV содержит белок VP1, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:4, или состоящий из нее.

E93. Вектор на основе AAV по **E89-E92**, где указанный геном вектора представляет собой геном на основе однонитевой ДНК.

E94. Вектор на основе AAV по **E89-E92**, где указанный геном вектора представляет собой геном на основе самокомплементарной ДНК.

E95. Вектор на основе AAV по **E93-E94**, где указанный геном вектора находится в плюс-полярности.

E96. Вектор на основе AAV по **E93-E94**, где указанный геном вектора находится в минус-полярности.

E97. Вектор на основе AAV, содержащий капсид AAV3B и геном вектора на основе AAV, где нуклеотидная последовательность указанного генома вектора содержит

нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:17 или ее обратно-комплементарную последовательность или состоит из них, и где указанный геном вектора инкапсидирован указанным капсидом.

E98. Фармацевтическая композиция, содержащая вектор на основе AAV по **E89-E97** и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

E99. Способ увеличения количества активного белка GСазы в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) субъекта-человека, у которого диагностирован дефицит ферментативной активности GСазы, или уменьшения количества глюкозилсфингозина в сыворотке крови указанного субъекта, включающий введение указанному субъекту некоторого количества вектора на основе AAV или композиции по **E1-E98**, эффективного для увеличения количества активного белка GСазы в PBMC или снижения количества сывороточного глюкозилсфингозина.

E100. Способ по **E99**, где указанный способ является эффективным для увеличения количества активного белка GСазы в PBMC указанного субъекта до уровня по меньшей мере или приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% от количества активного белка GСазы в PBMC здоровых людей.

E101. Способ по **E100**, где количество активного белка GСазы в PBMC здоровых людей находится в диапазоне от приблизительно 20 до 130 пикограммов на миллион (пг/1Е6) клеток или составляет в среднем приблизительно 70 пг/1Е6 клеток.

E102. Способ по **E99**, где указанный способ эффективен для увеличения количества активного белка GСазы в PBMC указанного субъекта на по меньшей мере 25%, 50%, 75%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 225%, 250%, 300%, 400% или 500% по сравнению со средним количеством активного белка GСазы в PBMC у указанного субъекта до введения указанных вектора на основе AAV или композиции.

E103. Способ по **E99**, где указанный способ является эффективным для увеличения количества активного белка GСазы в PBMC указанного субъекта до уровня по меньшей мере или приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 140 или 150 пг/1Е6 клеток.

E104. Способ по **E99**, где указанный способ является эффективным для снижения количества глюкозилцерамида или глюкозилсфингозина в сыворотке крови указанного субъекта на по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% по сравнению со средним количеством сывороточного глюкозилцерамида или глюкозилсфингозина у указанного субъекта до введения указанных вектора на основе AAV или композиции.

E105. Способ по **E99**, где указанный способ является эффективным для снижения количества глюкозилцерамида или глюкозилсфингозина в сыворотке крови указанного субъекта до уровня не более чем приблизительно 200, 175, 150, 125, 100, 75, 50, 25 или 10 нанограммов на мл сыворотки крови.

E106. Способ по **E99-E105**, где указанное увеличение количества активного белка GСазы в PBMC или снижение количества глюкозилцерамида или глюкозилсфингозина в

сыворотке крови указанного субъекта происходит в течение 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 дней после введения указанных вектора на основе AAV или композиции.

E107. Способ снижения степени тяжести у субъекта-человека по меньшей мере одного симптома или признака, вызванных дефицитом ферментативной активности GСазы, включающий введение указанному субъекту некоторого количества вектора на основе AAV или композиции по **E1-E98**, эффективного для снижения степени тяжести такого симптома или признака.

E108. Способ по **E107**, где симптом или признак выбраны из группы, состоящей из гепатоспленомегалии, гепатомегалии, спленомегалии, анемии, лейкоцитопении, панцитопении, тромбоцитопении, моноклональной гипергаммаглобулинемии, поликлональной гипергаммаглобулинемии, анорексии, хронической усталости, аваскулярного некроза костей, боли в костях, остеолита, остеонекроза и остеопении.

E109. Способ по **E99-E108**, где дефицит ферментативной активности GСазы у указанного субъекта вызван гомозиготной или гетерозиготной мутацией в гене, кодирующем белок GСазы, которая снижает количество или ферментативную активность белка GСазы, экспрессируемого с этого гена, по сравнению со средним количеством или активностью белков GСазы у здоровых людей с немутантным геном GBA.

E110. Способ по **E99-E109**, где у указанного субъекта диагностирована болезнь Гоше типа 1.

E111. Способ предупреждения или лечения болезни Гоше типа 1 у субъекта-человека, включающий введение указанному субъекту профилактически или терапевтически эффективного количества вектора на основе AAV или композиции по **E1-E98**, эффективного для предупреждения или лечения болезни Гоше типа 1 у указанного субъекта.

E112. Способ по **E99-E111**, где эффективное количество указанного вектора на основе AAV представляет собой дозу, находящуюся в диапазоне от 1×10^{10} до 1×10^{15} геномов вектора на килограмм (гв/кг) массы тела субъекта.

E113. Способ по **E99-E112**, где указанные вектор на основе AAV или композицию вводят указанному субъекту внутривенно.

E114. Применение вектора на основе AAV по **E1-E97** в изготовлении лекарственного препарата для лечения или предупреждения болезни Гоше типа 1 у субъекта-человека.

E115. ДНК-плазида, содержащая нуклеотидную последовательность генома вектора на основе AAV по **E1-E88**.

E116. Клетка-хозяин для продукции вектора на основе AAV, содержащая ДНК-плазмиду по **E115**.

E117. Клетка-хозяин по **E116**, где указанная клетка-хозяин представляет собой клетку HEK293.

E118. Клетка-хозяин по **E116-E117**, где указанная клетка-хозяин дополнительно содержит ген, кодирующий белок Rep AAV, например, содержащийся в ДНК-плазмиде.

E119. Клетка-хозяин по **E116-E118**, где указанная клетка-хозяин дополнительно содержит ген, кодирующий капсидный белок VP1 AAV, например, содержащийся в ДНК-плазмиде.

E120. Клетка-хозяин по **E116-E119**, где указанная клетка-хозяин дополнительно содержит ген, кодирующий вирусный хелперный фактор, например, содержащийся в ДНК-плазмиде.

E121. Способ получения вектора на основе AAV, включающий инкубацию клетки-хозяина по **E120** в условиях, подходящих для продуцирования векторов на основе AAV, и очистку векторов на основе AAV, полученных таким образом.

E122. Вектор на основе AAV, полученный с помощью способа по **E121**.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1. Ферментативная активность GСазы, продуцируемой в клетках Huh7 после трансдукции различными дозами трех векторов на основе AAV для экспрессии белка GСазы человека.

Фиг. 2. Трансдукцию печени и селезенки двумя векторами GСазы на основе AAV, введенными мышам D409V, количественно определяли как число геномов вектора, нормализованное к количеству клеточной геномной ДНК в образцах тканей от обработанных и контрольных мышей.

Фиг. 3. Трансдукцию печени и селезенки двумя векторами GСазы на основе AAV, введенными мышам D409V, количественно определяли как число геномов вектора, нормализованное к числу гаплоидных клеточных геномов в образцах тканей от обработанных и контрольных мышей.

Фиг. 4. Трансдукцию печени и селезенки двумя векторами GСазы на основе AAV, введенными мышам D409V, количественно определяли как количество экспрессированной мРНК GСазы человека, нормализованное к экспрессии конститутивного гена клетки в образцах тканей от обработанных и контрольных мышей.

Фиг. 5A. Количество фермента GСазы человека, присутствующего в образцах печени мышей D409V, которым вводили два вектора GСазы на основе AAV, определяли с использованием анализа LC-MS/MS.

Фиг. 5B. Количество фермента GСазы человека, присутствующего в образцах селезенки мышей D409V, которым вводили два вектора GСазы на основе AAV, определяли с использованием анализа LC-MS/MS.

Фиг. 5C. Количество фермента GСазы человека, присутствующего в образцах сыворотки крови мышей D409V, которым вводили два вектора GСазы на основе AAV, определяли с помощью анализа LC-MS/MS.

Фиг. 6. Количество фермента GСазы человека, присутствующего в образцах печени мышей D409V, которым вводили два вектора GСазы на основе AAV, визуализировали с помощью иммуногистохимии в сравнении с контрольными мышами. Цифры указывают разных тестируемых животных.

Фиг. 7A. Величину ферментативной активности GСазы человека, присутствующей

в образцах печени мышей D409V, которым вводили два вектора GСазы на основе AAV, определяли с использованием анализа с флуорогенным субстратом. Пунктирная линия показывает ферментативную активность GСазы у мышей D409V, обработанных средой-носителем.

Фиг. 7В. Величину ферментативной активности GСазы человека, присутствующей в образцах селезенки мышей D409V, которым вводили два вектора GСазы на основе AAV, определяли с использованием анализа с флуорогенным субстратом. Пунктирная линия показывает ферментативную активность GСазы у мышей D409V, обработанных средой-носителем.

Фиг. 7С. Величину ферментативной активности GСазы человека, присутствующей в образцах сыворотки крови мышей D409V, которым вводили два вектора GСазы на основе AAV, определяли с использованием анализа с флуорогенным субстратом.

Фиг. 8А. Количество глюкозилсфингозина, присутствующего в образцах печени мышей D409V, которым вводили два вектора GСазы на основе AAV, определяли с использованием анализа LC-MS/MS. Пунктирная линия показывает повышенный уровень глюкозилсфингозина у необработанных мышей D409V.

Фиг. 8В. Количество глюкозилсфингозина, присутствующего в образцах селезенки мышей D409V, которым вводили два вектора GСазы на основе AAV, определяли с использованием анализа LC-MS/MS. Пунктирная линия показывает повышенный уровень глюкозилсфингозина у необработанных мышей D409V.

Фиг. 8С. Количество глюкозилсфингозина, присутствующего в образцах сыворотки крови мышей D409V, которым вводили два вектора GСазы на основе AAV, определяли с использованием анализа LC-MS/MS. Пунктирная линия показывает повышенный уровень глюкозилсфингозина у необработанных мышей D409V.

Фиг. 9. Трансдукцию печени, селезенки и ганглиев дорсальных корешков двумя векторами GСазы на основе AAV, введенными здоровым яванским макакам, количественно определяли как число геномов вектора, нормализованное к количеству клеточной геномной ДНК в образцах тканей от обработанных и контрольных обезьян.

Фиг. 10. Трансдукцию печени, селезенки и ганглиев дорсальных корешков двумя векторами GСазы на основе AAV, введенными здоровым яванским макакам, количественно определяли как число геномов вектора, нормализованное к числу гаплоидных клеточных геномов в образцах тканей от обработанных и контрольных обезьян.

Фиг. 11. Трансдукцию печени, селезенки и ганглиев дорсальных корешков двумя векторами GСазы на основе AAV, введенными здоровым яванским макакам, количественно определяли как количество экспрессированной мРНК GСазы человека, нормализованное к экспрессии конститутивного гена клетки в образцах тканей от обработанных и контрольных обезьян.

Фиг. 12А. Количество фермента GСазы человека, присутствующего в образцах печени здоровых яванских макак, которым вводили четыре возрастающие дозы вектора

ГСазы на основе AAV, определяли с использованием анализа LC-MS/MS. Пунктирная линия показывает среднее значение уровня белка ГСазы в 10-15 образцах здорового человека. Серая область представляет стандартное отклонение концентрации ГСазы у здорового человека.

Фиг. 12В. Количество фермента ГСазы человека, присутствующего в образцах селезенки здоровых яванских макак, которым вводили четыре возрастающие дозы вектора ГСазы на основе AAV, определяли с использованием анализа LC-MS/MS. Пунктирная линия показывает среднее значение уровня белка ГСазы в 10-15 образцах здорового человека. Серая область представляет стандартное отклонение концентрации ГСазы у здорового человека.

Фиг. 13А. Количество фермента ГСазы человека, присутствующего в образцах печени здоровых яванских макак, которым вводили две возрастающие дозы (3Е12 гв/кг и 1Е13 гв/кг) вектора ГСазы на основе AAV, визуализировали с помощью иммуногистохимии в сравнении с контрольными обезьянами. Цифры указывают разных тестируемых животных.

Фиг. 13В. Количество фермента ГСазы человека, присутствующего в образцах печени здоровых яванских макак, которым вводили две возрастающие дозы (3Е13 гв/кг и 5Е13 гв/кг) вектора ГСазы на основе AAV, визуализировали с помощью иммуногистохимии в сравнении с контрольными обезьянами. Цифры указывают разных тестируемых животных.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] Следующее обсуждение направлено на различные варианты осуществления настоящего изобретения. Термин “изобретение” не предназначен для обозначения какого-либо конкретного варианта осуществления или иного ограничения объема настоящего изобретения. Хотя один или несколько из этих вариантов осуществления могут быть предпочтительными, раскрытые варианты осуществления не следует интерпретировать или использовать иным образом как ограничивающие объем настоящего изобретения, включая формулу изобретения. Кроме того, специалисту в данной области техники будет понятно, что следующее описание имеет широкое применение, и обсуждение любого варианта осуществления предназначено только для того, чтобы служить примером этого варианта осуществления и не подразумевает, что объем настоящего изобретения, включая формулу изобретения, ограничивается этим вариантом осуществления.

Некоторые определения

[0008] Используемый в данном документе термин “вектор на основе аденоассоциированного вируса” означает аденоассоциированный вирус (AAV), содержащий встречающийся в природе или неприродный капсид AAV, инкапсидирующий геном вектора. Вектор на основе аденоассоциированного вируса может обозначаться сокращенно как “вектор на основе AAV” и в зависимости от контекста может называться синонимическими терминами, такими как “вектор на основе рекомбинантного AAV”, “вектор на основе гAAV”, “гAAV” или просто “вектор”.

[0009] Используемый в данном документе термин “геном вектора” означает геном AAV, модифицированный как для включения гетерологичной нуклеотидной последовательности, так и для придания любому вектору на основе AAV, содержащему геном вектора, неспособности к репликации, например, путем инактивации или делеции эндогенных генов *rep* и/или *cap* AAV.

[0010] Используемый в данном документе термин “гетерологичная нуклеотидная последовательность” означает нуклеотидную последовательность, которая введена в организм (включая вирус) из другого организма (включая организм). Последовательность гетерологичной нуклеотидной последовательности может быть такой же, как последовательность, которая встречается в природе, или может быть ее модифицированной версией, или даже частично или полностью синтетической.

[0011] Используемый в данном документе термин “кассета экспрессии” означает нуклеотидную последовательность, содержащую трансген, функционально связанный с регуляторными областями или элементами для контроля инициации и терминации транскрипции трансгена из ДНК в РНК.

[0012] Используемый в данном документе термин “трансген” означает нуклеотидную последовательность, которая кодирует по меньшей мере один полипептид, и/или нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере одну молекулу функциональной РНК. Трансген может называться синонимичным термином “представляющий интерес ген”.

[0013] Используемый в данном документе термин “клетка-хозяин” означает клетку, в которой продуцируются векторы на основе AAV. Клетки-продуценты и пакующие клетки являются примерами клеток-хозяев. Клетки-хозяева могут быть получены от млекопитающих, насекомых или из других организмов, как одноклеточных, так и многоклеточных.

[0014] Используемый в данном документе термин “очищать” и родственные термины “очищенный” и “очистка”, когда они используются в связи с вектором на основе AAV или его образцом или препаратом, указывают на относительное увеличение или улучшение чистоты по сравнению с исходным материалом, содержащим вектор, и/или предшествующей промежуточной стадией очистки в некоторой схеме последовательных стадий очистки, предназначенных для очистки биологического продукта, и не требуют определенной качественной или количественной степени чистоты, если не указано иное.

[0015] Используемый в данном документе термин “трандукция” означает введение в клетку-мишень генома вектора на основе AAV. Трандукцию отличают от инфекции, при этом последний термин используется для обозначения введения в клетку генома аденоассоциированного вируса, способного к репликации.

[0016] Используемый в данном документе термин “клетка-мишень” означает клетку, для которой сконструирован вектор на основе AAV, или в которой предполагается его трандукция, или в которой экспериментально наблюдается трандукция вектором на основе AAV, будь то *in vitro* или *in vivo* у субъекта.

[0017] Используемый в данном документе термин “субъект” означает организм, в который вводят вектор на основе AAV с целью предупреждения или лечения заболевания, нарушения или состояния.

Болезнь Гоше

[0018] Гликофинголипиды (GSL) представляют собой биоактивные гликолипиды, расположенные в наружном слое плазматической мембраны, а также внеклеточно, характеризующиеся множеством функций, включая роль в передаче сигналов в клетках. Биосинтез многих GSL включает стадию гликозилирования церамида, происходящую на цитоплазматической поверхности ER и ранних эндосом аппарата Гольджи, с образованием глюкозилцерамида (также называемого глюкоцереброзидом; сокращенно GlcCer или GL1), после чего гликозилтрансферазы в полости аппарата Гольджи присоединяют дополнительные молекулы сахара, что приводит к более сложным гликановым структурам. Aerts, *JMFG, et al., Curr Op Chem Biol, 53:204 (2019)*; Schnaar, *RL and Kinoshita, T, Glycosphingolipids (Глава 11), в Essentials of Glycobiology [Internet], 3rd. Ed., CSH Laboratory Press, Varki, A, et al., eds. (2017)*. В ходе катаболизма GSL подвергаются эндоцитозу и разрушаются в лизосомах, где на них действуют гликозидазы, которые последовательно удаляют концевые сахарные фрагменты до тех пор, пока не останется церамид, который расщепляется лизосомальной кислой церамидазой на его составляющие - свободную жирную кислоту и сфингозин.

[0019] К числу лизосомальных гликозидаз, выполняющих функцию разрушения GSL до их липидного ядра, относится бета-глюкоцереброзидаза (также известная как глюкозилцерамидаза, кислая бета-глюкозидаза или бета-D-глюкозил-N-ацилсфингозинглюкогидролаза; EC 3.2.1.45; сокращенно GCase), лизосомальный мембраносвязанный гликопротеин, кодируемый геном *GBA*, который катализирует гидролиз глюкоцереброзида до D-глюкозы и церамида. Различные так называемые лизосомные болезни накопления обусловлены дефицитом активности лизосомальных гликозидаз, вовлеченных в метаболизм GSL, а недостаточная активность β -глюкоцереброзидазы приводит к патологическому внутриклеточному накоплению GlcCer, что является основной причиной болезни Гоше (GD). Основным источником GlcCer вне ЦНС является распад стареющих клеток крови и остатков тканей, а не полностью метаболизированный GlcCer-субстрат хранится в клетках моноцитарно-макрофагальной линии ретикулоэндотелиальной системы.

[0020] Хотя дефицит GCase является основной причиной GD, клинические проявления нарушения весьма разнообразны, при этом находятся в диапазоне от неонатальной летальности до легких симптомов. Уровень активности GCase, измеренный в лейкоцитах, не связан со степенью тяжести заболевания, и даже генотип не является надежным предиктором фенотипа. Еще предстоит полностью понять, в какой степени другие переменные, такие как взаимодействие с другими генными продуктами, эпигенетические механизмы и факторы окружающей среды, определяют течение заболевания у конкретных индивидуумов.

[0021] Клинически GD представлена пятью формами. Наиболее распространенной формой у европеоидов является тип 1 (приблизительно 90% случаев GD), не являющийся нейропатическим тип, тогда как типы 2 и 3 сопровождаются первичными неврологическими осложнениями. Также были описаны две более редкие формы.

[0022] Болезнь Гоше типа 1 (сокращенно “GD1”), которая может диагностироваться в любом возрасте, но особенно в молодом возрасте, ассоциирована с заболеваниями костей (остеопения, очаговые литические или склеротические поражения, остеонекроз (которые могут быть необратимыми после возникновения даже при терапии) и переломы), гепатомегалией, спленомегалией, цитопенией (анемия, лейкопения и/или тромбоцитопения), заболеванием легких (интерстициальное заболевание легких, альвеолярная/долевая консолидация и/или легочная артериальная гипертензия) и отсутствием первичного заболевания центральной нервной системы. Спленомегалия очень распространена (у по меньшей мере 90% пациентов), гепатомегалия распространена (у 60-80% пациентов), как и заболевания костей (у по меньшей мере 70% пациентов), а цитопения встречается практически у всех пациентов с нелеченной GD. В дополнение к более распространенным клиническим признакам GD типа 1 может проявляться коагуляционными, иммунологическими и метаболическими нарушениями, а также определенными злокачественными новообразованиями (например, множественной миеломой). Также могут возникнуть болевые кризы в кости.

[0023] Болезнь Гоше типа 2 и 3 обычно манифестирует в более молодом возрасте, чем тип 1, и, хотя ассоциирована со многими из тех же висцеральных симптомов, они отличаются включением первичного поражения ЦНС. Резкое снижение распада сфинголипидов в лизосомах, ассоциированное с определенными мутациями *GBA*, приводит к накоплению токсичных побочных продуктов, возникающих в результате обмена мембранных ганглиозидов в нейронах. При GD типа 2 (острая нейропатическая форма; менее 5% случаев GD) начало заболевания происходит в возрасте до двух лет, и оно быстро прогрессирует до смерти к возрасту от двух до четырех лет. Неврологические симптомы включают бульбарные признаки, пирамидные признаки и когнитивные нарушения. Заболевание костей отсутствует. При GD типа 3 (подострая/хроническая нейропатическая; приблизительно 5% случаев GD) начало зачастую происходит в детстве, но прогрессирование заболевания происходит гораздо медленнее, и пациенты могут дожить до тридцати или сорока лет. Неврологические симптомы включают глазовдвигательную апраксию, судороги и прогрессирующую миоклоническую эпилепсию.

[0024] Перинатально-летальная форма (менее 1% случаев GD), обусловленная полным отсутствием активности *GCазы*, вызывающая тяжелые нарушения барьерной функции кожи, ассоциирована с ихтиозоформными или коллодийными аномалиями кожи, неиммунной водянкой плода, пирамидными признаками, тогда как сердечно-сосудистая форма характеризуется кальцификацией аортального и митрального клапанов, легкой спленомегалией, помутнением роговицы и надъядерной офтальмоплегией. Фенотип сердечно-сосудистой GD является единственным, который описан как в высокой степени

коррелирующий с конкретным генотипом, т. е. с гомозиготностью по варианту p.Asp448His.

[0025] Интересно, что патогенные варианты GСазы ассоциированы с повышенным риском развития болезни Паркинсона (PD) и деменции с тельцами Леви, как у индивидуумов с GD, так и у тех, кто всего лишь является гетерозиготным, что позволяет предположить роль aberrантного метаболизма глюкозилцерамидов в этиологии PD.

[0026] Определяющей особенностью GD является накопление GlcCer в макрофагах (часто называемых клетками Гоше или запасующими клетками), присутствующих в селезенке, печени, костном мозге, лимфатических узлах и легких; и полагают, что эти клетки вносят вклад в возникновение многих симптомов GD. Сообщается, что клетки Гоше фенотипически сходны с так называемыми альтернативно активированными макрофагами и продуцируют и секретируют множество белков и побочных продуктов, которые могут модулировать воспаление, коагуляцию, активацию комплемента и функции тканей и органов по всему организму такими путями, которые, как полагают, вносят вклад в патогенез и манифестацию симптомов. *Boven LA, et al., Am J Clin Pathol, 122(3):359-69 (2004).*

[0027] К числу продуктов, вырабатываемых клетками Гоше, относятся секретируемые белки, которые попадают в кровоток и могут служить биомаркерами присутствия этих клеток в плазме крови и, следовательно, наличия GD. Они включают фермент хитотриозидазу, хемокин CCL18/PARC и еще один белок, называемый гликопротеиновым белком В неметастатической меланомы (gpNMB). Также было продемонстрировано, что клетки Гоше адаптируются к дефициту GСазы путем увеличения продукции ряда продуктов, получаемых за счет избытка GlcCer, в качестве субстрата или кофактора, которые обнаруживаются в плазме крови. К ним относятся увеличение продукции ганглиозида GM3, глюкозил- β -холестерина (GlcChol) и глюкозилсфингозина (GlcSph), что является результатом деацилирования GlcCer лизосомальной кислотой церамидазой до его сфингоидного основания. Последний продукт, в частности, может быть вовлечен в патогенез GD, и его можно контролировать для отслеживания ответа на ERT или SRT. *Murugesan V, et al., Am J Hematol, 91:1082-9 (2016).*

[0028] Болезнь Гоше вызвана различными мутациями, ассоциированными с геном GBA человека (также известным как GBA1, GCB и GLUC), который кодирует белок GСазы. Мутации в гене GBA, локализованные в хромосомной области 1q22, приводят к тому, что GD преимущественно наследуется как аутосомно-рецессивное заболевание. Ген GBA содержит 12 экзонов, которые дают начало 5 известным транскрипционным вариантам, кодирующим 3 изоформы белка. Каждый из транскрипционного варианта 1 (длина 2291 нт; RefSeq NM_000157.4), варианта 2 (длина 2344 нт; RefSeq NM_001005741.3) и варианта 3 (длина 2325 нт; NM_001005742.3) кодирует предшественник изоформы 1 GСазы, белок длиной 536 аминокислот (RefSeq NP_000148.2), включающий последовательность сигнального пептида длиной 39 аминокислот и зрелую полипептидную последовательность длиной 497 аминокислот,

содержащую 5 потенциальных сайтов N-связанного гликозилирования. Транскрипционный вариант 4 (длина 2161 нт; RefSeq NM_001171811.2) кодирует изоформу 2 GСазы, белок длиной 449 аминокислот, а вариант 5 (длина 2144 нт; RefSeq NM_001171812.2) кодирует изоформу 3 GСазы, белок длиной 487 аминокислот.

[0029] Было идентифицировано по меньшей мере 200 вредоносных мутаций гена GBA, ассоциированных с GD1, включая миссенс- и нонсенс-мутации, варианты границы сплайсинга, делеции и вставки одного или нескольких нуклеотидов, а также рекомбинацию с псевдогеном (GBAP), расположенным ниже GBA. Патогенные мутации были ассоциированы с нестабильностью мРНК, преждевременной терминацией трансляции и потерей белка, а также с мутациями, воздействующими на ферментативную активность белка.

[0030] Распространенность GD1 варьируется в разных популяциях. Например, GD1 более распространена у лиц с происхождением от евреев-ашкенази (приблизительно 1-2:1000), но гораздо реже встречается в других популяциях европеоидов (приблизительно 1-2:100000). Подтвержденный диагноз GD1 устанавливается фенотипически путем обнаружения низкой ферментативной активности GСазы (0-15% от нормы) в лейкоцитах или мононуклеарных клетках крови, а также молекулярно-генетически путем обнаружения биаллельных патогенных мутаций в гене GBA, например, при анализе последовательности GBA с последующим нацеленным на ген анализом делеции-дубликации для тестирования вовлечения близлежащего псевдогена, если патогенные варианты не обнаружены. Хотя в случае GD1 многие мутации являются патогенными, четыремя наиболее распространенными, на долю которых приходится приблизительно 90% патогенных вариантов у евреев-ашкенази и приблизительно 50-60% у отличных от еврейских популяций, являются с.84dupG (также называемая 84GG), с.115+1G>A (также называемая IVS2+1), р.Asn409Ser (также называемая р.N370S или с.1226A>G) и р.Leu483Pro (также называемая р.L444P или с.1448T>C).

[0031] Для лечения GD1 методом заместительной ферментной терапии одобрены три препарата на основе рекомбинантной GСазы. Велаглуцераза альфа (торговое название VPRIV®) имеет такую же аминокислотную последовательность, что и зрелая изоформа 1 GСазы; имиглуцераза (торговое название Cerezyme®) имеет такую же аминокислотную последовательность, что и зрелая изоформа 1 GСазы, за исключением замены Arg495His; и талиглуцераза альфа (торговое название Elelyso®) имеет такую же аминокислотную последовательность, что и зрелая изоформа 1 GСазы, за исключением 2 дополнительных аминокислот на ее N-конце (Glu-Phe) и 7 дополнительных аминокислот на ее C-конце (Asp-Leu-Leu-Val-Asp-Thr-Met).

Аденоассоциированный вирус (AAV)

[0032] В настоящем изобретении предусмотрены векторы, созданные из рекомбинантно модифицированного аденоассоциированного вируса (AAV). Векторы на основе AAV способны доставлять гены, которые могут находиться под контролем транскрипционных и других регуляторных элементов, в целевые клетки посредством

трандукции. Путем поставки функциональной копии гена в клетку-мишень, в которой эндогенная версия отсутствует или подверглась мутации, векторы на основе AAV применимы в генной терапии различных заболеваний и нарушений.

[0033] AAV представляет собой небольшой безоболочечный, по-видимому, непатогенный парвовирус, который зависит от определенных других вирусов в поставке генных продуктов, известных как хелперные факторы, необходимых для его собственной репликации, причуда биологии, которая сделала AAV оптимальным для использования в качестве рекомбинантного вектора. Например, вирусом-помощником может служить аденовирус (AdV), обеспечивая определенные аденовирусные факторы, такие как белки E1A, E1B55K, E2A и E4ORF6, а также РНК VA, в клетках, коинфицированных аденовирусом и AAV. Также были идентифицированы другие вирусы-помощники, такие как вирус простого герпеса. Зависимость репликации AAV от вспомогательных факторов, поставляемых другими вирусами, привела к тому, что AAV характеризуется как тип депендовirusа. Вирионы AAV имеют две основные структурные особенности, называемые капсидом и геномом соответственно. Капсид представляет собой икосаэдрическую белковую оболочку, которая окружает и защищает (инкапсидирует) вирусный геном, содержащий гены и другие последовательности, необходимые для репликации вируса в инфицированных клетках.

[0034] Геном AAV представляет собой одну нить ДНК, содержащую два гена, называемые *rep* и *cap*. В AAV2, встречающемся в природе AAV, который инфицирует людей и особенно хорошо охарактеризован биологически, длина генома составляет приблизительно 4,7 т. н. За счет альтернативного сплайсинга транскриптов с двух промоторов ген *rep* способен продуцировать четыре родственных многофункциональных белка, называемых Rep (называемые в AAV2 Rep 78, Rep 68, Rep 52 и Rep 40, при этом название соответствует их средней молекулярной массе), которые вовлечены в экспрессию вирусных генов, а также в репликацию и упаковку геномов. Альтернативный сплайсинг транскрипта с одиночного промотора, контролирующего одиночный ген *cap*, приводит к образованию трех родственных структурных белков, VP1, VP2 и VP3, при этом в общей сложности 60 из них подвергаются самосборке с образованием икосаэдрического капсида вируса в соотношении примерно 1:1:10 соответственно. VP1 является самым длинным из трех белков VP и содержит в своей аминоконцевой области аминокислоты, которые отсутствуют в VP2, который, в свою очередь, длиннее, чем VP3, и содержит в своей аминоконцевой области аминокислоты, которые отсутствуют в VP3. Капсидные белки не только удерживают геном, но и опосредуют специфические связывающие взаимодействия с рецепторами на поверхности клеток-мишеней, на основании чего AAV можно ограничить в их способности инфицировать определенные виды животных и даже ткани в пределах одного и того же типа животных - явление, называемое тропизм. Например, один тип AAV может преимущественно инфицировать клетки печени (например, гепатоциты) по сравнению с мышечными клетками или нейронами.

[0035] Помимо генов *rep* и *cap* интактные геномы AAV имеют относительно короткий (145 нуклеотидов в AAV2) элемент последовательности, расположенный на каждом из их 5'- и 3'-концов, называемый инвертированным концевым повтором (ITR). ITR содержат вложенные палиндромные последовательности, которые способны к самогибридизации посредством спаривания оснований по Уотсону-Крику с образованием Т-образной или шпильчатой вторичной структуры. Было продемонстрировано, что ITR выполняют в AAV2 важные функции, необходимые для жизненного цикла вируса, включая преобразование однонитевого ДНК-генома в двухнитевую форму, необходимую для экспрессии генов, а также упаковку с помощью белков Rep однонитевых геномов AAV в капсидные сборки.

[0036] У разных видов были обнаружены многочисленные встречающиеся в природе типы AAV. В свое время из биологических образцов было выделено только шесть типов AAV приматов (AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5 и AAV6), первые пять из которых достаточно различались структурно, чтобы их можно было классифицировать как разные серотипы на основе экспериментов по перекрестной реактивности антител. Позднее два новых AAV, называемые AAV7 и AAV8, были обнаружены с помощью ПЦР-амплификации ДНК макаков-резусов с использованием праймеров, нацеленных на высококонсервативные области в генах *cap* ранее обнаруженных AAV. Gao, G, et al., *Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy*, PNAS (USA) 99(18):11854-11859 (2002). Впоследствии аналогичный подход использовали для клонирования многочисленных новых AAV из тканей человека и отличных от человека приматов, что значительно расширило область известных последовательностей капсидных белков AAV. Gao, G, et al., *Clades of Adeno-Associated Viruses Are Widely Disseminated in Human Tissues*, J Virol. 78(12):6381-6388 (2004). Многие последовательности капсидных белков AAV очень похожи друг на друга или на ранее идентифицированные AAV, и хотя их часто называют отдельными “серотипами” AAV, не все такие капсиды обязательно будут иммунологически различимы при тестировании с помощью перекрестной реактивности антител. AAV или капсиды AAV, которые серологически неотличимы от заданного серотипа, но содержат капсидные белки с другой аминокислотной последовательностью, лучше называть вариантами известного серотипа. Многочисленные капсиды, созданные из встречающихся в природе и не встречающихся в природе капсидных белков, нашли применение при создании векторов генной терапии на основе AAV.

[0037] Как было установлено при изучении AAV2, после связывания с когнатным рецептором на поверхности клетки вирусная частица AAV поступает в клетку путем эндоцитоза. После достижения низкого значения pH лизосом капсидные белки претерпевают конформационные изменения, которые позволяют капсиду выйти в цитозоль, а затем транспортироваться в ядро. Оказавшись там, капсид разбирается, высвобождая геном, на который воздействуют клеточные ДНК-полимеразы, синтезируя вторую нить ДНК, начиная с ITR на 3'-конце, которая после самогибридизации

функционирует в качестве праймера. Затем может начаться экспрессия генов *rep* и *cap*, за которой следует образование и высвобождение из клетки новых вирусных частиц.

Векторы на основе AAV

[0038] Относительная простота структуры и жизненного цикла AAV, а также тот факт, что он, как известно, не является патогенным для человека, вдохновили исследователей на конструирование AAV и изучение возможности его преобразования из вируса в рекомбинантный вектор для генной терапии. Вкратце, это было сделано путем клонирования полного генома AAV2, включая оба ITR, в плазмиду, удаления генов *rep* и *cap* в отдельную плазмиду и замены их гетерологичной кассетой экспрессии генов, содержащей промотор, который контролирует трансген, кодирующий белок. Таким образом, единственными вирусными геномными последовательностями, сохранившимися в геноме вектора, были ITR, поскольку они играют решающую роль в упаковке и экспрессии генов, и без которых векторы на основе AAV не могли бы продуцироваться или функционировать для экспрессии трансгена после трансдукции клеток-мишеней. Наконец, чтобы избежать необходимости коинфицирования вирусом-помощником, необходимым для репликации вирионов AAV, гены так называемых хелперных факторов (в случае AdV, например, хелперные факторы E1A, E1B55K, E2A, E4ORF6 и РНК VA) клонировали в третью плазмиду.

[0039] Когда три плазмиды (иногда называемые плазмидой с трансгеном, плазмидой *rep/cap* и плазмидой-помощником) трансфицировали вместе в клетки-хозяева, являющиеся клетками млекопитающих, белки Rep и капсидные белки, а также факторы вируса-помощника экспрессировались с их соответствующих плазмид. Затем эти генные продукты осуществляли свои функции в клетках-хозяевах, реплицируя геном вектора в однострэнговую ДНК с плазмиды, на которой находилась его последовательность, собирая капсиды и упаковывая однострэнговые геномы в капсиды с образованием векторов. Затем векторы можно было очищать от клеток-хозяев. Поскольку гены *rep* и *cap* находились в *транс*-положении на другой плазмиде, вне их обычной обстановки с фланкированием ITR, они не были упакованы в векторы. Следовательно, хотя векторы на основе AAV, полученные таким образом, были способны связываться с клетками-мишенями и переносить кассету экспрессии внутри своих геномов в них, они не способны реплицироваться и создавать новые векторные частицы.

[0040] Если векторы функционируют так, как задумано, после трансдукции кассета экспрессии будет транскрипционно активной и будет продуцировать генный продукт, кодируемый трансгеном в клетке-мишени. Векторы на основе AAV обладают высокой универсальностью, поскольку могут быть разработаны геномы вектора, содержащие ряд трансгенов под контролем различных функциональных последовательностей и регуляторных элементов в различных конфигурациях, и объединены с рядом природных и сконструированных капсидов с различными тропизмами и другими свойствами. Следовательно, может продуцироваться множество типов генных продуктов с определенной степенью контроля в отношении клеток, которые подвергаются

трансдукции, и количества производимого генного продукта.

[0041] Векторы на основе AAV содержат геном вектора, инкапсидированный в капсид AAV. В некоторых вариантах осуществления геном вектора на основе AAV содержит по меньшей мере один инвертированный концевой повтор (ITR) AAV и гетерологичную нуклеотидную последовательность с требуемой функцией, когда он присутствует или экспрессируется в трансдуцированной клетке-мишени. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеотидная последовательность происходит из другого типа вируса или совершенно другого типа организма, например, животного, растения, простейшего, гриба, бактерии, археи или другого типа организма. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеотидная последовательность заменяет некоторые или все из нативных генов *rep* и/или *cap* AAV, так что вектор становится неспособным экспрессировать функциональные белки Rep или VP в трансдуцированных клетках-мишенях. В некоторых вариантах осуществления полная последовательность генома вектора состоит из гетерологичных нуклеотидных последовательностей, за исключением последовательностей инвертированных концевых повторов AAV, расположенных на концах генома.

Кассеты экспрессии

[0042] В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеотидная последовательность содержит кассету экспрессии, содержащую трансген, функционально связанный с промотором и необязательно одним или несколькими энхансерами, служащими для контроля инициации транскрипции трансгена с ДНК в РНК, а также элементом терминации транскрипции, таким как последовательность сигнала полиаденилирования, служащим для терминации транскрипции трансгена в РНК, или состоит из нее. Векторы на основе AAV могут содержать более одного трансгена либо как часть одной транскрипционной единицы, либо каждый из них является частью своей собственной транскрипционной единицы. Как описано в последующих разделах, кассеты экспрессии могут также содержать дополнительные элементы последовательности, разработанные для влияния на транскрипцию, стабильность транскрипта, трансляцию или другие функции.

[0043] Как правило, при разработке векторов на основе AAV структура кассеты экспрессии и генома в целом ограничена упаковочной емкостью капсида, так что в случае AAV2 длина трансгена в комбинации со всеми другими элементами генома, необходимыми для функционирования вектора, такими как элементы контроля транскрипции и ITR, не превышает приблизительно 5 т. н., хотя другие типы капсидов могут иметь большие или меньшие пределы упаковки. Однако в рамках ограничений по размеру существует большая гибкость в выборе трансгенов, ITR и других элементов, необходимых для того, чтобы вектор функционировал по своему назначению.

[0044] Для целей генной терапии трансгеном может быть любой ген, продукт которого, как можно было бы предполагать, осуществляет предупреждение или лечение, хотя и не обязательно излечение, любого заболевания, нарушения или состояния субъекта,

нуждающегося в предупреждении или лечении. В некоторых вариантах осуществления генная терапия предназначена для предупреждения или лечения заболевания, нарушения или состояния, характеризующегося аномально низким количеством или даже отсутствием продукта, продуцируемого встречающимся в природе геном у субъекта, например, это может происходить из-за мутации с потерей функции. Что касается таких вариантов осуществления, трансген может быть предназначен для компенсации дефектного гена субъекта путем обеспечения по меньшей мере некоторых клеток субъекта тем же самым или аналогичным генным продуктом при экспрессии. Неограничивающим примером мог бы служить вектор, разработанный для экспрессии функциональной версии фактора свертывания крови IX для применения в генной терапии гемофилии В, которая вызвана мутацией с потерей функции в нативном гене фактора IX. В других вариантах осуществления, однако, трансген может быть предназначен для противодействия эффектам мутации с вредоносным усилением функции в целевых клетках. В некоторых вариантах осуществления трансген может кодировать транскрипционный активатор для повышения активности эндогенного гена, который продуцирует необходимый генный продукт, или, наоборот, транскрипционный репрессор для снижения активности эндогенного гена, который продуцирует вредоносный генный продукт.

[0045] В некоторых вариантах осуществления трансген может кодировать полипептид или кодирует молекулу РНК с функцией, отличной от кодирования белка, например, регуляторную некодирующую молекулу РНК (например, микроРНК, малую интерферирующую РНК, РНК, действующую по механизму *piwi*, энхансерную РНК, длинную некодирующую РНК и т. д.). Последовательности, кодирующие белок, в трансгене могут быть кодон-оптимизированными, а сайты начала трансляции (например, последовательность Козак) могут быть модифицированы для увеличения или уменьшения их тенденции к инициации трансляции. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий аминокислотную последовательность, может содержать одну или несколько открытых рамок считывания и/или содержать одну или несколько пар донорных и акцепторных сайтов сплайсинга, что позволяет осуществлять альтернативный сплайсинг различных матричных РНК и полипептидных последовательностей из таких матричных РНК. Трансгены, кодирующие белки, дополнительно содержат один или несколько стоп-кодонов для завершения трансляции полипептидной цепи.

[0046] В некоторых вариантах осуществления геном вектора может быть разработан для целей редактирования или иного модифицирования генома клетки-мишени. Например, геном вектора может включать кассету экспрессии или трансген, фланкированный плечами гомологии, предназначенными для стимулирования гомологичной рекомбинации между геномом вектора и геномом клетки-мишени. В другом примере геном вектора может быть разработан для выполнения редактирования генов на основе CRISPR путем экспрессии направляющей РНК (gRNA) и/или эндонуклеазы, такой как Cas9 или родственные эндонуклеазы, такие как SaCas9,

способной связывать gRNA и расщеплять последовательность ДНК, на которую нацелена gRNA.

Трансгены GСазы

[0047] В некоторых вариантах осуществления векторы на основе AAV по настоящему изобретению содержат геном вектора, содержащий каскету экспрессии, которая содержит кодирующую последовательность для белка GСазы. Может быть использована кодирующая последовательность для любого белка GСазы с ферментативной активностью, способной расщеплять бета-гликозидную связь гликозилцерамида (также называемого гликозилцерамидом, гликозилцереброзидом, GlcCer), включая без ограничения изоформы белка лизосомной GСазы человека с номерами 1, 2 и 3 (RefSeq NP_000148.2, RefSeq NP_001165282.1 и RefSeq NP_001165283.1 соответственно), а также белки GСазы от видов, отличных от человека. В других вариантах осуществления белок GСазы может включать любые встречающиеся в природе варианты белка GСазы человека, которые не содержат патогенных мутаций, таких как кодоны преждевременной терминации трансляции или аминокислотные замены, вставки или делеции, которые существенно снижают ферментативную активность GСазы и/или стабильность белка. В других вариантах осуществления белок GСазы может включать сконструированные варианты белка GСазы человека, которые сохраняют ферментативную активность GСазы, такие как варианты изоформы 1 GСазы, используемые в методах рекомбинантной заместительной терапии на основе имиглюцеразы и талиглюцеразы альфа, а также другие сконструированные варианты, включая химерные варианты и варианты с аминокислотными заменами, вставками или делециями, разработанными для повышения специфической активности GСазы, добавления или удаления сайтов гликозилирования или сайтов для других посттрансляционных модификаций или изменения других аспектов структуры или функции GСазы. В некоторых вариантах осуществления нативная последовательность сигнального пептида секреции модифицирована или полностью заменена последовательностью сигнального пептида секреции из аналогичного или совершенно другого секретируемого белка.

[0048] Для применения в векторах на основе AAV по настоящему изобретению нуклеотидная последовательность, кодирующая белок GСазы, может представлять собой любую нуклеотидную последовательность, способную кодировать требуемый белок GСазы в типе клеток, которые требуется трансдуцировать вектором. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая белок GСазы (трансген), является такой же, как и существующая во встречающемся в природе гене, кодирующем GСазы, такую как GСазы человека, например, любая из встречающихся в природе человеческих нуклеотидных последовательностей, кодирующих изоформу номер 1 GСазы человека, например, RefSeq NM_000157.4 (или нуклеотиды 138-1748 включительно), RefSeq NM_001005741.3 (или нуклеотиды 191-1801 включительно) и RefSeq NM_001005742.3 (или нуклеотиды 172-1782 включительно); или кодирующих

изоформу номер 2 GСазы человека, например, RefSeq NM_001171811.2 (или нуклеотиды 269-1618 включительно); или кодирующих изоформу номер 3 GСазы человека, например RefSeq NM_001171812.2 (или нуклеотиды 138-1601 включительно).

[0049] В других вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая белок GСазы, может отличаться по одному или нескольким нуклеотидным положениям по сравнению с встречающейся в природе нуклеотидной последовательностью и, в силу вырожденности генетического кода, по-прежнему кодировать идентичный белок GСазы, что и встречающаяся в природе последовательность гена. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая белок GСазы, может быть намеренно модифицирована для воздействия на ее функцию в трансдуцированных клетках, например, для устранения мотивов последовательности, способных стимулировать врожденный иммунный ответ, для устранения скрытых границ сплайсинга, для устранения альтернативных стартовых кодонов, для повышения стабильности соответствующей мРНК и/или для увеличения скорости трансляции мРНК в белок. В других вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая белок GСазы, может не содержать интронов или может включать один или несколько интронов, прерывающих кодирующую последовательность, но которые удаляются аппаратом сплайсинга в трансдуцированных клетках, чтобы обеспечить возможность трансляции требуемого белка GСазы.

[0050] В некоторых вариантах осуществления векторы на основе AAV по настоящему изобретению содержат трансген, кодирующий белок GСазы, содержащий зрелый полипептид GСазы, неограничивающим примером которого является аминокислотная последовательность под SEQ ID NO:40. В некоторых других вариантах осуществления векторы на основе AAV по настоящему изобретению содержат трансген, кодирующий белок-предшественник GСазы, содержащий сигнальный пептид секреции и зрелый полипептид GСазы или состоящий из них, где неограничивающие примеры сигнального пептида секреции включают аминокислотные последовательности под SEQ ID NO:38 или SEQ ID NO:39, а неограничивающий пример зрелого полипептида GСазы включает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:40. В некоторых вариантах осуществления векторы на основе AAV по настоящему изобретению содержат трансген, кодирующий зрелый полипептид GСазы, неограничивающим примером которого является нуклеотидная последовательность под SEQ ID NO:13. В некоторых других вариантах осуществления векторы на основе AAV по настоящему изобретению содержат трансген, кодирующий белок-предшественник GСазы, неограничивающие примеры которого включают нуклеотидные последовательности под SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37 или SEQ ID NO:41.

[0051] В некоторых других вариантах осуществления векторы на основе AAV по настоящему изобретению содержат трансген, кодирующий зрелый полипептид GСазы или белок-предшественник GСазы, где последовательность белка, кодируемая трансгеном,

очень похожа или идентична последовательности белка с эталонной последовательностью, но где нуклеотидные последовательности трансгена и эталонной последовательности характеризуются определенным процентом идентичности, при этом различия соответствуют положениям внутри кодонов, которые не изменяют соответствующую аминокислоту. Например, в некоторых вариантах осуществления трансген кодирует тот же белок GСазы, что и SEQ ID NO:28, и имеет нуклеотидную последовательность на по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% идентичную SEQ ID NO:28; трансген кодирует тот же белок GСазы, что и SEQ ID NO:29, и имеет нуклеотидную последовательность на по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% идентичную SEQ ID NO:29; трансген кодирует тот же белок GСазы, что и SEQ ID NO:30, и имеет нуклеотидную последовательность на по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% идентичную SEQ ID NO:30; трансген кодирует тот же белок GСазы, что и SEQ ID NO:31, и имеет нуклеотидную последовательность на по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% идентичную SEQ ID NO:31; трансген кодирует тот же белок GСазы, что и SEQ ID NO:32, и имеет нуклеотидную последовательность на по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% идентичную SEQ ID NO:32; трансген кодирует тот же белок GСазы, что и SEQ ID NO:33, и имеет нуклеотидную последовательность на по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% идентичную SEQ ID NO:33; трансген кодирует тот же белок GСазы, что и SEQ ID NO:34, и имеет нуклеотидную последовательность на по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% идентичную SEQ ID NO:34; трансген кодирует тот же белок GСазы, что и SEQ ID NO:35, и имеет нуклеотидную последовательность на по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% идентичную SEQ ID NO:35; трансген кодирует тот же белок GСазы, что и SEQ ID NO:36, и имеет нуклеотидную

последовательность на по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% идентичную SEQ ID NO:36; трансген кодирует тот же белок GCазы, что и SEQ ID NO:37, и имеет нуклеотидную последовательность на по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% идентичную SEQ ID NO:37; или трансген кодирует тот же белок GCазы, что и SEQ ID NO:41, и имеет нуклеотидную последовательность на по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% идентичную SEQ ID NO:41.

[0052] Процент идентичности нуклеотидной последовательности между эталонной последовательностью и трансгеном можно определить любым известным в данной области способом. Например, в некоторых вариантах осуществления нуклеотидные последовательности эталонной последовательности и трансгена (или аминокислотные последовательности, кодируемые ими) можно выровнять и сравнить по их полной длине и рассчитать процент идентичности нуклеотидных последовательностей с помощью компьютерного алгоритма. Иллюстративным алгоритмом для глобального выравнивания и сравнения нуклеотидных последовательностей является алгоритм Нидлмана-Вунша. Однако в других вариантах осуществления можно использовать алгоритм локального выравнивания, такой как алгоритм BLAST. *Needleman, SB, and Wunsch, CD, J Mol Biol, 48(3):443-53 (1970); States DJ, et al., Methods: A companion to Methods in Enzymology 3:66-70 (1991); Pearson, WR, Curr Protoc Bioinformatics, 43:3.5.1-3.5.9 (2013)*. В некоторых вариантах осуществления, если одна или вторая из эталонной и трансгенной последовательностей содержит некодирующую последовательность, такую как интрон или стоп-кодон, то некодирующую(-ие) последовательность(-и) игнорируют и только белок-кодирующие последовательности в пределах эталонной и трансгенной последовательностей выравнивают и сравнивают. После того, как будет установлено оптимальное глобальное выравнивание между эталонной последовательностью и трансгеном, можно рассчитать процент идентичных нуклеотидов между выровненными последовательностями.

[0053] Как известно в данной области техники, алгоритмы сравнения последовательностей позволяют пользователям определять оценки замен и штрафы за гэп - параметры, используемые для расчета оценок выравнивания для многочисленных возможных вариантов выравнивания, которые могут быть выполнены. Тогда оптимальным считается выравнивание с наивысшей оценкой. Оценка замен подразумевает назначение численного вознаграждения за совпадения и штрафа за несовпадения. Примеры наборов соответствующих оценок совпадения и несовпадения включают 1,-1; 1,-2; 1,-3; 1,-4; 2,-3; 4,-5, хотя возможны и другие варианты. Стоимость

гэпа подразумевает назначение числового штрафа за существование гэпа (вставку или делецию нуклеотида), а также штрафа за увеличение ширины гэпа после его образования. Увеличение стоимости гэпа приведет к вариантам выравнивания, при которых уменьшается число вводимых гэпов. Иллюстративные наборы соответствующей стоимости существования и расширения гэпа включают 0,-4; -2,-2; -2,-4; -3,-3; -4,-2; -4,-4; -5,-2; -6,-2, хотя возможны и другие варианты. В некоторых вариантах осуществления выравнивание и сравнение эталонной и трансгенной последовательностей выполняют с использованием стандартных оценок замен и штрафов за гэп, а также любых других настроек по умолчанию, предоставляемых компьютерным программным обеспечением или алгоритмом для выполнения анализа.

Последовательности сигнального пептида секреции

[0054] Согласно определенным вариантам осуществления векторы на основе AAV по настоящему изобретению могут быть разработаны и сконструированы для трансдукции клеток, в которых дефицит белка GСазы напрямую влияет на этиологию GD1, например, клеток моноцитарной и макрофагальной линий, которые образуют клетки Гоше в результате накопления не полностью метаболизированного глюкозилцерамидного субстрата. В таких вариантах осуществления желательно, чтобы GСазы, продуцируемая после трансдукции вектора, оставалась в клетках, в которых ее присутствие может компенсировать потерю функции нативных генов GСазы.

[0055] Однако в других вариантах осуществления векторы на основе AAV по настоящему изобретению могут быть разработаны и сконструированы для трансдукции клеток в органах, например, гепатоцитов печени, из которых GСазы, продуцируемая после трансдукции вектора, секретируется и распространяется по всему организму, например, в кровь, где она может быть захвачена и использована другими клетками, например, моноцитами и макрофагами. В таких вариантах осуществления часто бывает полезно разработать вектор таким образом, чтобы белок GСазы включал последовательность сигнального пептида секреции, чтобы гарантировать, что белок GСазы может секретироваться из трансдуцированных клеток в кровотоки. В противном случае моноцитам и макрофагам или другим клеткам может быть доступно недостаточное количество GСазы для коррекции потери функции нативных генов GСазы.

[0056] Любую последовательность сигнального пептида секреции, известную в данной области как эффективную, чтобы обеспечить секрецию белка из клетки, в которой он синтезируется, можно использовать в сочетании с векторами на основе AAV по настоящему изобретению. Желательно, но не обязательно, чтобы такие сигнальные пептиды удалялись из белка клеткой в процессе секреции. В некоторых вариантах осуществления можно использовать встречающийся в природе сигнальный пептид секреции изоформы 1 белка-предшественника GСазы человека, аминокислотная последовательность которого представлена под SEQ ID NO:39. Однако в других вариантах осуществления нативный сигнальный пептид GСазы можно заменять сигнальным пептидом из другого секретируемого белка человека или другого вида,

например, для повышения скорости секреции GСазы, производимой в трансдуцированных клетках, или по какой-либо иной причине, как например для снижения иммуногенности.

[0057] В данной области техники известны многочисленные гетерологичные сигнальные пептиды секреции, которые можно использовать для облегчения секреции GСазы из клеток, например, клеток печени, трансдуцированных векторами на основе AAV по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления последовательность сигнального пептида происходит из любого из множества белков, производимых и секретируемых гепатоцитами или клетками печени. Неограничивающие примеры включают последовательности сигнального пептида из белков человека, таких как альфа-1-антитрипсин, альфа-1-антихимотрипсин, альфа-1-кислый гликопротеин 1, сывороточный альбумин, фосфатидилэтаноламин-связывающий белок 1, гаптоглобин, ингибитор 1 активатора пламиногена, бета-2-микроглобулин, пептидил-пролил цис-транс-изомеразы В, ретинол-связывающий белок 4, фетуин-А, компонент С3 системы комплемента, аполипопротеин А-I, шаперон BiP эндоплазматического ретикулума, фактор В системы комплемента, белок АМВР, аполипопротеин Е, кластерин, катепсин D, серотрансферрин, альфа-1-кислый гликопротеин 2 и компонент С4-В системы комплемента, а также многие другие возможные. Аминокислотные последовательности и кодирующие нуклеотидные последовательности для этих и других секретируемых белков доступны из открытых баз данных последовательностей, таких как Genbank. В других вариантах осуществления последовательности сигнальных пептидов секреции для применения с векторами по настоящему изобретению могут происходить из белков человека или других видов, которые в на высоком уровне секретируются клетками, отличными от клеток печени, например, тяжелой цепи человеческого или мышинового IgG или легких каппа- или лямбда-цепей. Например, в одном неограничивающем варианте осуществления может использоваться сигнальный пептид из тяжелой цепи мышинового IgG, аминокислотная последовательность которого представлена под SEQ ID NO:38. Аминокислотную последовательность встречающихся в природе сигнальных пептидов секреции можно модифицировать для требуемого изменения их функции, равно как и нуклеотидную последовательность, кодирующую такие сигнальные пептиды дикого типа или модифицированные сигнальные пептиды, для достижения требуемого типа оптимизации последовательности, например, удаления мотивов CpG. В других вариантах осуществления могут использоваться полностью синтетические последовательности сигнального пептида секреции.

Области контроля транскрипции

[0058] Векторы на основе AAV по настоящему изобретению, предназначенные для экспрессии белка GСазы в трансдуцированных клетках и/или из них, могут дополнительно содержать как часть генома вектора одну или несколько областей контроля транскрипции в функциональной связи с трансгеном, кодирующим полипептидную последовательность GСазы. Как дополнительно обсуждается ниже, в данной области техники известны различные типы областей контроля транскрипции,

которые можно использовать для контроля инициации транскрипции трансгена в РНК. Используемый в данном документе термин “функциональная связь” и его вариации, такие как “оперативная связь”, “функционально связанный” и “оперативно связанный”, относятся к функциональной взаимосвязи между областью контроля транскрипции и трансгеном, так что область контроля может влиять на транскрипцию трансгена (положительно или отрицательно), без указания какой-либо конкретной пространственной или структурной взаимосвязи между ними. Так, например, область контроля транскрипции может быть функционально связана с трансгеном, даже если она расположена с 5' или 3'-конца от трансгена и/или расположена в непосредственной близости от трансгена или в отдалении от него. Области контроля транскрипции могут быть конститутивно активными, активными в определенных клетках или тканях, индуцируемо активными в ответ на некоторые стимулы окружающей среды, могут происходить из встречающегося в природе гена (любого подходящего вида) и могут быть модифицированы для улучшения или изменения их функции или даже быть полностью синтетическими.

[0059] В некоторых вариантах осуществления область контроля транскрипции содержит промоторную область, которая содержит минимальную последовательность ДНК, необходимую для инициации транскрипции аппаратом транскрипции в трансдуцированных клетках (например, ТАТА-бокс или инициаторную последовательность), часто также один или несколько дополнительных проксимальных элементов, которые действуют по отдельности или совместно для увеличения скорости транскрипции с основного промотора. В зависимости от своей последовательности промотор может иницировать транскрипцию РНК-полимеразой I, II или III, но в векторах на основе AAV, предназначенных для экспрессии в трансдуцированных клетках такого полипептида, как GCаза, часто используются промоторы из генов, кодирующих белок, которые обычно транскрибируются РНК-полимеразой II.

[0060] В других вариантах осуществления область контроля транскрипции содержит или дополнительно содержит по меньшей мере одну энхансерную область, функция которой заключается в дополнительном увеличении скорости транскрипции гена сверх той, которую может поддерживать основной промотор сам по себе. В естественной обстановки энхансеры часто располагаются в отдалении от промотора гена, на который они действуют, иногда на десятки, сотни или тысячи пар оснований выше (т. е. в направлении 5'-конца), но энхансеры могут также располагаться в других местах, таких как интроны, или ниже (т. е. в направлении 3'-конца) гена, на который они действуют. В то время как промоторные области могут содержать проксимальные энхансерные элементы (подпоследовательности, удаление которых приведет к снижению транскрипции с основного промотора), энхансеры обычно не содержат последовательностей, которые могут функционировать как основной промотор. Хотя в природе энхансерные области часто располагаются в отдалении от промотора гена, на который они действуют, энхансерные области или энхансерные элементы из более крупных энхансерных областей

(такие элементы часто соответствуют ДНК-связывающим сайтам для факторов транскрипции) иногда могут сохранять по меньшей мере часть своей функции усиления транскрипции, если их удалить из их естественной обстановки и переместить гораздо ближе к промотору, будь то из того же или даже другого гена.

[0061] Описанные в научной литературе энхансерные и промоторные области генов могут оказаться слишком крупными для размещения в комбинации с трансгеном и другими геномными элементами, необходимыми для функционирования вектора, из-за упаковочной емкости капсидов AAV. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления в пределах более длинных энхансерных или промоторных областей можно идентифицировать функциональные подпоследовательности с использованием способов, знакомых специалистам средней квалификации в данной области техники, и эти более короткие функциональные подпоследовательности встраивают в области контроля транскрипции для применения в векторах по настоящему изобретению. Таким образом можно уменьшить размер областей контроля транскрипции, при этом сохраняя их требуемую функцию. Используя этот подход, функциональные элементы из встречающихся в природе энхансеров или промоторов можно комбинировать новыми способами, например, изменяя их число, расстояние и/или расположение, с созданием гибридных или синтетических энхансеров и/или промоторов с улучшенными свойствами. В некоторых вариантах осуществления каждый из энхансера и промотора может быть получен из одного и того же встречающегося в природе гена, тогда как в других вариантах осуществления энхансер и промотор могут происходить из совершенно разных генов, включая гены разных видов.

[0062] В некоторых вариантах осуществления с точки зрения кодирующей нити (т. е. плюс-нити) однонитевого ДНК-генома вектора на основе AAV последовательность промотора располагается с 5'-конца от нижележащей последовательности, подлежащей транскрипции в РНК, такой как трансген, кодирующий белок, такой как GCазу. В некоторых вариантах осуществления энхансерные элемент или область, если они присутствуют, могут быть расположены с 5'-конца от последовательности промотора или же располагаться в другом месте генома, например, в 5'- или 3'-нетранслируемой области (UTR), смежной с трансгеном, в интроне, с 3'-конца от последовательности сигнала терминации транскрипции или в другом месте. В некоторых вариантах осуществления геном вектора может содержать более одной энхансерной области (одного и того же или разных типов), которые могут располагаться рядом друг с другом или на расстоянии друг от друга и/или разделяться другими функциональными элементами внутри генома. В некоторых вариантах осуществления один и тот же энхансерный элемент или область обеспечены в виде последовательно расположенного массива из повторяющихся единиц, например, 2, 3, 4 или более.

[0063] В некоторых вариантах осуществления области контроля транскрипции для применения в векторах на основе AAV по настоящему изобретению не являются тканеспецифичными, что означает, что они конститутивно активны во многих различных

типах клеток, хотя и не обязательно во всех. Согласно некоторым вариантам осуществления не являющиеся тканеспецифичными области контроля транскрипции включают промоторы (которые могут включать энхансерные элементы, расположенные вблизи основного промотора), полученные из определенных вирусов, например, из главного немедленно-раннего гена цитомегаловируса человека (CMV-IE) (*Boshart, M, et al., Cell, 41:521-30 (1985); Yew, NL, et al., Hum Gene Ther, 8:575-84 (1997)*); вируса обезьян 40 (SV40); а также промоторы ретровирусных длинных концевых повторов (LTR) из вируса саркомы Рауса (RSV) и вируса мышинного лейкоза Молони (MoMLV). В других вариантах осуществления не являющиеся тканеспецифичными области контроля транскрипции включают промоторы (которые могут включать проксимальные энхансерные элементы), которые могут быть получены из генов, активных во многих различных типах клеток, в том числе у различных типов животных, например, гена фактора элонгации полипептидной цепи человека (EF1 α); гена фосфоглицераткиназы (PGK); гена убиквитина С (UbiC); гена бета-актина курицы (CBA); промоторы малых ядерных РНК U1a1 или U1b2 (*Bartlett, JS, et al., Proc Natl Acad Sci USA 93: 8852-7 (1996); Wu, Z, et al., Mol Ther, 16(2):280-9 (2008)*); промоторы гистона H2 или гистона H3 (*Hurt, MM, et al., Mol Cell Biol 11:2929-36 (1991); Wu, Z, et al., Mol Ther, 16(2):280-9 (2008)*)).

[0064] Аналогичным образом, энхансерные области могут быть получены из вирусов и генов, активных в различных типах клеток у различных типов животных. Как уже отмечалось, в некоторых вариантах осуществления промотор и энхансер, полученные из одного и того же гена, можно комбинировать для создания области контроля транскрипции для применения в векторах по настоящему изобретению, но можно комбинировать энхансеры и промоторы из разных генов для создания гибридных областей контроля транскрипции. Широко используемым примером является гибридная область enh/pro размером 1,6 т. н., называемая CAG (или CAGGS), содержащая энхансер немедленно-раннего гена CMV, промотор гена бета-актина курицы (CBA) и интрон/экзон 1 CBA (*Niwa, H, et al., Gene, 108:193-9 (1991); Ikawa, M, et al., Dev Growth Differ, 37:455-9 (1995)*), а также более поздние модификации, которые уменьшили его размер, включая одну, в которой интрон CBA был заменен на меньший интрон вируса обезьян 40 (SV40) (*Wang, Z, et al., Gene Ther, 10:2105-11 (2003)*), и другую, называемую гибридным интроном CBA (CBh), в которой интрон SV40 был заменен гибридным интроном, состоящим из 5'-донорного сайта сплайсинга из 5'-UTR CBA и 3'-акцепторного сайта сплайсинга из интрона MVM (*Gray, SJ, et al., Hum Gene Ther, 22:1143-53 (2011)*)).

[0065] В некоторых вариантах осуществления области контроля транскрипции для применения в векторах на основе AAV по настоящему изобретению могут быть специфичными для ткани печени, что означает, что они более или наиболее активны в управлении экспрессией трансгена в клетках печени, таких как гепатоциты, по сравнению с клетками других тканей или органов. Не желая ограничиваться теорией, одним из механизмов, посредством которого может возникать специфичность для ткани печени, является наличие в энхансере и/или промоторе одного или нескольких специфических

сайтов связывания для ДНК-связывающих белков-активаторов транскрипции, преимущественно экспрессируемых в клетках печени. В некоторых вариантах осуществления может быть преимущественным применение специфичной для ткани печени области контроля транскрипции за счет снижения или даже предупреждения экспрессии трансгена в клетках, отличных от клеток печени, которые могут быть трансдуцированы вектором, что может снижать риск нецелевых эффектов.

[0066] Специфичные для печени области контроля транскрипции могут быть получены из генов, которые естественным образом экспрессируются в печени на высоком уровне, примерами которых являются гены альбумина, транстиретина (преальбумина), альфа-1-антитрипсина, протромбина и многих других. Определенные специфичные для печени гены, экспрессируемые на высоком уровне, имеют как энхансеры, так и промоторы, которые могут быть включены в области контроля транскрипции. В некоторых вариантах осуществления энхансер и промотор, полученные из одного и того же гена, можно комбинировать в специфичной для печени области контроля транскрипции, тогда как в других вариантах осуществления энхансер из одного гена и промотор из другого гена можно комбинировать в гибридной специфичной для печени области контроля транскрипции. Если они происходят из одного и того же гена, то последовательность области контроля транскрипции, содержащую один или несколько энхансеров и промотор, можно скопировать в том виде, в котором она существует в нативном гене, из которого она получена, или сконструировать с уменьшением ее длины, например, путем удаления транскрипционно неактивных последовательностей, разделяющих один или несколько энхансеров и промотор. В некоторых вариантах осуществления энхансеры и промоторы для применения в специфичных для печени областях контроля транскрипции можно получить из генов разных видов. В других вариантах осуществления последовательность энхансера и/или промотора в области контроля транскрипции можно модифицировать относительно их исходной последовательности путем изменения, добавления или удаления нуклеотидов для улучшения их функции, например, увеличения связывания активатора транскрипции, уменьшения связывания репрессора транскрипции или уменьшения размера области контроля транскрипции. В некоторых вариантах осуществления именно энхансер обеспечивает специфичную для печени экспрессию, а промотор сам по себе не является специфичным для печени, тогда как в других вариантах осуществления именно промотор обеспечивает специфичную для печени экспрессию, а энхансер, если он присутствует, сам по себе не является специфичным для печени, но способен увеличивать скорость транскрипции со специфичного для печени промотора. Например, сильный вирусный энхансер, такой как энхансер главного немедленно-раннего гена CMV человека, можно объединять со специфичным для печени промотором или сильный специфичный для печени энхансер, такой как из гена альбумина, можно объединить с сильным вирусным промотором, таким как промотор раннего гена SV40. В других вариантах осуществления каждый из как энхансера, так и промотора является специфичным для печени. В

некоторых вариантах осуществления различные энхансерные области можно объединить с образованием химерных энхансерных областей, которые применимы в областях контроля транскрипции в векторах на основе AAV по настоящему изобретению.

[0067] Неограничивающие примеры энхансеров и промоторов, которые могут использоваться и входить в состав специфичных для печени областей контроля транскрипции векторов на основе AAV по настоящему изобретению, включают энхансеры (по меньшей мере три из которых были охарактеризованы) и промотор из гена альбумина (*Minghetti, PP, et al., J Biol Chem, 261(15):6747-57 (1986); Frain, M, et al., Mol Cell Biol, 10(3):991-9 (1990); Hayashi, Y, et al., J Biol Chem, 267(21):14580-5 (1992)*); энхансер(-ы) и промотор из генов альфа-1-антитрипсина (A1AT) мыши или человека (*Costa, RH, et al., Mol Cell Biol, 9(4):1415-25 (1989); De Simone, V, et al., EMBO J, 6(9):2759-66 (1987); Monaci, P, et al., EMBO J, 7(7):2075-87 (1988); Hafenrichter, DG, et al., Blood, 84:3394-3404 (1994); Le, M, et al., Blood, 89:1254-59 (1997)*); энхансер(-ы) и промотор из гена транстретина (TTR) (*Tsuszuki, T, et al., J Biol Chem, 260(22):12224-7 (1985); Costa, RH, et al., Mol Cell Biol, 6(12):4697-708 (1986)*); энхансер(-ы) и промотор из гена альфа-фетопротейна (AFP); энхансер(-ы) и промотор из гена протромбина (*Bancroft, JD, et al., Biochem, 31:12469-76 (1992)*) и энхансерные области HCR1 и HCR2 из кластера генов аполипопротеина E/C-I человека (*Allan, CM, et al., J Biol Chem, 272(46):29113-9 (1997); Dang, Q, et al., J Biol Chem, 270(38):22577-85 (1995); Simone, WS, et al., J Biol Chem, 268(11):8221-9 (1993)*). Любой из вышеперечисленных энхансеров можно комбинировать с любым из вышеперечисленных промоторов из тех же или других генов с целью построения специфичных для печени областей контроля транскрипции для применения в векторах на основе AAV по настоящему изобретению.

[0068] Были описаны различные специфичные для ткани печени области контроля транскрипции, представляющие собой гибридные комбинации энхансеров и промоторов из разных генов (и из одного и того же или разных видов, таких как мышь, крыса или человек), или области контроля транскрипции из специфичных для печени генов, сконструированные для уменьшения их размера или улучшения их производительности, любые из которых можно использовать в векторах на основе AAV по настоящему изобретению для экспрессии белка GСазы в трансдуцированных клетках печени. Неограничивающие примеры включают энхансерную область HCR1 из гена ApoE человека в комбинации с промотором из гена альфа-1-антитрипсина человека (hAAT), при этом были созданы их различные версии с целью уменьшения размера сконструированных элементов (*Miao, CH, et al., Mol Ther, 1:522-532 (2000); Dang Q, et al., J Biol Chem 270:22577-22585 (1995); Davidoff AM, et al., Mol Ther 11:875-888 (2005); Hafenrichter DG, et al., Blood 84:3394-3404 (1994); McIntosh J, et al., Blood 121:3335-3344 (2013); Nathwani AC, et al., Blood 107:2653-2661 (2006)*); минимальный энхансер и промотор гена TTR (*Yan, C, et al., EMBO J, 9:869-78 (1990); Samadani, U and Costa, RH, Mol Cell Biol, 16:6273-84 (1996)*); промотор гена фактора IX человека в комбинации с мультимеризованными сайтами связывания печеночных факторов транскрипции (элементы сайта 5) (GTV) (*Hoag,*

H, et al., Gene Ther, 6:1584-89 (1999)); промотор гена фактора VIII человека в комбинации с мультимеризованными сайтами связывания HNF-1 из того же гена (PF8+5HNF-1) (*Notley, C, et al., Hum Gene Ther, 13:1583-93 (2002)*); основной промотор гена альбумина мыши в комбинации с коротким интроном, полученным из интрона SV40 (*Sarkar, R, et al., J Thromb Haemost, 1: 220-6 (2003)*); две копии энхансера гена α 1-микроглобулина/бикунина в комбинации с промотором гена тироксин-связывающего глобулина (*Rouet P, et al., J Biol Chem 267:20765-20773 (1992)*; *Hayashi Y, et al., Mol Endocrinol 7:1049-1060 (1993)*; *Ill, CR, et al., Blood Coagul Fibrinolysis, 8(Suppl 2):S23-S30 (1997)*; *Wang, L, et al., Proc Natl Acad Sci USA, 96:3906-10 (1999)*); *Wang L, et al., Blood 105:3079-3086 (2005)*); промотор гена альбумина в комбинации с энхансером гена α -фетопротеина MERII (*Wooddell, CI, et al., J Gene Med, 10:551-63 (2008)*) и случайным образом собранные сайты связывания гепатоцит-специфичных факторов транскрипции, связанные с промотором гена транстиретина мыши (*Vigna E, et al., Mol Ther 11:763-775 (2005)*)).

[0069] Дополнительные ссылки, относящиеся к специфичным для ткани печени областям контроля транскрипции, включают: *Schiedner G, et al., Nat Genet 18:180-183 (1998)*; *Xiao, W, et al., J Virol 72:10222-10226 (1998)*; *Kuriyama S, et al., Cell Struct Funct 16:503-510 (1991)*; *Chuah, MK, et al., Mol. Ther., 22:1605-1613 (2014)* и *Nair, N., et al., Blood, 123:3195-3199 (2014)*.

[0070] В некоторых вариантах осуществления последовательность энхансера гена HCR может содержать пары оснований 134-442 из U32510.1 в GenBank или состоять из них, а промотор гена hAAT может содержать пары оснований 1747-2001 из K02212.1 в GenBank или состоять из них.

[0071] В некоторых вариантах осуществления область контроля транскрипции векторов на основе AAV по настоящему изобретению может содержать промотор гена альбумина человека (hALB), который в некоторых вариантах осуществления содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:10 или состоит из нее, или может состоять из него. В некоторых вариантах осуществления область контроля транскрипции может содержать проксимальный энхансер гена альбумина человека, который в некоторых вариантах осуществления содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:9 или состоит из нее, или может состоять из него или дополнительно содержать его. В некоторых вариантах осуществления область контроля транскрипции может содержать энхансер гена предшественника альфа-1-микроглобулина/бикунина (AMBPR), который в некоторых вариантах осуществления содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:8 или состоит из нее, или может состоять из него или дополнительно содержать его. В некоторых вариантах осуществления область контроля транскрипции может дополнительно содержать более одной копии указанной последовательности энхансера гена AMBPR, например, 2, 3, 4 или более таких последовательностей, которые могут располагаться последовательно один за другим. В некоторых вариантах осуществления область контроля транскрипции в направлении от 5'

к 3' может содержать два повтора последовательности энхансера гена AMBP, проксимальную последовательность энхансера гена hALB и последовательности промотора гена hALB, или может состоять из них. В некоторых вариантах осуществления такое расположение элементов может содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:42 или состоять из нее.

Последовательности сигнала терминации транскрипции

[0072] В некоторых вариантах осуществления векторы на основе AAV по настоящему изобретению содержат геном вектора, содержащий последовательность терминатора транскрипции, расположенную с точки зрения кодирующей (плюс) нити однонитевого ДНК-генома вектора с 3'-конца от трансгена. В некоторых вариантах осуществления другая последовательность, например, последовательность 3'-нетранслируемой области (UTR), может располагаться между последовательностью трансгена и последовательностью терминатора транскрипции. Общие сведения о терминации транскрипции можно найти, например, в *Proudfoot, NJ, Genes Devel, 25:1770-82 (2011)*; *Kuehner, JN, et al., Nat Rev Mol Cell Biol, 12:283-94 (2011)*; *Porrua, O and Libri, D, Nat Rev Mol Cell Biol, 16:190-202 (2015)*.

[0073] В некоторых вариантах осуществления, в частности, когда трансген содержит последовательность, кодирующую белок (в отличие от последовательности РНК с какой-либо функцией, отличной от кодирования белка), последовательность терминатора транскрипции может представлять собой последовательность сигнала полиаденилирования (сокращенно называемую по-разному “полиА”, “pA”, “поли(A)” или “p(A)”). В некоторых вариантах осуществления последовательности сигнала pA можно получить из встречающихся в природе генов и использовать в векторах, тогда как в других вариантах осуществления сигналы pA можно модифицировать, например, путем их укорачивания по сравнению с их естественными аналогами или изменения их последовательности, чтобы сделать их более эффективными в отношении терминации транскрипции. В других вариантах осуществления сигналы pA могут быть гибридными последовательностями, объединяющими последовательности pA из разных генов, или синтетическими.

[0074] Неограничивающие примеры сигналов pA, которые можно использовать в векторах по настоящему изобретению, включают сигнал pA из гена бычьего гормона роста (pA bGH); гена бета-глобина человека, мыши или кролика; позднего гена SV40; sNRP1; spA; гена тимидинкиназы вируса простого герпеса (TK HSV); или сайт полиаденилирования L3 аденовируса типа 5, а также возможны и другие. В других вариантах осуществления терминаторы транскрипции для применения в векторах по настоящему изобретению включают терминаторы, которые обеспечивают терминацию транскриптов РНК без управления полиаденилированием, такие как сигнал процессинга на 3'-конце мРНК гена гистона H4 (*Whitelaw, E, et al., Nucleic Acids Res, 14:7059-70 (1986)*).

[0075] В некоторых вариантах осуществления векторы на основе AAV по

настоящему изобретению содержат геномы вектора, содержащие трансген, терминация транскрипции которого обеспечивается включением сайта поли(А), полученного из гена бычьего гормона роста (bGH), который в некоторых вариантах осуществления содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:14 или состоит из нее; сайта поли(А) из вируса SV40, который в некоторых вариантах осуществления содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:24 или SEQ ID NO:25, или состоит из нее; или сайта поли(А) из гена бета-глобина кролика, который в некоторых вариантах осуществления содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:26 или состоит из нее.

Другие геномные элементы вектора

[0076] Помимо областей контроля транскрипции и сигнала терминации транскрипции в геномы векторов на основе AAV по настоящему изобретению могут быть включены другие последовательности, в том числе цис-регуляторные элементы, для улучшения, контроля или модулирования экспрессии трансгена и/или трансляции в трансдуцированных клетках, или для придания векторам других функций. Такие элементы включают без ограничения нетранслируемые области с 5'- и/или 3'-конца генов, некодирующие экзоны, интроны, донорные и акцепторные сайты сплайсинга, сайты lox, сайты внутренней посадки рибосомы (IRES), последовательности, кодирующие пептиды 2A, элементы, стабилизирующие РНК-транскрипты, сайты связывания для регуляторных miRNA, последовательности микроРНК (miRNA), элементы, усиливающие ядерный экспорт мРНК, включая вирусные посттранскрипционные регуляторные элементы, такие как посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE), а также любой другой элемент, для которого эмпирически продемонстрировано улучшение экспрессии трансгена, даже если механизм может быть неопределенным. В других вариантах осуществления геномы вектора могут включать так называемые спейсерные или филлерные последовательности, которые предназначены только для увеличения общей длины генома вектора до требуемого размера, например, для достижения длины, близкой к упаковочной емкости конкретного капсида, но все еще меньшей, и тем самым снижения вероятности случайной упаковки усеченных геномов вектора или невекторной ДНК в капсиды.

[0077] В некоторых вариантах осуществления интроны могут быть включены в геномы вектора для повышения экспрессии трансгена и/или стабильности транскрипта. В некоторых вариантах осуществления предусмотрен кодирующий белок трансген, в котором последовательность экзонов и интрона(-ов) такая же, как и во встречающемся в природе гене. Однако в гене, содержащем несколько экзонов и интронов, один или несколько интронов можно удалить, чтобы свести к минимуму общую длину и облегчить включение других элементов, не превышая при этом упаковочную емкость капсида. В других вариантах осуществления однако интрон может быть получен из совершенно другого гена, чем ген, обеспечивающий кодирующую последовательность для трансгена вектора. Независимо от того, принадлежит ли интрон тому же гену, что и трансген, или другому, исходную последовательность интрона можно модифицировать, например,

путем изменения определенных нуклеотидов или удаления внутренних последовательностей для уменьшения его общей длины, сохраняя при этом мотивы последовательностей донора и акцептора сплайсинга, необходимые для обеспечения эффективного сплайсинга, или другие интронные цис-элементы, важные для функционирования (например, энхансеры, которые могут находиться в исходной немодифицированной последовательности интрона). Интроны также могут быть гибридными, когда часть интрона в виде донора сплайсинга из одного гена объединяют в пару с частью интрона в виде акцептора сплайсинга из другого гена, или синтетическими, с последовательностью, которая не соответствует ни одному известному интрону гена. В некоторых вариантах осуществления интроны могут располагаться внутри кодирующей последовательности трансгена и, следовательно, прерывать ее (и обеспечиваться донорными и акцепторными сайтами, необходимыми для эффективного сплайсинга), тогда как в других вариантах осуществления интрон присутствует, но не прерывает белок-кодирующую последовательность, а вместо этого располагается либо с 5'-, либо с 3'-конца от кодирующей последовательности. Если интрон не прерывает кодирующую последовательность, он может обеспечиваться некоторой экзонной последовательностью, перенесенной из его исходного генетического контекста, при условии, что экзонная последовательность не содержит скрытого сигнала начала трансляции. В некоторых вариантах осуществления интрон может располагаться с 3'-конца от промотора (с точки зрения плюс-нити ssDNA-генома вектора) и с 5'-конца от кодирующей последовательности. В других вариантах осуществления интрон может располагаться в отдалении от кодирующей последовательности в геноме вектора, как выше, так и ниже.

[0078] Неограничивающие примеры интронов, которые могут использоваться в векторах на основе AAV по настоящему изобретению, включают малый интрон из мелкого вируса мышей (MVM) (*Haut, DD and Pintel, DJ, J Virol, 72(3):1834-43 (1998); Haut, DD and Pintel, DJ, Virology, 258:84-94 (1999)*); интрон 1 с внутренней делецией, полученный из фактора свертывания IX человека (FIXm1 и FIXm2) (*Kurachi, S, et al., J Biol Chem, 270(10):5276-81 (1995)*); химерный интрон из донора сплайсинга бета-глобина и акцептора сплайсинга тяжелой цепи иммуноглобулина (GenBank U47120.2, нуклеотиды 890-1022); интрон 1 из гена альфа-глобина мыши и интрон малого t-антигена SV40, который может содержать пары оснований 4644-4552 записи GenBank J02400.1 или состоять из них и который может быть модифицирован в положениях 4582 (g на c), 4580 (g на c), 4578 (a на c) и 4561 (a на t), как сообщается в *Nathwani, AC, et al., Blood, 107(7):2653-61 (2006)*.

[0079] В некоторых вариантах осуществления посттранскрипционные регуляторные элементы (PRE) могут быть включены в геномы вектора для усиления экспрессии трансгена. Примеры PRE включают посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE), посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита В (HPRE) и их модификации. *Donello, JE, et al., J Virol, 72(6):5085-92 (1998); Loeb, JE, et al., Hum Gene Ther, 10:2295-2305 (1999); Zanta-Boussif, MA, et al., Gene*

Ther, 16:605-19 (2009); *Patricio, MI, et al., Mol Ther Nucleic Acids*, 6:198-208 (2017); публикация заявки на патент США № 2018-0353620 A1. В некоторых вариантах осуществления с точки зрения кодирующей (плюс) нити однонитевого ДНК-генома вектора по меньшей мере одна последовательность WPRE может располагаться ниже трансгена (таким образом, с 3'-конца от стоп-кодона для трансгена, кодирующего полипептид) и выше последовательности сигнала поли(А). В некоторых вариантах осуществления может быть включено несколько PRE, например, 2, 3 или более PRE одного и того же или разных типов, которые могут быть расположены последовательно один за другим. В некоторых вариантах осуществления

[0080] В некоторых вариантах осуществления векторы на основе AAV по настоящему изобретению содержат геномы вектора, содержащие элемент WPRE, который в некоторых вариантах осуществления содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:27 или состоит из нее.

Инвертированные концевые повторы (ITR) AAV

[0081] На концах генома аденоассоциированного вируса расположены уникальные нуклеотидные последовательности, называемые инвертированными концевыми повторами (сокращенно “ITR”), которые функционируют как точки начала репликации вирусной ДНК и как затравочные сайты для поддержки преобразования в инфицированных клетках однонитевого генома (ssDNA) в двухнитевую форму (dsDNA), способную поддерживать транскрипцию генов, кодирующих белки *rep* и *cap*, также содержащихся в геноме вируса. Функцией ITR также является упаковка реплицированных ssDNA-геномов в капсиды AAV. ITR AAV содержат мультипалиндромные последовательности, которые могут складываться сами на себя посредством внутринитевого спаривания комплементарных оснований, образуя вторичные структуры dsDNA в форме Т-образных шпилек.

[0082] Как дополнительно объясняется ниже, геномы векторов в векторах на основе AAV по настоящему изобретению могут включать один или несколько ITR AAV, которые функционируют так же, как и в немодифицированном вирусе. Если не указано иное, применение термина “инвертированный концевой повтор” или “ITR” в данном документе включает интактные полноразмерные ITR, а также ITR с модифицированными последовательностями (такими как усечения, внутренние делеции (например, последовательности *trs* или *D*), добавления и замены одного или нескольких нуклеотидов), которые сохраняют одну или несколько функций, присущих ITR (даже если они менее эффективны по сравнению с интактным ITR того же типа), включая без ограничения спасение генома вектора из рекомбинантной ДНК (например, плазмиды), репликацию генома вектора и/или упаковку генома вектора в собранные капсиды.

[0083] В том виде, в котором они существуют в упакованных вирусных геномах и геномах вектора, ITR, расположенный на 3'-конце ssDNA-генома, будет иметь свободную 3'-гидроксильную группу, тогда как ITR, расположенный на противоположном 5'-конце ssDNA-генома, будет иметь свободный 5'-конец. 5'-ITR также может называться “левым”

I_{TR}, а 3'-I_{TR} также может называться “правым” I_{TR}. Однако в контексте плазмиды, которая, например, может использоваться в продукции векторов, последовательность генома вектора будет существовать в двухнитевой форме, так что будет два набора каждого из 5'-I_{TR} и 3'-I_{TR}. Следовательно, чтобы избежать двусмысленности, следует указывать, на какой нити находится I_{TR}, чтобы различать их. При отсутствии такого указания ссылка на I_{TR} генома вектора в двухнитевой форме, например, в плазмиде, делается по отношению к плюс- или смысловой нити, т. е. нити ДНК, на которой последовательность трансгена совпадает с кодирующей последовательностью для полипептидного продукта трансгена или функциональной РНК, если трансген не кодирует белок.

[0084] В AAV2 дикого типа длина I_{TR} составляет 145 оснований, из которых концевые 125 оснований составляют палиндромные подпоследовательности. После гибридизации I_{TR} AAV2 содержит два двухнитевых палиндрома, В-В' и С-С', образующих плечи шпильки, которые соединены с более крупным двухнитевым палиндромом, А-А', образующим стебель шпильки. I_{TR} дополнительно содержит последовательность D в направлении отличного от терминального конца I_{TR}, которая не имеет комплементарной последовательности внутри I_{TR} и, следовательно, остается одонитевой, но имеет комплементарную последовательность в D-области I_{TR} на противоположном конце генома (соответственно, D и D'). Структура стебля А-А' включает Rep-связывающий элемент (RBE), содержащий мотивы тетрануклеотидных повторов, с которыми связываются крупные белки Rep AAV для целей введения специфичного для последовательности и специфичного для нити одонитевого разрыва в сайт концевое расщепления (trs) в последовательности I_{TR} (между нуклеотидами 124 и 125 в I_{TR} AAV2, считая с 3'-конца), что является шагом, необходимым для репликации ДНК генома вируса.

[0085] При ренатурации I_{TR} могут складываться в две конфигурации, называемые флип и флоп, в которых последовательность между инвертированными повторами А и А' присутствует как обратно-комплементарная последовательность по отношению к другой конфигурации. Что касается 5'-I_{TR} (левый I_{TR}), порядок концевых палиндромных последовательностей для флип-конфигурации представляет собой 5'-ABB'CC'A'D-3', а порядок для флоп-конфигурации представляет собой 5'-ACC'BB'A'D-3'. Что касается 3'-I_{TR} (правый I_{TR}), порядок концевых палиндромных последовательностей для флип-конфигурации представляет собой 3'-A'V'BC'CAD'-5', а порядок для флоп-конфигурации представляет собой 3'-A'C'CB'BAD'-5'. Следовательно, в флип-конфигурации ближе всего к свободному 3'-концу находится палиндром В'В, тогда как в флоп-конфигурации ближе всего к свободному 3'-концу находится палиндром С'С (*Lusby, E, et al., J Virol, 34:402-9 (1980); Srivastava, A, et al., J Virol, 45(2):555-64 (1983); Samulski, RJ, et al., Cell, 33:135-143 (1983)*).

[0086] Предполагается, что вторичная структура I_{TR} обеспечивает поддержку репликации вирусной ДНК посредством механизма элонгации на основе

самопримирующего вытеснения одной нити, инициируемого эндогенной клеточной ДНК-полимеразой в ITR со свободной 3'-гидроксильной группой. Элонгация нити приводит к образованию репликативного промежуточного продукта в виде мономерного dsDNA-генама с одним ковалентно закрытым концом. Дуплексная ITR на открытом конце подвергается рефолдингу (изомеризуется) в двойную шпильчатую структуру, образуя новый 3'-ITR, который подвергается элонгации, в то время как комплементарная нить вытесняется. Крупные белки Rep AAV связываются с ITR на закрытом конце (нижераположенный) и выполняют односторонний разрыв ДНК в ее сайте концевой расщепления, что инициирует второй комплекс репликации ДНК, который копирует нижераположенный ITR до того, как его достигнет комплекс репликации ДНК, инициированный на открытом конце. Исходный комплекс репликации вытесняет противоположную нить (ITR которой была только что синтезирована) и завершает репликацию до того, что было закрытым концом генома, а теперь открытым с дуплексными ITR, доступными для изомеризации в двойную шпильку. Таким образом, воссоздается репликативный промежуточный продукт в виде мономерного dsDNA-генама, чтобы снова начать цикл репликации, в то время как вытесненный ssDNA-геном (3'-ITR которого был только что создан) может быть упакован в вирусную частицу.

[0087] Реплицируемые ssDNA-геномы будут включать нити как положительной (плюс- или смысловая), так и отрицательной (минус- или антисмысловую) полярности, и данные свидетельствуют о том, что они индивидуально упаковываются в капсиды с одинаковой эффективностью. Следовательно, препараты частиц вектора на основе AAV, подобно вирусам, из которых они адаптированы, в некоторых вариантах осуществления могут содержать смысловые или антисмысловые ssDNA-геномы в приблизительно равной пропорции. Однако ITR также можно модифицировать путем выборочного удаления последовательности D из одного из двух ITR, используемых для создания векторов на основе AAV, что ограничивает упаковку до либо отрицательной, либо положительной нити генома вектора (*Wang, X-S, et al., J Virol, 70(3):1668-77 (1996)*). Таким образом, в некоторых других вариантах осуществления препарат векторов на основе AAV может содержать частицы вектора, в которых большинство или практически все геномы вектора являются либо положительными нитями, либо отрицательными нитями.

[0088] После инфицирования вирионы AAV транспортируются в ядро, где ssDNA-геномы высвобождаются из капсида. Предполагается, что прежде чем вирусные гены *rep* и *cap* смогут экспрессироваться, ssDNA-геном вначале должен быть преобразован в dsDNA посредством синтеза комплементарной нити клеточной ДНК-полимеразой, инициирующей элонгацию нити в 3'-ITR, при этом данный процесс, как полагают, является медленным и неэффективным. Также предполагается, что может существовать более быстрый механизм формирования внутриклеточных dsDNA-геномов, в котором комплементарные положительный и отрицательный ssDNA-геномы, происходящие от разных вирионов, инфицирующих одну и ту же клетку, встречаются друг с другом в ядре и гибридизируются посредством межмолекулярного спаривания оснований. Такие

дуплексные геномы могли бы затем поддерживать транскрипцию без необходимости предварительной элонгации клеточной ДНК-полимеразой.

[0089] При разработке векторов на основе AAV единственными последовательностями вирусной ДНК AAV, сохраняемыми в геноме вектора, являются ITR, поскольку они играют решающую роль в репликации и упаковке ДНК во время продуцирования, а также в преобразовании ssDNA-геномов в dsDNA после трансдукции. Последовательности, кодирующие белки Rep и Cap, а также вирусные хелперные функциональные элементы, которые также необходимы для продуцирования векторов, могут обеспечиваться в *транс*-положении различными способами, известными в данной области техники. Когда последовательность генома вектора, например, которая может быть включена в плазмиду, используемую для продукции вектора на основе AAV, включает два интактных ITR и имеет длину, не превышающую упаковочную емкость капсида AAV ~5 т. н., ssDNA-геномы могут быть упакованы, как отмечено выше, но необходимость преобразования в dsDNA может привести к более низкой, чем хотелось бы, эффективности трансдукции из-за неэффективности такой стадии перед тем, как может произойти экспрессия гена. Стратегия преодоления необходимости преобразования в dsDNA эндогенной клеточной ДНК-полимеразой и потенциального повышения эффективности трансдукции и экспрессии гетерологичной последовательности, такой как терапевтический трансген, основана на репликации и упаковке “самокомплементарных” геномов вектора на основе AAV (scAAV), которые, поскольку они содержат последовательности положительных и отрицательных нитей в одной и той же молекуле ДНК, могут быстро ренатурировать с образованием транскрипционной матрицы dsDNA посредством внутримолекулярного спаривания оснований (т. е. внутримолекулярной гибридизации) после сбрасывания капсида в ядре клетки-мишени.

[0090] Продуцирование самокомплементарных геномов может быть облегчено по меньшей мере двумя способами, оба из которых основаны на неспособности Rep обеспечивать одонитевой разрыв ITR в сайте концевого расщепления во время репликации молекулы ДНК, которая должна стать геномом. В естественном цикле репликации AAV молекулы репликативного промежуточного продукта в виде димерного dsDNA-генома могут возникать, когда Rep не может обеспечивать одонитевой разрыв сайта концевого расщепления нижерасположенного ITR репликативного промежуточного продукта в виде мономерного генома, имеющего двойные шпильки на открытом конце и одинарный нижерасположенный ITR на закрытом конце. Когда это происходит, репликация в исходном комплексе репликации ДНК (начинающаяся с 3'-ITR на открытом конце) продолжается через нисходящий (с закрытым концом) ITR, а также через вытесняемую нить с образованием димерного dsDNA-генома. Эта молекула похожа на репликативный промежуточный продукт в виде мономерного dsDNA-генома, описанный выше, но содержит два генома. Поскольку она имеет открытый конец с дуплексными ITR, она может изомеризоваться, чтобы начать цикл репликации ДНК, как и в случае с мономерной формой. В качестве альтернативы шпилька с закрытым концом может

подвергаться концевому расщеплению, образуя дуплексные ITR, которые могут изомеризоваться, так что синтез ДНК инициируется с расщепленного конца. В любом случае репликация димерной матрицы создает новый репликативный промежуточный продукт в виде димерного dsDNA-генома, а также вытесняет ssDNA-геном с димерным инвертированным повтором, содержащий 5'-ITR, последовательность вирусного генома одной полярности, центральный ITR, последовательность вирусного генома противоположной полярности и 3'-ITR.

[0091] В обычной ситуации вирусный ssDNA-геном с димерным инвертированным повтором не упаковывается, поскольку он превышает обычную упаковочную емкость капсида. Однако разрабатывая геномы вектора уменьшенной длины, чтобы ssDNA-геномы с димерным инвертированным повтором при образовании не превышали упаковочную емкость AAV, можно продуцировать векторные частицы, содержащие самокомплементарные геномы. На практике векторные препараты, полученные таким образом, могут содержать смесь частиц, в которых упакован один scDNA-геном или один или два мономерных ssDNA-генома, при этом всех из них которых могут варьироваться в зависимости от препарата.

[0092] После упаковки scDNA-геномы, вероятно, находятся внутри капсидов в одонитевой форме (подобно несамокомплементарным ssDNA-геномам), но затем быстро гибридизируются после сбрасывания капсида с образованием молекулы dsDNA с ковалентно закрытым ITR на одном конце и двумя открытыми ITR на другом конце, что напоминает структуру традиционного вирусного генома после преобразования в dsDNA посредством самопримирования. Таким образом, не желая быть связанными теорией, принципиальное различие между так называемыми ssDNA- и scDNA-геномами заключается не в топологии в состоянии инкапсидации, а скорее в топологии, которую каждый тип генома, вероятно, приобретает после сбрасывания капсида и высвобождения генома внутри трансдуцированных клеток.

[0093] Однако дальнейшая модификация позволяет лучше контролировать продукцию частиц вектора, содержащих scDNA-геномы. В частности, путем осуществления мутации или делеции сайта концевого расщепления одного ITR, например, в плазмиде, содержащей последовательность генома вектора, используемую для продукции вектора, можно подавлять или устранять осуществление одонитевого разрыва в этом ITR во время цикла репликации генома вектора. Вследствие этого комплекс репликации, инициированный в не подвергнутом мутации ITR, продвигается через подвергнутую мутации шпильку и возвращается к инициирующему концу, в результате чего образуется репликативный промежуточный продукт в виде димерного dsDNA-генома, как и в случае, если концевое расщепление ITR дикого типа не происходит случайным образом. Однако этот промежуточный продукт будет содержать закрытый ITR дикого типа на одном конце, подвергнутый мутации дуплексный ITR в середине молекулы и дуплексные открытые ITR на противоположном конце, которые способны к изомеризации. Затем эта молекула может проходить обычные циклы репликации и

вытеснения нити от ITR дикого типа на каждом конце с образованием вытесненных дочерних копий генома, содержащих 5'-ITR дикого типа, последовательность генома вектора одной полярности, подвергнутый мутации ITR в середине, последовательность генома вектора противоположной полярности и ITR дикого типа на 3'-конце. Если гетерологичная последовательность содержит белок-кодирующий трансген, scDNA-геном будет содержать как кодирующую последовательность, так и комплементарную ей последовательность в одной и той же молекуле ДНК. Хотя полагают, что такие геномы упакованы внутри капсидов в однонитевой форме, также полагают, что они способны к быстрой самогибридизации в двухнитевую форму внутри ядер трансдуцированных клеток из-за присутствия значительного количества самокомплементарной последовательности за пределами ITR, при этом в такой форме они могут поддерживать транскрипцию гетерологичной последовательности. Продукция scAAV с конструкций, содержащих подвергнутые мутации ITR, может дать более 90% scDNA-геномов.

[0094] В капсидах AAV2, которые характеризуются упаковочной емкостью, составляющей приблизительно 4,7 т. н., без учета последовательностей ITR, ssDNA-геномы могут вместить приблизительно гетерологичную последовательность длиной 4,4 т. н., тогда как scDNA-геномы векторов могут вместить приблизительно 2,2 т. н. Согласно конкретному неограничивающему варианту осуществления размер геномной конструкции (например, которая могла бы содержаться в плазмиде для продукции вектора на основе AAV) для продуцирования векторов на основе scAAV составляет приблизительно ~2500 нуклеотидов в длину, включая гетерологичную последовательность длиной ~2200 нуклеотидов плюс два ITR (один дикого типа и один подвергнутый мутации). Это приведет к продуцированию генома scAAV длиной ~4700 нуклеотидов, что ниже типичной упаковочной емкости капсида AAV.

[0095] Сайты концевого расщепления ITR можно разрушить различными способами, чтобы облегчить продукцию векторов на основе scAAV. Например, экзогенную последовательность можно вставить последовательность сайта концевого расщепления (*trs*) саму по себе или в смежную последовательность для ITR, например, между элементом связывания *Rep* и *trs*. В качестве альтернативы последовательность *trs* может быть удалена частично или полностью. В других вариантах осуществления смежная D-область может быть удалена частично или полностью. В других вариантах осуществления нуклеотиды внутри *trs* можно заменить другими нуклеотидами, которые снижают частоту однонитевых разрывов *trs* под действием *Rep*. Другие способы сделать ITR нерасщепляемыми находятся в пределах компетенции специалистов средней квалификации в данной области техники.

[0096] Более подробную информацию о репликации генома вируса и вектора на основе AAV, а также о конструкции scAAV можно найти в *McCarty, DM, et al., Gene Therapy, 10:2112-18 (2003)*; *McCarty, DM, et al., Gene Therapy, 8:1248-54 (2001)*; *McCarty, DM, Molecular Therapy, 16(10):1648-56 (2008)*; *патенте США № 7790154*.

[0097] В некоторых вариантах осуществления геномы векторов на основе AAV в

векторах на основе AAV по настоящему изобретению могут содержать один или несколько ITR AAV, происходящих из разных серотипов и вариантов AAV, имеющих разные последовательности разной длины и располагающихся в разных местах генома. Последовательность ITR AAV для применения в векторах по настоящему изобретению может быть последовательностью дикого типа или модифицированной. В других вариантах осуществления последовательности ITR AAV можно также включить как часть последовательностей генома вектора в плазмиды и другие типы векторов, например бакуловирусы, используемые для введения последовательности генома вектора в клетки-хозяева для целей продукции векторов.

[0098] ITR из AAV2 зачастую используют для продуцирования векторов на основе AAV, но альтернативные варианты осуществления могут включать применение ITR из любого серотипа или варианта AAV, включая, например, ITR из AAV1, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 или AAV9 или любого другого серотипа или варианта AAV, известного или еще не открытого, при условии, что такие ITR являются функциональными для репликации и упаковки генома вектора и экспрессии трансгена. ITR также могут включать модификации в последовательности относительно последовательности ITR дикого типа или могут быть полностью синтетическими. Модифицированный ITR может быть на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичным последовательности ITR дикого типа, такой как последовательность из AAV2. В некоторых вариантах осуществления ITR модифицируют путем добавления, делеции и/или изменения нуклеотидов для разрушения сайта концевой расщепления (trs) и/или D-последовательности ITR или для изменения какой-либо другой подпоследовательности ITR. В некоторых вариантах осуществления геном вектора может содержать ITR из различных серотипов или вариантов AAV.

[0099] В некоторых вариантах осуществления ITR, выбранные для применения в продукции векторов, будут из того же серотипа или варианта, что и капсид. Например, в сочетании с капсидами AAV2 можно использовать ITR AAV2. Однако в других вариантах осуществления векторы могут быть псевдотипированными или гибридными, что означает, что геном вектора с ITR из одного серотипа или варианта может быть упакован в капсид из другого серотипа или варианта. Например, геном вектора с ITR из AAV2 может быть упакован в капсид из AAV8 (или капсид любого другого серотипа или варианта). Этот псевдотип часто сокращенно обозначается как AAV2/8, где число перед косой чертой указывает на происхождение ITR, а число после косой черты указывает на происхождение капсида.

[0100] Согласно некоторым вариантам осуществления векторы на основе AAV по настоящему изобретению могут содержать геномы вектора с различным числом ITR. Например, интактные вирусные геномы AAV обычно имеют два ITR, каждый из которых расположен на 5'- и 3'-концах соответственно, и векторы на основе AAV, продуцируемые с использованием интактных ITR и упакованные с ssDNA-геномами, также могут иметь два ITR, расположенных аналогичным образом. Однако, как обсуждалось выше, векторы

могут быть разработаны таким образом, что их геномы будут включать три ITR: два на концах генома, как в вирусах или традиционных векторах, и один дополнительный в середине или около нее (интактный или подвергнутый мутации), как в самокомплементарных векторах. Однако также было отмечено, что в некоторых векторах, в частности, если длина генома превышает среднюю упаковочную емкость капсида, 5'-ITR могут усекаются или полностью отсутствовать, как предполагается, из-за преждевременного или переменного завершения упаковки. Хотя могут возникать дефектные интерферирующие частицы, также предполагается, что такие частицы, тем не менее, смогут поддерживать экспрессию трансгена в результате комплементации в остальном неполных геномов (*Kapranov, P, et al., Hum Gene Ther, 23:46-55 (2012)*). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления частицы вектора на основе AAV по настоящему изобретению могут содержать геномы, содержащие один функциональный ITR, например, на 3'-конце или 5'-конце, тогда как на противоположном конце находится нефункциональный усеченный ITR или последовательность ITR отсутствует. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления геномов вектора на основе AAV в векторах на основе AAV по настоящему изобретению ITR AAV может располагаться на 5'-конце генома, или на 3'-конце генома, или как на 5'-, так и на 3'-конце генома, а также в других положениях.

[00101] Другой источник гетерогенности, которая может наблюдаться в векторах на основе AAV, может проистекать из дифференциального присутствия флип-флоп-конфигураций ITR в каждом конкретном геноме. Так, например, в некоторых вариантах осуществления любая конкретная частица вектора в образце может содержать геном с ITR на обоих концах генома в флип-конфигурации, или с ITR на обоих концах генома в флоп-конфигурации, или с флип-ITR на 5'-конце и флоп-ITR на 3'-конце, или с флоп-ITR на 5'-конце и флип-ITR на 3'-конце. В сочетании с тем, что однонитевые ДНК-геномы могут наблюдаться как с положительной, так и с отрицательной нитью, образец векторов на основе AAV может содержать восемь возможных конфигураций в подобных или потенциально различных пропорциях. Если не указано иное, геномы векторов на основе AAV по настоящему изобретению не ограничиваются ни одной из этих конфигураций; все из них могут быть упакованы такими векторами.

[00102] В некоторых вариантах осуществления геном вектора на основе AAV включает интактный полноразмерный ITR на каждом из его 5'- и 3'-концов. Так, например, если оба ITR происходят из AAV2, то длина таких полноразмерных ITR составит 145 нуклеотидов. Однако в других вариантах осуществления один или несколько ITR могут быть усеченными, в них может отсутствовать один или несколько концевых нуклеотидов относительно канонической полноразмерной последовательности для данного типа ITR. Так, например, в ITR может отсутствовать по меньшей мере или приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 нуклеотидов или больше с его терминального конца относительно канонической полноразмерной последовательности для этого типа ITR. Такие усеченные ITR могут встречаться в

геномах, упакованных векторами на основе AAV по настоящему изобретению, а также в последовательностях генома вектора, используемых при продукции векторов на основе AAV, например, в плазмиде. Например, было отмечено, что усеченные ITR могут по-прежнему функционировать с продуцированием AAV из-за способности к саморепарации, если последовательности, отсутствующие в одном ITR, сохраняются в другом (Wang, X-S, et al., J Mol Biol, 250:573-80 (1995); Samulski, RJ, et al., Cell, 33:135-43 (1983)).

[00103] В некоторых вариантах осуществления геномы векторов на основе AAV в векторах на основе AAV по настоящему изобретению могут содержать один или несколько ITR AAV, содержащих нуклеотидную последовательность под любым одним или несколькими из SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18 или SEQ ID NO:19, или комплементарную или обратнo-комплементарную последовательность любой из таких последовательностей, состоящих по сути или состоящих из них.

Оптимизация последовательности

[00104] В некоторых вариантах осуществления одну или несколько последовательностей внутри генома вектора на основе AAV можно оптимизировать для улучшения ее функциональных характеристик по сравнению с исходной эталонной последовательностью. Например, и без ограничения, любую белок-кодирующую последовательность в геноме вектора можно подвергнуть кодон-оптимизации относительно последовательности дикого типа на основе вырожденности генетического кода и предпочтения кодонов, которое, как известно, существует у различных видов и у белков, экспрессируемых на высоком или низком уровне у одного и того же вида. Такие предпочтения кодонов можно идентифицировать, например, с использованием индекса адаптации кодонов для конкретного вида. Индекс адаптации кодонов (CAI) более подробно объясняется в *Sharp, PM and Li, WH, Nucleic Acids Res, 15:1281-95 (1987)*. В некоторых вариантах осуществления кодирующие последовательности являются кодон-оптимизированными для человека, это означает, что кодирующие последовательности оптимизированы на основе предпочтения человеческих кодонов. Оптимизацию кодонов можно обеспечивать с использованием различных алгоритмов, известных в данной области техники. Как известно в данной области техники, можно сконструировать различные CAI, на основе которых анализируют высокоэкспрессируемые гены, например, гены человека. Иллюстративный CAI для человека описан в *Haas, J, et al., Current Biology, 6(3):315-24 (1996)*. Если требуется, белок-кодирующие последовательности также можно подвергнуть кодон-оптимизации для других видов, помимо человека.

[00105] С целью повышения уровней экспрессии белка были предложены и реализованы различные стратегии кодон-оптимизации. Например, наиболее часто используемый синонимичный кодон (т. е. кодон, кодирующий одну и ту же аминокислоту) можно заменить в каждом положении, где он не встречается. В качестве альтернативы использование кодонов можно регулировать по полной кодирующей последовательности таким образом, чтобы оно было пропорционально естественному распределению предпочтения кодонов организма-хозяина. В некоторых вариантах

осуществления замена кодонов ограничивается кодонами, которые встречаются относительно редко в высокоэкспрессируемых белках у такого вида, например, с частотой 10% или менее, как отражено в САІ.

[00106] В некоторых вариантах осуществления белок-кодирующую последовательность, подлежащую экспрессии с помощью вектора на основе AAV по настоящему изобретению, подвергают кодон-оптимизации путем замены по меньшей мере одного редкого кодона более распространенным синонимичным кодоном. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%, и в некоторых вариантах осуществления 100% редких кодонов в белок-кодирующей последовательности заменяют более часто используемым синонимичным кодоном, как отражено в САІ, например, в САІ для человека. В некоторых вариантах осуществления редкий кодон представляет собой кодон, который встречается с частотой менее или равной 10%, 9%, 8%, 7%, 6% или 5%, как отражено в САІ, например, в САІ для человека.

[00107] В некоторых вариантах осуществления белок-кодирующую последовательность, подлежащую экспрессии с помощью вектора на основе AAV по настоящему изобретению, подвергают кодон-оптимизации путем замены одного или нескольких кодонов на более часто используемый синонимичный кодон, как отражено в САІ, например, в САІ для человека, так что значение САІ, рассчитанное для всей кодирующей последовательности, увеличивается относительно исходной, не являющейся кодон-оптимизированной, последовательности, которая в некоторых вариантах осуществления представляет собой кодирующую последовательность белка дикого типа. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления значение САІ исходной эталонной последовательности вычисляют со ссылкой на конкретную эталонную таблицу САІ, и один или несколько кодонов заменяют более частыми синонимичными кодонами, так что общее значение САІ в существующей кодон-оптимизированной кодирующей последовательности увеличивается на по меньшей мере или приблизительно 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,10, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,20, 0,21, 0,22, 0,23, 0,24, 0,25, 0,26, 0,27, 0,28, 0,29, 0,30, 0,31, 0,32, 0,33, 0,34, 0,35, 0,36, 0,37, 0,38, 0,39, 0,40, 0,41, 0,42, 0,43, 0,44, 0,45, 0,46, 0,47, 0,48, 0,49, 0,50, 0,55, 0,60 или 0,70.

[00108] Как известно в данной области техники, присутствие гипометилированных динуклеотидов CpG в нуклеиновой кислоте может стимулировать иммунные ответы, которые устраняют трансдуцированные клетки. Следовательно, истощение количества динуклеотидов CpG в геномах вектора может увеличить вероятность того, что векторная трансдукция приведет к долговременной экспрессии генов. *Wright, JF, Mol Ther, 28(3):701-3 (2020)*. Ввиду потенциально вредоносных эффектов динуклеотидов CpG в некоторых вариантах осуществления любая последовательность внутри генома, включая, например, энхансеры, промоторы, интроны, открытые рамки считывания, которые кодируют белок или функциональную РНК, терминаторы транскрипции,

последовательности 5'- и/или 3'-нетранслируемой области (UTR), ITR или любую другую последовательность, может быть модифицирована с удалением одного или нескольких динуклеотидов CpG, при условии, что это не будет неприемлемым образом мешать или нарушать какую-либо требуемую функцию модифицированного элемента. Поскольку функция определенных элементов внутри геномов вектора, таких как ITR, промоторы и энхансеры, может сильно зависеть от своеобразия конкретных нуклеотидов в определенных положениях, возможности для значительного истощения количества динуклеотидов CpG в таких элементах могут быть более ограниченными. Поскольку геномы вектора на основе AAV обеих полярностей (например, смысловой и антисмысловой по отношению к кодирующей последовательности трансгена внутри генома) упакованы в капсиды в приблизительно равных пропорциях, в некоторых вариантах осуществления стратегия истощения количества CpG может быть направлена на уменьшение или устранение мотивов CpG из нуклеотидной последовательности геномов вектора обеих полярностей, а не только геномов вектора, которые содержат белок-кодирующую последовательность в смысловой ориентации.

[00109] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% динуклеотидов CpG в кодирующей последовательности или общей последовательности генома вектора (по отношению к смысловой и/или антисмысловой нити) удалены или заменены относительно эталонной исходной последовательности. В других вариантах осуществления по меньшей мере 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или более динуклеотидов CpG или в диапазоне между любыми из вышеуказанных значений удалены или заменены относительно исходной эталонной последовательности. В других вариантах осуществления 1-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45, 45-50, 50-55, 55-60, 60-65, 65-70, 70-75, 75-80, 80-85, 85-90, 90-95 или 95-100 динуклеотидов CpG удалены или заменены относительно эталонной исходной последовательности.

[00110] В других вариантах осуществления оптимизация последовательности способна приводить к увеличению или уменьшению общего содержания GC относительно исходной эталонной последовательности. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления общая процентная доля нуклеотидов G или C в трансгене или геноме в целом может быть увеличена относительно исходной эталонной последовательности, например, последовательности, кодирующей белок дикого типа, на по меньшей мере или приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35 или 40 процентов или больше. В других вариантах осуществления общая процентная доля нуклеотидов G или C в трансгене или геноме в целом может быть уменьшена относительно исходной эталонной последовательности, например, последовательности, кодирующей белок дикого типа, на по меньшей мере или приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35 или 40 процентов или больше.

[00111] Как будет понятно специалистам средней квалификации, при оптимизации

кодирующей последовательности цель замены на более распространенные кодоны любой конкретной аминокислоты у вида (например, человека) может быть несовместима с другими стратегиями оптимизации, поскольку введение чаще используемых кодонов может привести к появлению мотивов CpG, а устранение CpG может потребовать применения редко встречающихся кодонов, или оптимизация кодонов может привести к увеличению или уменьшению содержания GC нежелательным образом. В этих случаях может быть необходимой разработка и тестирование различных оптимизированных кодирующих последовательностей (кодирующих один и тот же полипептид) для идентификации версий, обеспечивающих приемлемый баланс между различными стратегиями оптимизации для достижения улучшенной экспрессии белка.

[00112] Последовательность генома трансгена и вектора можно оптимизировать путем изменения признаков в дополнение к предпочтению кодонов и содержанию CpG. Например, любой из следующих признаков, которые иногда встречаются в последовательностях и отрицательно влияют на экспрессию трансгена, можно идентифицировать (либо концептуально, например, с использованием алгоритмов, либо эмпирически) и изменить или устранить таким образом, чтобы уменьшить их эффект: скрытые сайты сплайсинга; последовательности преждевременного сигнала терминации транскрипции (например, последовательности полиА); сайты начала трансляции (например, IRES), отличные от предполагаемого инициатора метионина; области последовательности с высоким содержанием GC; последовательности 5'-конца мРНК, которые могут образовывать шпильки; и богатые AU элементы (ARE) в 3'-нетранслируемых областях мРНК, которые могут связываться при дестабилизации РНК-связывающих белков. Другие признаки последовательностей, которые могут появляться в трансгенах и геномах вектора и которые при изменении могут усиливать экспрессию трансгена, будут знакомы специалистам средней квалификации в данной области техники.

[00113] В других вариантах осуществления последовательность трансгена или вектора можно модифицировать для усиления функциональности. Например, первый предполагаемый стартовый кодон в белок-кодирующих последовательностях может лишь слабо поддерживать инициацию трансляции с такого сайта, и в этом случае окружающую последовательность можно изменить, чтобы она соответствовала так называемой консенсусной последовательности Козак для инициации трансляции у эукариот. *Kozak, M., Gene, 234(2):187-208 (1999).*

[00114] В некоторых вариантах осуществления истощение количества CpG (частичное или полное) или другие типы оптимизации последовательности для трансген-кодирующей последовательности, например, оптимизация кодонов, могут улучшить экспрессию белка с трансгена по сравнению с тем же вектором, включающим неоптимизированную эталонную исходную последовательность, например, кодирующую последовательность дикого типа, из которой получена оптимизированная последовательность. Так, например, эффективность экспрессии оптимизированной кодирующей последовательности трансгена может составлять по меньшей мере 25%, 50%,

75%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500% или больше по сравнению с неоптимизированной эталонной исходной последовательностью, такой как версия кодирующей последовательности дикого типа.

Капсиды AAV

[00115] В векторах на основе AAV по настоящему изобретению можно использовать капсиды, полученные из любого капсидного белка AAV, как встречающегося в природе, так и модифицированного, включая известные в настоящее время или еще не открытые или не разработанные, которые подходят для трансдукции клеток у субъекта для экспрессии белка GCазы с трансгена вектора.

[00116] Выбор капсидного белка для применения в создании вектора на основе AAV (и соответствующей последовательности гена *cap* для его продуцирования) может определяться многими соображениями и факторами. Как отмечалось выше, в силу специфического взаимодействия с определенными рецепторами клеточной поверхности различные капсиды AAV могут иметь разный клеточный или тканевой тропизм, что может быть преимуществом, когда требуется предпочтительно трансдуцировать определенные ткани по сравнению с другими. Например, чтобы экспрессировать трансгенный продукт преимущественно в мышцах, можно продуцировать вектор с использованием капсида с тропизмом к мышцам, а не к печени. И наоборот, чтобы экспрессировать трансгенный продукт в печени, можно продуцировать вектор с использованием капсида с тропизмом к печени по сравнению с мышцами или другими тканями.

[00117] Также могут иметь значение другие факторы. Исследования установили, например, что у некоторых людей имеются высокие титры нейтрализующих антител к определенным капсидам в результате воздействия встречающихся в природе AAV, что может мешать способности векторов на основе AAV с такими же или похожими капсидами трансдуцировать клетки-мишени. Таким образом, при разработке вектора для генной терапии выбор капсида в некоторых случаях может определяться иммуногенностью капсида и/или серопревалентностью у пациентов, подлежащих лечению. Другие факторы, которые могут повлиять на выбор капсида, включают технологичность и стабильность при хранении, а также другие факторы, известные в данной области техники.

[00118] В векторах на основе AAV по настоящему изобретению могут использоваться капсиды, полученные из капсидных белков встречающихся в природе AAV, а также модифицированных или сконструированных капсидных белков. Например, встречающиеся в природе капсидные белки можно модифицировать путем вставки или удаления аминокислот или пептидов, или путем введения аминокислотных замен в последовательности белков VP1, VP2 и/или VP3, предполагая каким-либо образом улучшить функцию капсида, например, улучшить тканевой тропизм, иммуногенность, стабильность или технологичность. Другие примеры включают новые капсиды с улучшенными свойствами, созданные путем обмена аминокислот или доменов из одного

известного капсида на другой (мозаичные или химерные капсиды) или с использованием перетасовки ДНК и способов направленной эволюции.

[00119] В некоторых вариантах осуществления векторы на основе AAV по настоящему изобретению могут содержать капсид из известных серотипов и вариантов AAV, а также не встречающиеся в природе капсиды, включая без ограничения AAV1, AAV2, AAV3A, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh10, AAVrh74, AAV-DJ, AAV-PHP.B, Anc80, AAV2.5 и AAV2i8, а также многие другие возможные. В некоторых вариантах осуществления капсиды векторов на основе AAV по настоящему изобретению включают капсидный белок VP1, VP2 и/или VP3 AAV, который является вариантом или производным известного капсидного белка VP1, VP2 или VP3 AAV. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность такого вариантного или производного капсидного белка AAV может быть на по меньшей мере или приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% идентична аминокислотной последовательности любой известной последовательности белка VP1, VP2 или VP3 капсида AAV, включая без ограничения белки VP1, VP2 или VP3 капсида AAV из AAV1, AAV2, AAV3A, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh10, AAVrh74, AAV-DJ, AAV-PHP.B, Anc80, AAV2.5 и AAV2i8, или любого другого подходящего капсида AAV, включая, например, гепатотропные капсиды, обсуждаемые ниже. В некоторых других вариантах осуществления аминокислотная последовательность такого вариантного или производного капсидного белка AAV отличается (будь то из-за делеции, вставки или замены аминокислот) на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или более аминокислот от аминокислотной последовательности известного белка капсида AAV VP1, VP2 или VP3, включая без ограничения белки VP1, VP2 или VP3 капсида AAV из AAV1, AAV2, AAV3A, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh10, AAVrh74, AAV-DJ, AAV-PHP.B, Anc80, AAV2.5 и AAV2i8, или любого другого подходящего капсида AAV, включая, например, гепатотропные капсиды, обсуждаемые ниже.

Гепатотропные капсиды AAV

[00120] В некоторых вариантах осуществления векторы на основе AAV по настоящему изобретению содержат гепатотропный капсид. Гепатотропный капсид представляет собой капсид AAV с тропизмом к клеткам печени, таким как гепатоциты. Согласно некоторым вариантам осуществления капсид для применения в векторах на основе AAV по настоящему изобретению является гепатотропным для клеток печени человека, таких как гепатоциты человека. Как будет понятно специалистам средней квалификации, гепатотропизм не означает, что капсид способен трансдуцировать только клетки печени. Скорее, гепатотропный капсид будет проявлять некоторую большую склонность к трансдукции клеток печени по сравнению с другими типами клеток или

тканей, даже если эта склонность не является абсолютной, и даже если гепатотропный капсид проявляет еще большую склонность к трансдукции какого-либо другого типа клеток или тканей, чем клеток печени. В некоторых неограничивающих вариантах осуществления гепатотропный капсид AAV связывается с гепарансульфатпротеогликаном (HSPG), который рассматривается как клеточный рецептор, опосредующий инфицирование AAV гепатоцитов человека.

[00121] Примеры гепатотропных капсидов включают без ограничения: AAV2; AAV3B; AAV5; AAV6; AAV7; AAV8; AAV9; AAV13; AAV-DJ (*Grimm, D, et al., J Virol, 82:5887-5911 (2008)*); AAV-LK03 (*Lisowski, L, et al., Nature 506:382-6 (2014)*); AAV-KP1; AAV-hu.Lvr01 (номер доступа в Genbank QPP19816); AAV-hu.Lvr02 (номер доступа в Genbank QPP19818); AAV-hu.Lvr03 (номер доступа в Genbank QPP19819); AAV-hu.Lvr04 (номер доступа в Genbank QPP19821); AAV-hu.Lvr05 (номер доступа в Genbank QPP19824); AAV-hu.Lvr06 (номер доступа в Genbank QPP19825); AAV-hu.Lvr07 (номер доступа в Genbank QPP19828); AAV-rh.10; AAV-rh.74; AAV-Anc80 (*Zinn, E, et al., Cell Rep, 12:1056-68 (2015)*); AAV-NP40, AAV-NP59 и AAV-NP84 (*Paulk, NK, et al., Molecular Therapy, 26(1):289-303 (2018)*); AAV-hu.37; AAV-rh.8; AAV-rh.64R1; капсиды, содержащие белок VP1, содержащий SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO:10 из WO 2015/013313 (называемые RHM4-1, RHM15-1, RHM15-2, RHM15-3/RHM15-5, RHM15-4 и RHM15-6 соответственно) или состоящий из них; AAVHSC7, AAVHSC15 и AAVHSC17 (*Smith, LJ, et al., Mol Ther, 22(9):1625-34 (2014)*); *Ellsworth, JL, et al., PLOS One, 14(11): e0225582 (2019)*).

Векторы на основе AAV для экспрессии белка GСазы

[00122] Согласно определенным вариантам осуществления векторы на основе AAV по настоящему изобретению содержат геном вектора на основе AAV, содержащий трансген, кодирующий белок бета-глюкоцереброзидазы (GСазы), такой как изоформа 1 белка GСазы человека. В некоторых вариантах осуществления трансген содержит кодирующую последовательность для последовательности сигнального пептида секреции, а также кодирующую последовательность для зрелой формы белка GСазы. В некоторых вариантах осуществления последовательность сигнального пептида секреции является такой же, что и существующая во встречающемся в природе белке GСазы, но также могут использоваться сигнальные пептиды из гетерологичных белков, например, сигнальный пептид из полипептида тяжелой цепи IgG, такого как полипептид тяжелой цепи мышинового IgG. В некоторых вариантах осуществления зрелый полипептид GСазы человека содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:40, аминокислотная последовательность сигнального пептида секреции GСазы человека дикого типа содержит SEQ ID NO:39, и аминокислотная последовательность сигнального пептида секреции из полипептида тяжелой цепи мышинового IgG содержит SEQ ID NO:38. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность химерного белка-предшественника GСазы, включающая полипептид тяжелой цепи мышинового IgG и зрелый полипептид GСазы человека, содержит SEQ ID NO:16.

[00123] В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность трансгена, кодирующая белок GСазы, представляет собой ту же нуклеотидную последовательность, что и последовательность, кодирующая GСазу человека дикого типа, неограничивающие примеры которой включают SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31 или SEQ ID NO:32. Однако в других вариантах осуществления кодирующая последовательность может быть оптимизирована, например, путем делеции некоторых или всех динуклеотидов CpG, при этом она все еще кодирует тот же белок GСазы, неограничивающим примером которого является SEQ ID NO:13, которая кодирует зрелый полипептид, или SEQ ID NO:41, которая кодирует химерный белок GСазы, содержащий последовательность сигнального пептида секреции Н-цепи мышинового IgG и зрелый полипептид человека. В некоторых вариантах осуществления из кодирующей последовательности трансгена белка GСазы удалены по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110 или более динуклеотидов CpG или любое значение в диапазоне между любыми из вышеуказанных специально перечисленных значений и включительно с ними. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая белок GСазы, лишена динуклеотидов CpG. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая белок GСазы, содержит 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 динуклеотидов CpG или любое значение в диапазоне между любыми из вышеуказанных специально перечисленных значений и включительно с ними, где нуклеотидная последовательность, из которой динуклеотиды CpG удалены относительно эталонной последовательности, например, последовательности дикого типа, является либо смысловой нитью, содержащей кодирующую последовательность, либо антисмысловой нитью, т. е. обратнo-комплементарной последовательностью смысловой нити.

[00124] В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность трансгена, кодирующего зрелый полипептид GСазы человека, является такой же, как представленная под SEQ NO:13, тогда как в родственных вариантах осуществления трансген может быть на по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% идентичен нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:13, при этом кодируя идентичную аминокислотную последовательность, как та, которая кодируется SEQ ID NO:13. В других вариантах осуществления нуклеотидная последовательность трансгена, кодирующего химерный белок-предшественник GСазы, является такой же, как представленная под SEQ NO:41, тогда как в родственных вариантах осуществления трансген может быть на по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% идентичен нуклеотидной

последовательности под SEQ ID NO:41, при этом кодируя идентичную аминокислотную последовательность, как та, которая кодируется SEQ ID NO:41. В других вариантах осуществления нуклеотидная последовательность трансгена, кодирующего зрелый полипептид GCазы человека, является такой же, как представленная под SEQ NO:28, SEQ NO:29 или SEQ NO:30, тогда как в родственных вариантах осуществления трансген может быть на по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% идентичен нуклеотидной последовательности под SEQ NO:28, SEQ NO:29 или SEQ NO:30 соответственно, при этом кодируя идентичные аминокислотные последовательности, как те, которые кодируются SEQ NO:28, SEQ NO:29 или SEQ NO:30 соответственно.

[00125] В некоторых вариантах осуществления геномы вектора из векторов на основе AAV по настоящему изобретению дополнительно содержат по меньшей мере один инвертированный концевой повтор (ITR) AAV, расположенный на 5'- и/или 3'-конце генома. В некоторых вариантах осуществления геномы вектора могут дополнительно содержать по меньшей мере второй ITR AAV, расположенный на противоположном конце генома от первого ITR AAV. В некоторых вариантах осуществления геномы вектора содержат ITR AAV, расположенный на их 5'-конце. В некоторых вариантах осуществления геномы вектора содержат ITR AAV, расположенный на их 3'-конце. В некоторых вариантах осуществления геномы вектора содержат первый ITR AAV, расположенный на их 5'-конце, и второй ITR AAV, расположенный на их 3'-конце. В некоторых вариантах осуществления геномы вектора содержат первый ITR AAV, расположенный на их 5'-конце, второй ITR AAV, расположенный на их 3'-конце, и третий ITR AAV, расположенный между указанными первым и вторым ITR AAV.

[00126] ITR AAV для применения в векторах по настоящему изобретению могут быть любого типа, например, ITR AAV2 или ITR, не относящимся к AAV2, и могут быть полной длины или усеченными, а также могут иметь ту же последовательность, что и любой известный вирусный ITR AAV, существующий в природе (последовательность дикого типа), или могут быть модифицированы. Иллюстративные неограничивающие типы модификаций включают уменьшение числа динуклеотидов CpG, встречающихся в последовательности ITR, уменьшение или устранение способности последовательности ITR подвергаться концевому расщеплению белками Rep AAV, например, путем осуществления мутации, делеции или иной инактивации сайта концевой расщепления (trs), а также уменьшение или устранение способности ITR поддерживать упаковку в капсид, например, путем осуществления мутации, делеции или иной инактивации D-последовательности в последовательности ITR. В некоторых вариантах осуществления геном вектора может дополнительно содержать по меньшей мере третий ITR AAV, например, расположенный между концами генома, например, поблизости от центра или в центре последовательности генома вектора. В некоторых из этих вариантов осуществления третий ITR может быть модифицированным, например, за счет

инактивации его сайта конечного расщепления, так что геном вектора, включая трансген, является самокомплементарным. В некоторых вариантах осуществления геномы вектора содержат ITR AAV, содержащий нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18 или SEQ ID NO:19 или комплементарную или обратнo-комплементарную последовательность каждой из таких последовательностей, состоящий по сути или состоящий из них.

[00127] В некоторых вариантах осуществления геномы вектора из векторов на основе AAV по настоящему изобретению дополнительно содержат область контроля транскрипции, функционально связанную с трансгеном, кодирующим белок GCазы. В некоторых вариантах осуществления область контроля транскрипции может быть индуцируемой, конститутивно активной или специфичной для типа клеток или тканей, например, активной в основном или исключительно в гепатоцитах или печени (таким образом, специфичной для гепатоцитов или специфичной для ткани печени). В некоторых вариантах осуществления область контроля транскрипции содержит промотор или состоит из него, и может дополнительно содержать по меньшей мере одну энхансерную область или элемент. Любая область или элемент в области контроля транскрипции могут быть получены из человеческого гена или гена, не являющегося человеческим, например, гена крысы, мыши, крупного рогатого скота, отличных от человека приматов, курицы или вирусного гена, или другого вида или типа организма. Области или элементы области контроля транскрипции могут быть смежными друг с другом или быть разделенными другими функциональными последовательностями генома вектора. Так, например, промоторная область может располагаться вблизи и с 5'-конца (выше) от трансгена, тогда как энхансерная область или элемент могут располагаться в любом другом месте генома вектора, например, в отдалении выше или в другом месте, например, в отдалении с 3'-конца (ниже) от трансгена. Любая область или элемент области контроля транскрипции могут быть специфичными для типа клеток или ткани, например, специфичными для ткани печени. Таким образом, промотор может быть специфичным для клеток или тканей печени, энхансерная область или элемент могут быть специфичными для клеток или тканей печени, или как промотор, так и энхансер(-ы), действующие по отдельности или совместно, могут быть специфичными для клеток или тканей печени.

[00128] В некоторых вариантах осуществления область контроля транскрипции для применения в векторах по настоящему изобретению может содержать последовательность промотора, полученную из гена альбумина (ALB) человека, где такой промотор представляет собой полный промотор гена ALB человека или функциональную подпоследовательность такого промотора гена ALB человека. Так, например, промотор может содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:10 или функциональную подпоследовательности промотора, ее модификацию или вариант, может состоять по сути или состоять из них.

[00129] В некоторых вариантах осуществления область контроля транскрипции для применения в векторах по настоящему изобретению может содержать последовательность

энхансера, полученную из гена альбумина (ALB) человека, где такая последовательность энхансера представляет собой полную энхансерную область гена ALB человека или функциональную подпоследовательность энхансера такой энхансерной области гена ALB человека. Так, например, последовательность энхансера может содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:9 или функциональную подпоследовательность энхансера, ее модификацию или вариант, может состоять по сути или состоять из них. В некоторых вариантах осуществления область контроля транскрипции для применения в векторах по настоящему изобретению может содержать последовательность энхансера, полученную из гена предшественника альфа-1-микроглобулина/бикунина (AMBВ), где такая последовательность энхансера представляет собой полную энхансерную область гена AMBВ или функциональную подпоследовательность энхансера такой энхансерной области гена AMBВ. Так, например, последовательность энхансера может содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:8 или функциональную подпоследовательность энхансера, ее модификацию или вариант, состоять по сути или состоять из них.

[00130] В некоторых вариантах осуществления геномы вектора из векторов на основе AAV по настоящему изобретению дополнительно содержат последовательность сигнала терминации транскрипции, например, последовательность сигнала полиаденилирования (поли(A)), например, последовательность сигнала рА, полученную из гена бычьего гормона роста (bGH), или функциональную подпоследовательность терминации транскрипции из такой последовательности сигнала рА гена bGH. Так, например, последовательность сигнала терминации транскрипции может содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:14 или функциональную подпоследовательность терминации транскрипции, ее модификацию или вариант, может состоять по сути или состоять из нее.

[00131] В некоторых вариантах осуществления геномы вектора из векторов на основе AAV по настоящему изобретению дополнительно содержат последовательность интрона, которая может быть расположена внутри трансгена, кодирующего белок GCазы, и прерывать его или может быть расположена в другом месте генома вектора и не прерывать кодирующую последовательность, например, располагаться с 5'-конца от трансгена или располагаться с 3'-конца от трансгена или в другом месте, например, располагаться с 3'-конца от промотора и с 5'-конца от трансгена. В некоторых вариантах осуществления последовательность интрона может быть получена из гена бета-глобина человека (HBB), который в некоторых вариантах осуществления может содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:11, может состоять по сути или состоять из нее.

[00132] В некоторых вариантах осуществления геномы вектора из векторов на основе AAV по настоящему изобретению дополнительно содержат дополнительные функциональные последовательности, например, последовательность вирусного посттранскрипционного регуляторного элемента (PRE), например,

посттранскрипционного регуляторного элемента вируса гепатита сурков (WPRE) или посттранскрипционного регуляторного элемента вируса гепатита В (HPRE), любой из которых может быть расположен с 3'-конца от трансгена и с 5'-конца от последовательности сигнала терминации транскрипции или в другом месте генома. В некоторых вариантах осуществления PRE может представлять собой WPRE, содержащий нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:27 или ее функциональную подпоследовательность, модификацию или вариант, состоящий по сути или состоящий из них. Другие последовательности, которые могут найти применение в геномах вектора по настоящему изобретению, включают без ограничения сайт связывания для микроРНК (miRNA), который может быть расположен с 3'-конца от трансгена и с 5'-конца от последовательности сигнала терминации транскрипции или в другом месте генома, а также спейсерные или филлерные нуклеотидные последовательности, которые, хотя и не обязательно предназначены для непосредственного влияния на экспрессию трансгена (хотя такое свойство может присутствовать), включены таким образом, чтобы общая длина генома вектора имела конкретный размер, например, была достаточно длинной, чтобы приблизительно соответствовать упаковочной емкости конкретного капсида AAV, чтобы уменьшить количество загрязняющей геномной ДНК, не относящейся к полноразмерному вектору, которая упакована в капсиды.

[00133] В некоторых вариантах осуществления геномы вектора из векторов на основе AAV по настоящему изобретению содержат первый ITR AAV, область контроля транскрипции, находящуюся в функциональной связи с трансгеном, кодирующим белок GCазы, последовательность сигнала терминации транскрипции и второй ITR AAV. В родственных вариантах осуществления эти элементы могут быть расположены последовательно в направлении от 5' к 3' в молекуле нуклеиновой кислоты, которая соответствует одонитевому геному вектора в смысловой ориентации, или в смысловой нити двухнитевой молекулы ДНК, содержащей последовательность генома, как это может происходить в плазмиде, используемой для продуцирования векторов в клетках-хозяевах. И наоборот, эти элементы могут быть расположены последовательно в порядке от 3' к 5' в комплементарной молекуле нуклеиновой кислоты, которая соответствует одонитевому геному вектора в антисмысловой ориентации, или в антисмысловой нити двухнитевой молекулы ДНК, содержащей последовательность генома. Так, например (и без ограничения), если геном вектора в смысловой ориентации содержит энхансер, промотор, трансген, кодирующий белок, и последовательность сигнала поли(А) в порядке от 5' к 3', то комплементарная антисмысловая последовательность генома вектора будет содержать те же самые элементы, начиная с его 5'-конца, в таком порядке: поли(А), трансген, промотор, энхансер, за исключением того, что нуклеотидная последовательность каждого из элементов (и любая сопряженная последовательность между ними) в направлении от 5' к 3' будет обратно-комплементарной последовательностью для последовательности того же элемента в смысловой нити генома вектора. В случае самокомплементарного генома вектора (scAAV) на протяжении приблизительно половины его последовательности

расположение элементов будет находится в порядке от 5' к 3', а затем в порядке от 3' к 5' в комплементарной половине.

[00134] В некоторых вариантах осуществления геномы вектора из векторов на основе AAV по настоящему изобретению содержат в порядке от 5' к 3' первый ITR AAV из AAV2 на 5'-конце генома, область контроля транскрипции, интрон, трансген, кодирующий белок GCазы, находящийся в функциональной связи с областью контроля транскрипции, последовательность сигнала терминации транскрипции и второй ITR AAV из AAV2 на 3'-конце генома. В некоторых вариантах осуществления область контроля транскрипции содержит энхансерную область и промотор, один или оба из которых могут быть специфичными для ткани печени, например (в порядке от 5' к 3'), энхансерную область, содержащую две тандемные копии последовательности энхансера гена AMBP, каждая из которых содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:8, состоит по сути или состоит из нее, последовательность энхансера гена ALB, содержащую нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:9, состоящую по сути или состоящую из нее, и последовательность промотора гена ALB, содержащую нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:10, состоящую по сути или состоящую из нее. В некоторых вариантах осуществления интрон получен из гена бета-глобина человека (HBB) и содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:11, состоит по сути или состоит из нее. В некоторых вариантах осуществления последовательность сигнала терминации транскрипции получена из гена бычьего гормона роста (bGH) и содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:14, состоит по сути или состоит из нее. В некоторых вариантах осуществления геном вектора на основе AAV дополнительно содержит модифицированную последовательность интрона 2 TBP, расположенную с 3'-конца от последовательности сигнала терминации транскрипции и с 5'-конца от указанного второго ITR AAV2. В любом из вышеуказанных вариантов осуществления трансген, кодирующий белок GCазы человека, может содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:41, состоять по сути или состоять из нее, или кодировать белок GCазы, содержащий зрелый полипептид, идентичный по последовательности аминокислотам 20-516 из SEQ ID NO:16, и содержать нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% идентичную нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:13. В любом из вышеуказанных вариантов осуществления один или оба из первого и второго ITR AAV2 могут быть полноразмерными или усеченными и могут характеризоваться флип- или флоп-конфигурацией. В любом из вышеуказанных вариантов осуществления один или оба из первого и второго ITR AAV2 могут содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18 или SEQ ID NO:19 или обратно-комплементарную последовательность каждой из таких последовательностей, состоять по сути или состоять из них. В любом из вышеуказанных вариантов осуществления геном вектора может содержать нуклеотидную

последовательность под SEQ ID NO:17 или ее обратно-комплементарную последовательность, может состоять по сути или состоять из них. В любом из вышеуказанных вариантов осуществления геном вектора может быть однонитевым, что означает, что он не является самокомплементарным (за пределами ITR), и его длина может находиться в диапазоне от приблизительно 4000 до 5000 нуклеотидов. В любом из вышеуказанных вариантов осуществления геном вектора может находиться в смысловой ориентации или в антисмысловой ориентации. В любом из вышеуказанных вариантов осуществления геном вектора может быть инкапсидирован капсидом AAV, таким как гепатотропный капсид AAV, неограничивающие примеры которого включают капсиды из AAV2, AAV3B, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV13, AAVrh.74, AAVrh.10, AAV-DJ, AAV-LK03, AAV-KP1, AAV-hu.Lvr01, AAV-hu.Lvr02, AAV-hu.Lvr03, AAV-hu.Lvr04, AAV-hu.Lvr05, AAV-hu.Lvr06, AAV-hu.Lvr07, AAV-Anc80, AAV-NP40, AAV-NP59, AAV-NP84, AAV-hu.37, AAV-rh.8, AAV-rh.64R1, RHM4-1, RHM15-1, RHM15-2, RHM15-3/RHM15-5, RHM15-4 и RHM15-6, AAVHSC7, AAVHSC15 и AAVHSC17, или капсид AAV, который содержит белок VP1, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:4, или состоящий из нее. В любом из вышеуказанных вариантов осуществления вектор на основе AAV может содержать геном вектора на основе AAV, инкапсидированный в капсид из AAV3B, где нуклеотидная последовательность генома содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:17 или ее обратно-комплементарную последовательность, состоит по сути или состоит из них.

[00135] В некоторых вариантах осуществления геномы вектора из векторов на основе AAV по настоящему изобретению дополнительно содержат третий ITR AAV, расположенный между первым и вторым ITR AAV, например, в середине генома вектора (даже если не точно в середине), который в некоторых вариантах осуществления может иметь подвергнутый мутации или изменению сайт концевое расщепления, который не подвергается концевому расщеплению. В этих вариантах осуществления геном вектора может быть самокомплементарным, и его длина может находиться в диапазоне от приблизительно 4000 до 5000 нуклеотидов при упаковке в капсид, или его длина находится в диапазоне от приблизительно 2000 до 2500 нуклеотидов, когда его последовательность содержится в плазмиде, подходящей для применения при продуцировании векторов на основе scAAV в клетках-хозяевах.

Продукция вектора на основе AAV

[00136] Как известно в данной области техники, векторы на основе AAV можно продуцировать, в том числе в больших масштабах, различными способами. Например, векторы на основе AAV можно получать в клетках млекопитающих или насекомых, а затем очищать. Традиционный подход, который не основан на коинфицировании вирусом-помощником, предусматривает применение трех плазмид, как обсуждалось выше. Одна плазида содержит гены факторов вируса-помощника, вторая содержит последовательность генома AAV в двухнитевой форме, а третья содержит гены AAV *rep* и

cap. Плазмида *rep/cap* часто содержит ген *rep* из AAV2, хотя это не является необходимостью, а последовательность гена *cap* выбирают на основе того, какой капсидный белок AAV должен составлять капсид. На практике три плазмиды часто по отдельности реплицируют в бактериях, очищают, смешивают в растворе в заранее определенных пропорциях, а затем смешивают со средством для трансфекции. Затем трансфекционную смесь используют для трансфекции подходящих клеток-хозяев, являющихся клетками млекопитающих (в адгезивной или суспензионной культуре клеток), которые инкубируют в течение достаточного времени (например, от 48 до 72 часов и т. д.) и в условиях, подходящих для того, чтобы клетки-хозяева экспрессировали хелперные факторы и гены *rep* и *cap*, а также для того, чтобы геном вектора на основе AAV реплицировался с его плазмидной матрицы и упаковывался в капсиды. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева представляют собой клетки HEK293, которые конститутивно экспрессируют хелперные факторы AdV E1A и E1B, так что плазмида-помощник должна содержать только гены AdV E2A, E4ORF6 и РНК VA. Применение других клеток-хозяев, являющихся клетками млекопитающих, которые не продуцируют AdV или другой вирусный хелперный фактор самостоятельно, потребует применения плазмиды-помощника, содержащей любые отсутствующие или иначе требуемые хелперные факторы. Хотя способ так называемой тройной трансфекции, описанный выше, широко применяется, отсутствует необходимость, чтобы гены хелперных факторов, а также гены *rep* и *cap* обеспечивались на отдельных плаزمидах. В принципе все эти гены можно было бы разместить, например, в одной плазмиде, и в этом случае для трансфекции можно использовать две плазмиды.

[00137] В поисках более эффективных способов продуцирования вектора на основе AAV в больших масштабах были созданы стабильные линии клеток, содержащие некоторые, но не все компоненты, которые в противном случае пришлось бы вводить в клетки путем временной трансфекции. Линии пакующих клеток содержат стабильно интегрированные гены *rep* и *cap* AAV. Для продукции AAV в пакующих клетках требуется их временная трансфекция плазмидой, содержащей геном вектора на основе AAV, и инфицирование вирусом-помощником. Также возможно продуцирование векторов на основе AAV в пакующих клетках без трансфекции, сначала инфицируя их AdV (либо дикого типа, либо с удаленным геном E2b), поставляющим продукты гена AdV E1, которые индуцируют экспрессию *rep* и *cap* в клетках, а также хелперные факторы, необходимые для репликации AAV, с последующим инфицированием гибридным AdV с дефицитом репликации, в котором геном вектора на основе AAV заменяет ген E1 в геноме гибридного вируса.

[00138] В другом варианте линии клеток-продуцентов содержат стабильно интегрированные гены *rep* и *cap* AAV, а также геном вектора на основе AAV. Для продукции AAV в клетках-продуцентах необходимо инфицировать их вирусом-помощником. Пакующие клетки и клетки-продуценты более подробно описаны, например, в *Martin, J, et al., Generation and characterization of adeno-associated virus*

producer cell lines for research and preclinical vector production, Hum. Gene Methods, 24:253-269 (2013); Gao, GP, et al., High-titer adeno-associated viral vectors from a Rep/Cap cell line and hybrid shuttle virus, Hum. Gene Ther., 9:2353-62 (1998); Martin, J, et al., Generation and Characterization of Adeno-Associated Virus Producer Cell Lines for Research and Preclinical Vector Production, Hum. Gene Ther. Meth., 24:253-69 (2013); Clement, N and JC Grieger, Manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors for clinical trials, Mol. Ther. Meth. & Clin. Dev. (2016) 3, 16002 (doi:10.1038/mtm.2016.2). Возможны и другие клеточные системы для продуцирования векторов на основе AAV в клетках млекопитающих, в том числе в коммерческих масштабах.

[00139] Для продуцирования векторов на основе AAV также использовалась бакуловирусная система, в которой клетки насекомых Sf9 инфицируют рекомбинантными векторами на основе бакуловируса, которые в отдельности содержат гены *rep* и *cap* AAV, а также геном AAV. Экзогенные гены экспрессируются, после чего геном упаковывается в векторные частицы внутри клеток. В ранних версиях системы каждый компонент - *rep*, *cap* и геном - переносился тремя отдельными бакуловирусами. Позднее были внесены модификации, такие как объединение *rep* и *cap* в один бакуловирус, так что требовалось только два типа бакуловируса, а также создание линий клеток Sf9, содержащих стабильно интегрированные гены *rep* и *cap* AAV, для которых требуется инфицирование только одним типом рекомбинантного бакуловируса, содержащего геном вектора на основе AAV. Применение бакуловирусной системы для продуцирования вектора на основе AAV более подробно описано, например, в *Urabe, M, et al., Insect Cells as a Factory to Produce Adeno-Associated Virus Type 2 Vectors, Hum. Gene Ther., 13:1935-43 (2002); Virag, T, et al., Producing recombinant adeno-associated virus in foster cells: Overcoming production limitations using a baculovirus-insect cell expression strategy, Hum. Gene Ther., 20:807-17 (2009); Smith, RH, et al., A simplified baculovirus-AAV expression vector system coupled with one-step affinity purification yields high-titer rAAV stocks from insect cells, Mol. Ther., 17:1888-96 (2009); Mietzsch, M, et al., OneBac: platform for scalable and high-titer production of adeno-associated virus serotype 1-12 vectors for gene therapy, Hum. Gene Ther. 25(3):212-22 (2014).* Возможны и другие клеточные системы для продуцирования векторов на основе AAV в клетках насекомых, в том числе в коммерческих масштабах.

Клетки-хозяева

[00140] Используемый в данном документе термин “клетки-хозяева” означает клетки, подходящие или адаптированные для продукции векторов на основе AAV *in vitro*. Клетки-хозяева часто представляют собой клональные клеточные линии, которые способны делиться в течение нескольких поколений, прежде чем старение остановит рост, или даже могут быть бессмертными. Для продуцирования векторов клетки-хозяева могут быть модифицированы, временно или постоянно, благодаря введению экзогенной генетической информации, разработанной для управления биосинтезом в клетках-хозяевах различных компонентов, необходимых для сборки вектора на основе AAV, в частности, капсидных белков AAV, белков Rep, факторов вируса-помощника и геномов

вектора. Например, клетки-хозяева могут быть трансфицированы экзогенно поставляемой нуклеиновой кислотой, например, в форме одной или нескольких ДНК-плазмид, содержащих нуклеотидные последовательности, кодирующие необходимые компоненты вектора.

[00141] В данной области техники известны различные способы трансфекции клеток-хозяев нуклеиновой кислотой. Они включают без ограничения смешивание нуклеиновой кислоты с определенными соединениями, которые могут образовывать комплексы с нуклеиновыми кислотами, а затем поглощаться клетками, включая фосфат кальция или катионные органические соединения, такие как DEAE-декстран, полиэтиленимин (PEI), полилизин, полиорнитин, полибрен, циклодекстрин, катионные липиды и другие соединения, известные в данной области техники. Трансфекцию также можно осуществлять нехимическим способом, с помощью электропорации и более экзотических технологий, таких как биобаллистическая доставка частиц. Как известно в данной области техники, трансфекция может быть временной или стабильной. При временной трансфекции трансфицированная нуклеиновая кислота присутствует в клетке в течение ограниченного периода времени и, в случае ДНК, не интегрируется в геном. При стабильной трансфекции ДНК, введенная в клетку, может сохраняться в течение длительных периодов времени либо в виде эпизомальной плазмиды, либо быть интегрированной в хромосому. Обычно для получения стабильно трансфицированных клеток плазмиду, содержащую ген селективного маркера, а также нуклеотидную последовательность, кодирующую один или несколько необходимых компонентов вектора, трансфицируют в клетки, которые затем выращивают и поддерживают под селективным давлением, т. е. в условиях, которые приводят к уничтожению нетрансфицированных клеток или трансфицированных клеток, из которых по какой-то причине теряется экзогенная ДНК, включая ее селективный маркер. Например, плазмиды могут содержать ген устойчивости к антибиотикам, и трансфицированные клетки можно отбирать путем добавления антибиотика в среду, в которой выращиваются клетки. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая один или несколько необходимых компонентов вектора, введенная в стабильно трансфицированные клетки-хозяева, находится под контролем индуцируемого промотора и не экспрессируется или экспрессируется только на низком уровне до тех пор, пока в процессе выращивания клеток не вводится фактор окружающей среды, например, лекарственное средство, ион металла или повышение температуры, который индуцирует промотор.

[00142] В других вариантах осуществления геномы клеток-хозяев могут быть модифицированы постоянно и целенаправленным образом с использованием способов генной инженерии, например, "нокин" или способы редактирования генов, чтобы управлять продуцированием одного или нескольких необходимых компонентов вектора в клетках-хозяевах. В других вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая один или несколько необходимых компонентов вектора, может быть введена

в клетки-хозяева для целей управления продуцированием векторов на основе AAV посредством трансдукции, при этом клетки-хозяева инфицируются модифицированными вирусами, содержащими такие нуклеотидные последовательности. Примерами вирусных векторов, применимых для таких целей, являются аденовирус, ретровирусы (включая лентивирусы), бакуловирусы, вирус осповакцины и вирус простого герпеса, а также возможны и другие.

[00143] Клетки-хозяева могут представлять собой любой тип клеток, известный в данной области техники и применимый для цели продуцирования векторов на основе AAV. Клетками-хозяевами часто являются клетки животных, причем возможны различные типы или виды, например, клетки насекомых или клетки млекопитающих, включая клетки крысы, мыши или человека, а также возможны и другие. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева, применимые для продуцирования векторов на основе AAV по настоящему изобретению, представляют собой клетки-хозяева, являющиеся клетками млекопитающих, примеры которых включают клетки HeLa, клетки Cos, клетки HEK293 (и варианты клеток HEK293, такие как клетки HEK293E, HEK293F, HEK293H, HEK293T или HEK293FT), клетки A549, клетки ВНК, клетки Vero, клетки NIH 3T3, клетки HT-1080, клетки Sp2/0, клетки NS0, клетки C127, клетки AGE1.HN, клетки CAP, клетки НКВ-11, клетки WI-38, клетки MRC-5 или клетки PER.C6, а также возможны многие другие. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева, применимые для продуцирования векторов на основе AAV по настоящему изобретению, представляют собой клетки-хозяева, являющиеся клетками насекомых, примеры которых включают клетки Sf9, ExpiSf9, клетки Sf21, клетки S2, клетки D.Mel2, клетки Tn-368 или клетки VTI-Tn-5B1-4, а также возможны многие другие. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева, включая без ограничения клетки HEK293 и их варианты, могут быть адаптированы к росту в суспензионной культуре.

[00144] Для целей продуцирования векторов на основе AAV клетки-хозяева часто выращивают или поддерживают в культуре в контролируемых условиях, способствующих их росту и биосинтезу вектора. Например, клетки-хозяева можно выращивать в жидких средах определенного химического состава, которые обеспечивают все питательные вещества, необходимые для роста и биосинтеза клеток. Иллюстративные среды включают DMEM, DMEM/F12, MEM, RPMI 1640 для клеток-хозяев, являющихся клетками млекопитающих, и Express Five SFM, Sf-900 II SFM, Sf-900 III или ExpiSf CD для определенных клеток насекомых. Такие среды могут быть дополнены антибиотиками, факторами роста или цитокинами (полученными рекомбинантным путем или присутствующими в сыворотке крови животных, например, FBS), которые, как известно, стимулируют рост конкретного типа применяемых клеток, а также другими ингредиентами, которые могут потребоваться для оптимального биосинтеза векторов на основе AAV, но которые в противном случае были бы в ограниченном количестве. Иллюстративные добавки включают незаменимые аминокислоты, глутамин, витамин К, инсулин, BSA или трансферрин. Помимо питательной среды, для оптимизации роста

и/или продуктивности клеток можно контролировать и другие условия культивирования, например, рН, температуру, концентрацию CO₂ и кислорода.

[00145] Клетки-хозяева в культуре можно выращивать или поддерживать во многих контейнерах, известных в данной области техники, таких как биореакторы с мешалкой, одноразовые биореакторы WAVE, вращающиеся колбы, биореакторы с полыми волокнами или роллерные флаконы, некоторые из которых могут быть сконструированы и сконфигурированы для однократного или многократного применения. В зависимости от характеристик рассматриваемых клеток-хозяев, клетки-хозяева могут выращиваться в адгезивной культуре клеток, в которой клетки прикрепляются и растут, находясь в контакте с физическим субстратом, или в суспензионной культуре клеток, где отдельные клетки свободно плавают в среде, которая их поддерживает, или будучи прикрепленными к микроносителям в виде гранул, которые суспендированы в среде. Как известно в данной области техники, были разработаны различные технологии, которые можно использовать для выращивания клеток-хозяев до высокой плотности клеток, например, перфузионное культивирование, которое способно приводит к увеличению общего количества вектора на основе AAV, вырабатываемого за один производственный цикл.

[00146] Как известно в данной области техники, образцы клеток-хозяев часто хранятся в банках замороженных клеток, например, главных банках клеток и рабочих банках клеток, что облегчает продукцию биологических продуктов во множестве партий с течением времени, обеспечивая при этом постоянную производительность клеток-хозяев. Перед началом кампании по продуцированию вектора на основе AAV замороженный образец клеток-хозяев из банка клеток, как правило, будут размораживать, высевать в небольшой объем культуры и выращивать до все большей плотности или количества в культурах увеличивающегося объема. Когда клетки-хозяева достигают требуемой плотности клеток и/или объема в культуре, можно ввести экзогенный генетический материал, например, путем трансфекции плазмидной ДНК или инфицирования или трансдукции вирусными векторами, чтобы заставить их начать продуцировать вектор на основе AAV. В качестве альтернативы, если используются постоянно модифицированные клетки-хозяева, в которых нуклеотидная последовательность, кодирующая один или несколько необходимых компонентов вектора, находится под индуцируемым контролем, можно ввести фактор окружающей среды, необходимый для индуцирования экспрессии. Затем клетки-хозяева можно выращивать или поддерживать в культуре в течение определенного времени и в условиях, подходящих для того, чтобы они могли продуцировать векторы на основе AAV.

Очистка вектора на основе AAV

[00147] После биосинтеза в клетках-хозяевах векторы на основе AAV можно очистить различными способами, известными в данной области техники. Например, в некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева можно лизировать механически или химически, например, с помощью детергента, после чего ДНК клетки-хозяина и другие

компоненты удаляют, после чего следуют такие стадии, как центрифугирование в градиенте плотности или применение одного или нескольких способов хроматографического разделения с получением высокоочищенного препарата векторов на основе AAV для применения в исследованиях или способах лечения.

[00148] Хроматографические способы, применимые при очистке векторов на основе AAV, включают без ограничения эксклюзионную хроматографию (SEC); аффинную хроматографию с использованием любого аффинного лиганда, прикрепленного к хроматографической смоле или матрице, способного специфически связываться с капсидом, такого как антитело, лектин или гликан; хроматографию с иммобилизованным хелатом металла (IMAC); адсорбционную хроматографию со свободными тиоловыми группами; хроматографию гидрофобного взаимодействия (HIC); мультимодальную хроматографию (MMC); псевдоаффинную хроматографию и ионообменную хроматографию (IEX или IEC), например, анионообменную хроматографию (AEX) или катионообменную хроматографию (CEX).

[00149] В некоторых вариантах осуществления векторы на основе AAV можно очистить с помощью аффинной хроматографии на основе антител, при которой антитело или его фрагмент прикрепляют к неподвижной фазе (матрице или смоле), загруженной в хроматографическую колонку, через которую прокачивают лизат клетки-хозяина, после чего следует промывка и элюирование вектора, связавшегося с антителами. Антитело, связанное с твердой фазой, может представлять собой IgG или его фрагмент, или одноцепочечное антитело верблюдовых (например, антитело верблюдовых на основе переменной области тяжелой цепи), возможны и другие типы антител. Неограничивающие примеры лиганд-аффинных смол включают Sepharose AVB, POROS CaptureSelect AAVX, POROS CaptureSelect AAV8 и POROS CaptureSelect AAV9. См., например, *Terova, O, et al., Affinity Chromatography Accelerates Viral Vector Purification for Gene Therapies, BioPharm Intl. eBook pp. 27-35 (2017); Mietzsch, M, et al., Characterization of AAV-Specific Affinity Ligands: Consequences for Vector Purification and Development Strategies, Mol. Ther. Meth. & Clin. Dev., 19:362-73 (2020); Rieser, R, et al., Comparison of Different Liquid Chromatography-Based Purification Strategies for Adeno-Associated Virus Vectors, Pharmaceutics 13, 748 (2021) (doi.org/10.3390/pharmaceutics13050748).*

[00150] В других вариантах осуществления векторы на основе AAV можно очистить с использованием лигандной хроматографии, при которой к неподвижной фазе присоединяют тот же тип лиганда, который, как известно, определенные AAV используют при связывании с клетками, например, гликан, сиаловую кислоту (например, O-связанную или N-связанную сиаловую кислоту), галактозу, гепарин, гепарансульфат или протеогликан, например, гепаран или гепарансульфатпротеогликан (HSPG). Например, аффинную матрицу, содержащую остатки сиаловой кислоты, можно использовать для очистки векторов на основе AAV с капсидами, которые специфически связываются с сиаловой кислотой (например, AAV1, AAV4, AAV5 или AAV6); аффинную матрицу, содержащую галактозу, можно использовать для очистки векторов на основе AAV с

капсидами, которые специфически связываются с галактозой (например, AAV9); а аффинную матрицу, содержащую гепарин, гепаран или HSPG, можно использовать для очистки векторов на основе AAV с капсидами, которые специфически связываются с HSPG (например, AAV2, AAV3A, AAV3B, AAV6 или AAV13).

[00151] В зависимости от физико-химических характеристик вектора, например, заряда капсида, векторы на основе AAV можно дополнительно очистить путем осуществления анионообменной, катионообменной хроматографии или хроматографии гидрофобного взаимодействия. Также можно использовать другие стадии последующей обработки, применимые для очистки векторов на основе AAV, например, без ограничения, обессоливание и замену буфера, ультрафильтрацию, нанофильтрацию, диафильтрацию и фильтрацию с тангенциальным потоком (TFF). Возможно применение более чем одной стадии последующей обработки, и несколько стадий последующей обработки можно выполнять в любом порядке в соответствии со знаниями специалиста средней квалификации в данной области техники.

Способы лечения

[00152] Среди других вариантов осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения болезни Гоше, включая болезнь Гоше типа 1 (GD1), или другого типа дефицита GCase путем введения субъекту, например, субъекту-человеку, нуждающемуся в лечении болезни Гоше (или дефицита GCase), терапевтически эффективного количества вектора на основе AAV по настоящему изобретению (включая без ограничения вектор, описанный в данном документе как AAV3B-GBA клон 128) или фармацевтической композиции, содержащей такие векторы на основе AAV. Также предусмотрено применение вектора на основе AAV по настоящему изобретению в изготовлении лекарственного препарата для применения в способах лечения, раскрытых в данном документе. Кроме того, предусмотрен вектор на основе AAV по настоящему изобретению или фармацевтическая композиция, содержащая такие векторы на основе AAV, для применения в способах лечения, раскрытых в данном документе.

[00153] Лечение субъектов с болезнью Гоше не обязательно должно приводить к излечению, чтобы считаться эффективным, при этом “излечение” определяется либо как остановка прогрессирования заболевания, либо как частичное или полное восстановление здоровья субъекта, каким оно было до появления или ухудшения симптомов, или по сравнению со здоровыми людьми без GD1. Вместо этого терапевтически эффективное количество вектора на основе AAV по настоящему изобретению (включая без ограничения вектор, описанный в данном документе как AAV3B-GBA клон 128) или фармацевтической композиции, содержащей такие векторы на основе AAV, может быть таким, которое служит для того, чтобы по меньшей мере частично устранить, уменьшить или снизить интенсивность выраженности или степени тяжести у субъекта по меньшей мере одного симптома или признака, ассоциированных с болезнью Гоше или дефицитом GCase; или по меньшей мере частично устранить, уменьшить или снизить интенсивность выраженности или степени тяжести у субъекта по меньшей мере одного нарушения или

дисфункции организма, органа, ткани или клетки, вызванных болезнью Гоше или дефицитом GСазы; или замедлить прогрессирование болезни Гоше или других вредоносных эффектов дефицита GСазы у субъекта; или улучшить качество жизни субъектов с болезнью Гоше или испытывающих вредоносный эффект дефицита GСазы. Примеры симптомов, признаков, нарушений или дисфункций, ассоциированных с болезнью Гоше или дефицитом GСазы, включают без ограничения гепатоспленомегалию, гепатомегалию, спленомегалию, анемию, лейкоцитопению, лейкопению, панцитопению, тромбоцитопению, моноклональную гипергаммаглобулинемию, поликлональную гипергаммаглобулинемию, анорексию, хроническую усталость, костный кризис, аваскулярный некроз костей, боль в костях, остеолитический остеонекроз, остеопению, снижение качества жизни (QoL) и другие симптомы, признаки, нарушения или дисфункции, ассоциированные с болезнью Гоше или дефицитом GСазы, которые известны в данной области техники.

[00154] В некоторых вариантах осуществления раскрытые в данном документе способы лечения GD1 или другого типа дефицита GСазы могут быть использованы для лечения GD1 или дефицита GСазы у человека с любым типом гомозиготной или гетерозиготной вредоносной мутации в гене GBA или затрагивающей его. Неограничивающие примеры вредоносных мутаций включают делеции, вставки, рекомбинации, варианты сайтов сплайсинга, миссенс-мутации или нонсенс-мутации в одном или обоих аллелях гена GBA, мутации, затрагивающие области контроля транскрипции (например, энхансеры или промоторы) одного или обоих аллелей гена GBA, и/или мутации, которые снижают стабильность мРНК, экспрессируемой с одного или обоих аллелей гена GBA, или количество белка, транслируемого с таких мРНК-транскриптов, при условии, что мутация(-и) приводит(-ят) к уменьшению количества или потере продуцируемого белка GСазы и/или уменьшению количества или потере ферментативной активности продуцируемого белка GСазы. Например, и без ограничения, некоторые из наиболее распространенных вредоносных мутаций в гене GBA человека, ассоциированные с GD1, включают с.1226A>G (N370S), с.1448T>C (L444P), с.84dup, с.115+1G>A (IVS2+1G>A) и мутацию RecNciI, возникающую в результате рекомбинации между GBA и псевдогеном GBAP, а также многие другие, которые известны в данной области техники. Способы генотипирования субъекта как имеющего вредоносную мутацию в одном или обоих аллелях гена GBA, такие как анализ RFLP или геномное секвенирование, известны специалистам средней квалификации в данной области техники, как и способы обнаружения и количественного определения количества белка GСазы и/или ферментативной активности GСазы, присутствующей в образце от субъекта.

[00155] В некоторых вариантах осуществления субъектами являются субъекты-люди с диагнозом GD1, которые никогда ранее не проходили ферментозаместительную терапию (ERT) или субстрат-редуцирующую терапию (SRT) в отношении GD1 (т. е. не получавшие стандартное лечение), тогда как в других вариантах осуществления

субъектами являются субъекты-люди с диагнозом GD1, которые проходили ERT или SRT до лечения с помощью способов по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления в отношении субъекта с GD1, который получает стандартное лечение (т. е. подвергался лечению), терапевтически эффективное количество вектора на основе AAV по настоящему изобретению или фармацевтической композиции, содержащей такие векторы на основе AAV, позволяет таким субъектам прекратить ERT или SRT или уменьшить дозу и/или частоту таких ERT или SRT и не испытывать ухудшения симптомов, признаков, нарушений или дисфункций, характерных для болезни Гоше (или дефицита GСазы), по меньшей мере в течение некоторого периода времени (т. е. терапевтический эффект не обязательно должен быть пожизненным).

[00156] Терапевтическую эффективность способов лечения, раскрытых в данном документе, можно оценить у отдельных субъектов с GD1 или другим типом дефицита GСазы путем наблюдения или измерения и сравнения степени тяжести или величины любого симптома, признака, нарушения, дисфункции или лабораторного значения, характерных для GD1 (или дефицита GСазы), до (исходный уровень) и после лечения. Такое сравнение можно проводить один или несколько раз после лечения, например, через 0, 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45 или 48 месяцев или в какой-нибудь другой момент времени после лечения. Данные, используемые для сравнения по отдельным субъектам, могут представлять собой отдельные точки данных или среднее значение множества точек данных, если таковые имеются.

[00157] В некоторых других вариантах осуществления терапевтическую эффективность можно оценить в популяции (т. е. двух или более) субъектов с GD1 или другим типом дефицита GСазы, служащих в качестве своего собственного контроля, путем наблюдения или измерения степени тяжести или величины любого симптома, признака, нарушения, дисфункции или лабораторного значения, характерных для GD1 (или дефицита GСазы), среди индивидуумов в популяции до (исходный уровень) и после лечения, и сравнения усредненных данных до лечения с усредненными данными после лечения. Такое сравнение можно проводить один или несколько раз после лечения, например, через 0, 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45 или 48 месяцев или в какой-нибудь другой момент времени после лечения. Исследуемая популяция может получать стандартную терапию на основе ERT или SRT в отношении GD1 до лечения векторами на основе AAV по настоящему изобретению, и, как правило, прекращает терапию на основе ERT или SRT (в зависимости от обстоятельств) после лечения вектором по меньшей мере в течение периода мониторинга терапевтического эффекта. В других вариантах осуществления исследуемая популяция может не получать стандартную терапию до лечения с помощью векторов на основе AAV по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления исследования, направленные на установление и количественное определение терапевтической эффективности, могут быть разработаны для сравнения эффектов лечения в популяции субъектов, получавших лечение с помощью векторов на основе AAV по настоящему изобретению (группа лечения), с эффектами

лечения в популяции субъектов, получавших плацебо (контрольная группа). Как правило, хотя и не обязательно, субъектов в группе лечения и контрольной группе в исследовании сопоставляют по соответствующим характеристикам субъекта, таким как возраст, пол, степень тяжести заболевания на момент вмешательства, а также по тому, получал ли субъект когда-либо или получает ли стандартную терапию на основе ERT или SRT, или же он не проходил лечение. В других вариантах осуществления контрольную популяцию не обрабатывают плацебо, а вместо этого отбирают из исследования естественного течения, в котором пациентов с GD1 наблюдают для описания и количественного определения прогрессирования соответствующих параметров заболевания в отсутствие генной терапии.

[00158] В некоторых вариантах осуществления способы лечения GD1 или другого типа дефицита GСазы, раскрытые в данном документе, эффективны для лечения субъектов с GD1 или дефицитом GСазы любого возраста, включая без ограничения субъектов в возрасте менее 1 года, например, субъектов, которым приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 месяцев, или субъектов, которым по меньшей мере или приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 лет или старше, или в возрасте, находящемся между любыми из вышеуказанных специально перечисленных возрастов и включая их.

[00159] В некоторых вариантах осуществления способы лечения GD1 или другого типа дефицита GСазы, раскрытые в данном документе, являются эффективными для лечения субъектов с GD1 любого уровня или степени тяжести на момент первого введения векторов на основе AAV по настоящему изобретению, например, легкой, средней или тяжелой GD1, или степени тяжести GD1, отраженной в оценке степени тяжести субъекта с использованием подходящего индекса оценки степени тяжести, такого как GD1-DS3 или GauSSI-I, которые дополнительно описаны ниже. Например, и без ограничения, во время первого лечения векторами на основе AAV по настоящему изобретению субъект или субъекты могут характеризоваться оценкой степени тяжести, составляющей 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 по индексу оценки степени тяжести GD1-DS3, или оценкой степени тяжести, составляющей 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 по GauSSI-I. В некоторых вариантах осуществления во время первого лечения векторами на основе AAV по настоящему изобретению субъект не продемонстрировал никаких явных признаков или симптомов GD1, но диагноз был поставлен из-за вероятности развития таких признаков или симптомов на основе генетического тестирования, демонстрирующего наличие по меньшей мере одной вредоносной мутации в одном или обоих аллелях гена GBA субъекта.

[00160] В некоторых вариантах осуществления способы лечения дефицита GСазы, включая болезнь Гоше типа 1 (GD1), с помощью векторов на основе AAV по настоящему

изобретению (включая без ограничения вектор, описанный в данном документе как AAV3B-GBA клон 128) являются эффективными для лечения GD1 или любой другой формы дефицита GСазы в течение периода времени после введения вектора, в течение которого пациент может отказаться от стандартного лечения болезни Гоше типа 1, например, терапии на основе ERT или SRT, не испытывая никаких симптомов или признаков болезни Гоше, или не испытывая никакого ухудшения симптомов или признаков болезни Гоше, которые могли присутствовать во время генной терапии, или самое большее испытывая минимальное ухудшение симптомов или признаков болезни Гоше, которые могли присутствовать во время генной терапии, так что общее состояние здоровья, функции, качество жизни и/или продолжительность жизни пациента не будут существенно или фактически затронуты. В некоторых вариантах осуществления этот период, называемый в данном документе периодом терапевтической стойкости, может представлять собой любой подходящий или требуемый период времени, включая, например, и без ограничения, по меньшей мере или приблизительно 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 или более месяцев, или по меньшей мере или приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более лет, или по меньшей мере или приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более десятилетий или любой промежуток времени между любыми из конкретно перечисленных значений, или даже в некоторых вариантах осуществления оставшуюся часть жизни пациента после получения генной терапии, описанной в данном документе.

Гематологические проявления

[00161] В некоторых вариантах осуществления способы лечения дефицита GСазы, включая болезнь Гоше типа 1 (GD1), с помощью векторов на основе AAV по настоящему изобретению (включая без ограничения вектор, описанный в данном документе как AAV3B-GBA клон 128) являются эффективными для снижения заболеваемости, частоты или степени тяжести гематологических проявлений патологического процесса, включая, среди прочего, анемию, тромбоцитопению и повышенную кровоточивость. В некоторых вариантах осуществления лечение является эффективным для снижения у пациентов с GD1 частоты или выраженности гематологических проявлений патологического процесса в течение периода времени после введения векторов на основе AAV по настоящему изобретению, составляющего самое большее, или по меньшей мере, или приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 или 180 дней, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 месяцев, или 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 или 6,0 лет, или диапазон времени между любыми из вышеуказанных перечисленных периодов времени и включая их.

Анемия

[00162] В некоторых вариантах осуществления способы лечения дефицита GСазы, включая болезнь Гоше типа 1 (GD1), с помощью векторов на основе AAV по настоящему изобретению (включая без ограничения вектор, описанный в данном документе как AAV3B-GBA клон 128) являются эффективными для снижения заболеваемости, частоты или степени тяжести анемии, более низкого, чем нормальное, числа эритроцитов, которое

часто количественно определяют путем измерения количества гемоглобина в крови или процента объема крови, который состоит из эритроцитов (гематокрит), и ассоциированных с этим рисков, включая усталость, слабость, одышку, головокружение и другие. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению для лечения GD1 способны приводить к уменьшению числа переливаний крови, которые в противном случае потребовались бы пациентам с GD1 для предотвращения симптомов анемии, например, усталость или другие симптомы. В некоторых вариантах осуществления лечение является эффективным для снижения у пациентов с GD1 частоты или выраженности анемии в течение периода времени после введения векторов на основе AAV по настоящему изобретению, составляющего самое большее, или по меньшей мере, или приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 или 180 дней, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 месяцев, или 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 или 6,0 лет или диапазон времени между любыми из вышеуказанных перечисленных периодов времени и включая их.

[00163] В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению для лечения GD1 (или другого дефицита GСазы) являются эффективными для увеличения количества гемоглобина (Hb) в крови как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1, например, от менее чем 8 граммов на децилитр (г/дл) до большего значения, например, от 8,0 до 9,9 г/дл или от 10 до 12 г/дл, или концентрации гемоглобина в крови более 12 г/дл у взрослых мужчин или более 11,5 г/дл у взрослых женщин. В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии.

[00164] В некоторых вариантах осуществления способы лечения являются эффективными для повышения концентрации Hb в крови как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1 до уровня по меньшей мере или приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или 110% от средней концентрации Hb в крови здоровых людей. В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии. В некоторых вариантах осуществления в зависимости от используемого эталонного диапазона концентрация Hb в крови здоровых людей находится в диапазоне от приблизительно 13,2 до 16,6 граммов на децилитр (г/дл), или от 13,8 до 17,2 г/дл, или от 14,0 до 17,5 г/дл, или от 14 до 18 г/дл у взрослых мужчин, в диапазоне от приблизительно 11,6 до 15,0 г/дл, или от 12,1 до 15,1 г/дл, или от 12,3 до 15,3 г/дл, или от 12 до 16 г/дл у взрослых женщин, в диапазоне от 9,5 до 14,0 г/дл у детей от 1 до 6 лет и в диапазоне от 10,0 до 15,5 г/дл у детей и подростков от 6 до 18 лет. В некоторых вариантах осуществления эталоном нормы является другое значение,

например, приблизительно 13, 14, 15, 16, 17 или 18 г/дл для мужчин и 11, 12, 13, 14, 15 или 16 г/дл для женщин, или диапазон, охватывающий любые из вышеуказанных специально перечисленных значений, или целое число между ними.

[00165] В некоторых вариантах осуществления способы лечения являются эффективными для повышения концентрации Hb в крови пациентов с GD1 как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1 на по меньшей мере или приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110% или более выше концентрации Hb на исходном уровне до генной терапии или по сравнению со средней концентрацией Hb в крови у сопоставимых (например, соответствующих по возрасту и полу) контрольных пациентов с GD1 или другой формой дефицита GСазы. В некоторых вариантах осуществления в последнем случае контрольные группы не получали стандартное лечение или получают стандартную терапию на основе ERT или SRT. В некоторых неограничивающих вариантах осуществления концентрация Hb на исходном уровне в крови пациентов с GD1, не получавших стандартное лечение, или пациентов с GD1, получающих стандартную терапию на основе ERT или SRT, не превышает, или является меньшей, или составляет приблизительно 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 110, 90, 80, 70, 60 или 50 г/дл крови или меньше, или диапазон, охватывающий любые из вышеуказанных специально перечисленных значений, или целое значение между ними. В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии.

[00166] В некоторых вариантах осуществления способы лечения являются эффективными для повышения концентрации Hb в крови пациентов с GD1 как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1 на по меньшей мере или приблизительно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9 или 5,0 г/дл или больше относительно концентрации Hb на исходном уровне до генной терапии или по сравнению со средней концентрацией Hb в крови у сопоставимых (например, соответствующих по возрасту и полу) контрольных пациентов с GD1 или другой формой дефицита GСазы. В некоторых вариантах осуществления в последнем случае контрольные группы не получали стандартное лечение или получают стандартную терапию на основе ERT или SRT. В некоторых неограничивающих вариантах осуществления концентрация Hb на исходном уровне в крови пациентов с GD1, не получавших стандартное лечение, или пациентов с GD1, получающих стандартную терапию на основе ERT или SRT, не превышает, или является меньшей, или составляет

приблизительно 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 110, 90, 80, 70, 60 или 50 г/дл крови или меньше, или диапазон, охватывающий любые из вышеуказанных специально перечисленных значений, или целое значение между ними. В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии. В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии, описанной в данном документе, и такие способы лечения являются эффективными для поддержания в определенных пределах концентрации Hb в крови, достигаемой в результате стандартной терапии. В некоторых вариантах осуществления пределы составляют менее или приблизительно 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или 0%.

[00167] В некоторых вариантах осуществления способы лечения являются эффективными для повышения гематокрита, который представляет собой процентное содержание по объему эритроцитов в крови, у пациентов с GD1, как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1 до уровня по меньшей мере или приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110% или больше от среднего значения гематокрита здоровых людей. В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии. В некоторых вариантах осуществления в зависимости от используемого эталонного диапазона гематокрит здоровых людей находится в диапазоне от приблизительно 40% до 54% или от 41% до 50% у взрослых мужчин, и в диапазоне от приблизительно 36% до 44% или от 36% до 48% у взрослых женщин. В некоторых вариантах осуществления эталоном нормы является целое значение, например, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54% или 55%.

[00168] В некоторых вариантах осуществления способы лечения являются эффективными для повышения гематокрита у пациентов с GD1, как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1 на по меньшей мере или приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110% или больше относительно концентрации Hb на исходном уровне до генной терапии или по сравнению со средним значением гематокрита у сопоставимых (например, соответствующих по возрасту и полу) контрольных пациентов с GD1 или другой формой дефицита GСазы. В некоторых вариантах осуществления в последнем случае контрольные группы не получали стандартное лечение или получают стандартную терапию на основе ERT или SRT. В некоторых из этих вариантов

осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии.

Тромбоцитопения

[00169] В некоторых вариантах осуществления способы лечения дефицита GСазы, включая болезнь Гоше типа 1 (GD1), с помощью векторов на основе AAV по настоящему изобретению (включая без ограничения вектор, описанный в данном документе как AAV3B-GBA клон 128) являются эффективными для снижения заболеваемости, частоты или степени тяжести тромбоцитопении, более низкого, чем нормальное, числа тромбоцитов, часто определяемого как менее 150000 тромбоцитов на микролитр (мкл) крови, и ассоциированных с этим рисков, включая образование синяков, более длительное, чем нормальное, время свертывания крови и избыточное кровотечение. В некоторых вариантах осуществления лечение является эффективным для снижения у пациентов с GD1 частоты или выраженности тромбоцитопении в течение периода времени после введения векторов на основе AAV по настоящему изобретению, составляющего самое большее, или по меньшей мере, или приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 или 180 дней, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 месяцев, или 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 или 6,0 лет или диапазон времени между любыми из вышеуказанных перечисленных периодов времени и включая их.

[00170] В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению для лечения GD1 способны приводить к увеличению количество тромбоцитов как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1, например, от менее 60000/мкл крови (часто определяется как умеренная или тяжелая тромбоцитопения) до большего числа, например, от 60000/мкл до 100000/мкл, или от 60000/мкл до 120000/мкл, или от 100000/мкл до 150000/мкл, или от 120000/мкл до 150000/мкл, или до количества тромбоцитов более 150000/мкл крови. В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению для лечения GD1 способны приводить к уменьшению числа инфузий тромбоцитов, которые в противном случае потребовались бы пациентам с GD1 для предотвращения чрезмерного кровотечения, например, перед стоматологической процедурой или хирургическим вмешательством или после травмы.

[00171] В некоторых вариантах осуществления способы лечения являются эффективными для повышения количества тромбоцитов как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1 до уровня по меньшей мере или приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%,

40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110% или больше от среднего количества тромбоцитов у здоровых людей, которое в некоторых вариантах осуществления может находиться в диапазоне от 150000/мкл до 450000/мкл крови. В некоторых вариантах осуществления эталоном нормы является другое значение, например, приблизительно 150000/мкл, 200000/мкл, 250000/мкл, 300000/мкл, 350000/мкл, 400000/мкл или 450000/мкл крови или диапазон, охватывающий любые из вышеуказанных специально перечисленных значений, или целое число между ними. В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии.

[00172] В некоторых вариантах осуществления способы лечения являются эффективными для повышения количества тромбоцитов на микролитр крови пациентов с GD1, как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1 на по меньшей мере или приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110% или больше относительно количества тромбоцитов на исходном уровне до генной терапии или по сравнению со средним значением количества тромбоцитов у сопоставимых (например, соответствующих по возрасту и полу) контрольных пациентов с GD1 или другой формой дефицита GСазы. В некоторых вариантах осуществления в последнем случае контрольные группы не получали стандартное лечение или получают стандартную терапию на основе ERT или SRT. В некоторых неограничивающих вариантах осуществления количество тромбоцитов на исходном уровне у пациентов с GD1, не получавших стандартное лечение, или пациентов с GD1, получающих стандартную терапию на основе ERT или SRT, не превышает, или является меньшим, или составляет приблизительно 350000, 300000, 250000, 200000, 150000, 100000, 90000, 80000, 70000, 60000, 50000, 40000 или 30000 на мкл крови или меньше, или диапазон, охватывающий любые из вышеуказанных специально перечисленных значений, или целое значение между ними. В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии.

[00173] В некоторых вариантах осуществления способы лечения являются эффективными для повышения количества тромбоцитов у пациентов с GD1 как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1 на по меньшей мере или приблизительно 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 15000, 20000, 25000, 30000, 35000, 40000, 45000, 50000, 55000, 60000, 65000, 70000, 75000, 80000, 85000, 90000, 95000, 100000, 105000, 110000, 115000, 120000, 125000, 130000, 135000, 140000, 145000, 150000, 160000, 170000, 180000,

190000, 200000, 250000, 300000 или более тромбоцитов на микролитр крови, или диапазон, охватывающий любые из вышеуказанных значений, или целое число между ними, относительно количества тромбоцитов на исходном уровне до генной терапии или по сравнению со средним количеством тромбоцитов у сопоставимых (например, соответствующих по возрасту и полу) контрольных пациентов с дефицитом GD1 или другой формой дефицита GСазы. В некоторых вариантах осуществления в последнем случае контрольные группы не получали стандартное лечение или получают стандартную терапию на основе ERT или SRT. В некоторых неограничивающих вариантах осуществления количество тромбоцитов на исходном уровне у пациентов с GD1, не получавших стандартное лечение, или пациентов с GD1, получающих стандартную терапию на основе ERT или SRT, не превышает, или является меньшим, или составляет приблизительно 350000, 300000, 250000, 200000, 150000, 100000, 90000, 80000, 70000, 60000, 50000, 40000 или 30000 на мкл крови или меньше, или диапазон, охватывающий любые из вышеуказанных специально перечисленных значений, или целое значение между ними. В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии.

[00174] Одним из последствий снижения количества тромбоцитов является увеличение времени кровотечения до образования кровяного сгустка, что может привести к чрезмерному кровотечению у пациентов с GD1 или другой формой дефицита GСазы, например, слизисто-кожному кровотечению, например, носовому кровотечению, кровоточивости десен или меноррагии, или послеоперационному кровотечению, кровотечению во время родов и спонтанным гематомам. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению для лечения GD1 или других форм дефицита GСазы являются эффективными для уменьшения времени кровотечения. Время кровотечения можно измерить с использованием любого известного в данной области техники способа, например, так называемого способа Айви, при котором нормальное время кровотечения составляет менее 8 минут, или способа Дьюка, при котором нормальное время кровотечения составляет менее 3 минут. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления способы лечения являются эффективными для увеличения времени кровотечения от более 8 минут, как определено с использованием способа Айви, до времени менее 8 минут или являются эффективными для увеличения времени кровотечения от более 3 минут, как определено с использованием способа Дьюка, до времени менее 3 минут. В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии.

Лейкопения

[00175] В некоторых вариантах осуществления способы лечения дефицита GСазы,

включая болезнь Гоше типа 1 (GD1), с помощью векторов на основе AAV по настоящему изобретению (включая без ограничения вектор, описанный в данном документе как AAV3B-GVA клон 128) являются эффективными для снижения заболеваемости, частоты или степени тяжести лейкопении, более низкого, чем нормальное, числа лейкоцитов, часто определяемого как менее 4000 лейкоцитов на микролитр (мкл) крови, и ассоциированных с этим рисков, включая повышенную восприимчивость к инфекциям. В некоторых вариантах осуществления лечение является эффективно для снижения у пациентов с GD1 частоты или выраженности лейкопении в течение периода времени после введения векторов на основе AAV по настоящему изобретению, составляющего самое большее, или по меньшей мере, или приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 или 180 дней, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 месяцев, или 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 или 6,0 лет или диапазон времени между любыми из вышеуказанных перечисленных периодов времени и включая их.

[00176] В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению для лечения GD1 приводят к увеличению количество лейкоцитов как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1, например, от менее 1900/мкл крови до большего числа, например, от 1900/мкл до 2500/мкл или от 2500/мкл до 4000/мкл или количества лейкоцитов, превышающего 4000/мкл крови. В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии.

[00177] В некоторых вариантах осуществления способы лечения являются эффективными для повышения количества лейкоцитов на микролитр крови как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1 до уровня по меньшей мере или приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110% или больше от среднего количества лейкоцитов у здоровых людей, которое в некоторых вариантах осуществления может находиться в диапазоне от 4000/мкл до 11000/мкл крови. В некоторых вариантах осуществления эталоном нормы является другое значение, например, приблизительно 4000/мкл, 4500/мкл, 5000/мкл, 5500/мкл, 6000/мкл, 6500/мкл, 7000/мкл, 7500/мкл, 8000/мкл, 8500/мкл, 9000/мкл, 9500/мкл, 10000/мкл, 10500/мкл или 11000/мкл крови или диапазон, охватывающий любые из вышеуказанных специально перечисленных значений, или целое число между ними. В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии.

[00178] В некоторых вариантах осуществления способы лечения являются эффективными для повышения количества лейкоцитов на микролитр крови пациентов с

GD1, как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1 на по меньшей мере или приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110% или больше относительно количества лейкоцитов на исходном уровне до генной терапии или по сравнению со средним значением количества лейкоцитов у сопоставимых (например, соответствующих по возрасту и полу) контрольных пациентов с GD1 или другой формой дефицита GСазы. В некоторых вариантах осуществления в последнем случае контрольные группы не получали стандартное лечение или получают стандартную терапию на основе ERT или SRT. В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии.

Уровни GСазы в клетках

[00179] В некоторых вариантах осуществления способы лечения дефицита GСазы, включая болезнь Гоше типа 1 (GD1), с помощью векторов на основе AAV по настоящему изобретению (включая без ограничения вектор, описанный в данном документе как AAV3B-GBA клон 128) являются эффективными для увеличения количества белка и/или ферментативной активности GСазы в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC), моноцитах, общих лейкоцитах, культивируемых фибробластах или других типах клеток от пациента с GD1 или другой формой дефицита GСазы. В некоторых вариантах осуществления лечение является эффективным для увеличения количества белка и/или ферментативной активности GСазы в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC), общих лейкоцитах, культивируемых фибробластах или других типах клеток от пациента с GD1 или другой формой дефицита GСазы в течение периода времени после введения вектора на основе AAV по настоящему изобретению, составляющего самое большее, или по меньшей мере, или приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 или 180 дней, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 месяцев, или 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 или 6,0 лет или диапазон времени между любыми из вышеуказанных перечисленных периодов времени и включая их. Способы количественного определения количества белка или ферментативной активности GСазы в PBMC субъекта до или после лечения или у здорового человека, служащего в качестве контроля, известны в данной области техники. См., например, Ysselstein, D, et al., *Movement Disorders* 36(12):2719-2730 (2021) (DOI:10.1002/mds.28815). Например, активность GСазы можно обнаружить и количественно определить с использованием флуорогенных субстратов, как дополнительно описано, например, в DOE: 10.1021/ja5106738 и DOI: 10.1021/ja5106738.

[00180] В некоторых вариантах осуществления способы лечения являются эффективными для повышения количества белка или ферментативной активности GСазы

в РМВС, моноцитах или лейкоцитах, полученных от пациентов с GD1, как отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1 до уровня по меньшей мере или приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110% или больше от среднего значения для GСазы в РМВС, моноцитах или лейкоцитах, полученных от здоровых людей. В некоторых вариантах осуществления среднее значение GСазы в РМВС, моноцитах или лейкоцитах здоровых людей находится в диапазоне от приблизительно 20 до 130 пикограммов на миллион (пг/1Е6) РМВС, или в среднем составляет приблизительно 70 пг/1Е6 клеток, или другое значение, например, приблизительно 30, 40, 50, 60, 80, 90, 100, 110 или 120 пг/1Е6 клеток, или диапазон, охватывающий любые из вышеуказанных специально перечисленных значений, или целое значение между ними. См., например, Berger, J, et al., Intra-monocyte Pharmacokinetics of Imiglucerase Supports a Possible Personalized Management of Gaucher Disease Type 1, Clin Pharmacokinet 58:469-482 (2019) (doi.org/10.1007/s40262-018-0708-8). В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии.

[00181] В некоторых вариантах осуществления способы лечения являются эффективными для повышения количества белка или ферментативной активности GСазы в РМВС, моноцитах или лейкоцитах, полученных от пациентов с GD1, как отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1 на по меньшей мере или приблизительно 25%, 50%, 75%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 225%, 250%, 300%, 400%, 500%, 700%, 800%, 900%, 1000% или больше относительно значения GСазы на исходном уровне в РМВС, моноцитах или лейкоцитах, полученных от такого пациента или пациентов до генной терапии, или по сравнению со средним значением GСазы в РМВС, моноцитах или лейкоцитах от сопоставимых (например, соответствующих по возрасту и полу) контрольных пациентов с GD1 или другой формой дефицита GСазы. В некоторых вариантах осуществления в последнем случае контрольные группы не получали стандартное лечение или получают стандартную терапию на основе ERT или SRT. В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии.

[00182] В некоторых вариантах осуществления способы являются эффективными для увеличения количества белка GСазы в РМВС, моноцитах или лейкоцитах, полученных от пациентов с GD1, как отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1 на по меньшей мере или приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 140, 150 пг/1Е6 или больше, или диапазон, охватывающий любые из вышеуказанных специально перечисленных значений, или целое значение

между ними относительно значения GСазы на исходном уровне в РВМС, моноцитах или лейкоцитах, полученных от такого пациента или пациентов до генной терапии, или по сравнению со средним значением GСазы в РВМС от сопоставимых (например, соответствующих по возрасту и полу) контрольных пациентов с GD1 или другой формой дефицита GСазы. В некоторых вариантах осуществления в последнем случае контрольные группы не получали стандартное лечение или получают стандартную терапию на основе ERT или SRT. В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии.

Гепатоспленомегалия

[00183] В некоторых вариантах осуществления способы лечения дефицита GСазы, включая болезнь Гоше типа 1 (GD1), с помощью векторов на основе AAV по настоящему изобретению (включая без ограничения вектор, описанный в данном документе как AAV3B-GBA клон 128) являются эффективными для снижения заболеваемости, частоты или степени тяжести увеличения размера или объема органов, в частности печени и селезенки. Объем печени или селезенки можно количественно определить с использованием таких методик визуализации, как магнитно-резонансная томография (MRI), рентгеновская компьютерная томография (СТ) или ультразвук. В некоторых вариантах осуществления нормальный размер печени может определяться как 2,5% от общей массы тела, а гепатомегалия может определяться как любое увеличение объема или массы печени (выводимой из объема) в более чем 1,25 раза от нормы (N). В некоторых вариантах осуществления нормальный размер селезенки может определяться как 0,2% от общей массы тела, а спленомегалия может определяться как любое увеличение объема или массы селезенки (выводимой из объема) в более чем 1 раз от нормы (N). В некоторых вариантах осуществления лечение является эффективным для снижения у пациентов с GD1 частоты или выраженности увеличенной печени или селезенки в течение периода времени после введения векторов на основе AAV по настоящему изобретению, составляющего самое большее, или по меньшей мере, или приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 или 180 дней, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 месяцев, или 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 или 6,0 лет или диапазон времени между любыми из вышеуказанных перечисленных периодов времени и включая их.

[00184] В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению для лечения GD1 способны приводить к уменьшению объема печени как отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1, например, от объема, превышающего норму в 2,5 раза (или кратно этому) ($> 2,5 MN$), до объема от 1,25 MN до 2,5 MN или до объема менее 1,25 MN (что считается отсутствием гепатомегалии). В некоторых вариантах осуществления способы лечения являются эффективными для уменьшения объема печени

как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1 до значения не более, менее или приблизительно 4,0, 3,9, 3,8, 3,7, 3,6, 3,5, 3,4, 3,3, 3,2, 3,1, 3,0, 2,9, 2,8, 2,7, 2,6, 2,5, 2,4, 2,3, 2,2, 2,1, 2,0, 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1,0, 0,9, 0,8, 0,7 MN или меньшего объема, или диапазона, охватывающего любые из вышеуказанных специально перечисленных значений, или целого значения между ними. В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии.

[00185] В некоторых вариантах осуществления способы лечения являются эффективными для уменьшения объема печени у пациентов с GD1, как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1 на по меньшей мере или приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 50% или больше по сравнению с объемом печени до генной терапии или по сравнению со средним объемом печени у сопоставимых (например, соответствующих по возрасту и полу) контрольных пациентов с GD1 или другой формой дефицита GCase. В некоторых вариантах осуществления в последнем случае контрольные группы не получали стандартное лечение или получают стандартную терапию на основе ERT или SRT. В некоторых неограничивающих вариантах осуществления размер печени у пациентов с GD1, не получавших стандартное лечение, или пациентов с GD1, получающих стандартную терапию на основе ERT или SRT, находится в диапазоне от приблизительно 0,8 до 6 MN, или от 1 до 5 MN, или от 1,5 до 5 MN, или имеет другое значение, например, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5 или 5,0 MN, или диапазон, охватывающий любые из вышеуказанных специально перечисленных значений, или целое значение между ними. В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии. В других вариантах осуществления способы по настоящему изобретению для лечения GD1 способны приводить к снижению частоты или выраженности патологии печени, включая фиброз печени или портальную гипертензию.

[00186] В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению для лечения GD1 способны приводить к уменьшению объема селезенки как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1, например, от объема, превышающего норму в более чем 15 раз (или кратно этому) (> 15 MN), до объема от 10 MN до 15 MN, или от 5 MN до 9 MN, или до объема менее 5 MN. В некоторых вариантах осуществления способы лечения являются эффективными для уменьшения объема селезенки как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение

пациентов с GD1 до значения не более, менее или приблизительно 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18,5, 18,0, 17,5, 17,0, 16,5, 16,0, 15,5, 15,0, 14,5, 14,0, 13,5, 13,0, 12,5, 12,0, 11,5, 11,0, 10,5, 10,0, 9,5, 9,0, 8,5, 8,0, 7,5, 7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,5, 4,0, 4,0, 3,9, 3,8, 3,7, 3,6, 3,5, 3,4, 3,3, 3,2, 3,1, 3,0, 2,9, 2,8, 2,7, 2,6, 2,5, 2,4, 2,3, 2,2, 2,1, 2,0, 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1,0, 0,9, 0,8, 0,7 MN или меньшего объема, или диапазона, охватывающего любые из вышеуказанных специально перечисленных значений, или целого значения между ними. В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии.

[00187] В некоторых вариантах осуществления способы лечения являются эффективными для уменьшения объема селезенки у пациентов с GD1, как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1 на по меньшей мере или приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% или больше по сравнению с объемом селезенки до генной терапии или по сравнению со средним объемом селезенки у сопоставимых (например, соответствующих по возрасту и полу) контрольных пациентов с GD1 или другой формой дефицита GСазы. В некоторых вариантах осуществления в последнем случае контрольные группы не получали стандартное лечение или получают стандартную терапию на основе ERT или SRT. В некоторых неограничивающих вариантах осуществления размер селезенки у пациентов с GD1, не получавших стандартное лечение, или пациентов с GD1, получающих стандартную терапию на основе ERT или SRT, находится в диапазоне от приблизительно 0,8 до 60 MN, или от 1 до 50 MN, или от 5 до 50 MN, или имеет другое значение, например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 MN, или диапазон, охватывающий любые из вышеуказанных специально перечисленных значений, или целое значение между ними. В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии. В других вариантах осуществления способы по настоящему изобретению для лечения GD1 способны приводить к снижению частоты или выраженности поражений селезенки, обнаруживаемых с использованием визуализации, такой как MRI или ультразвук, или снижению частоты спленэктомии в популяции пациентов с GD1, получавших лечение, по сравнению с пациентами с GD1, не получавшими лечение.

Костные проявления

[00188] В некоторых вариантах осуществления способы лечения дефицита GСазы,

включая болезнь Гоше типа 1 (GD1), с помощью векторов на основе AAV по настоящему изобретению (включая без ограничения вектор, описанный в данном документе как AAV3B-GVA клон 128) являются эффективными для снижения заболеваемости, частоты или степени тяжести костных проявлений патологического процесса, включая костный кризис, боль в костях, инфильтрацию костного мозга клетками Гоше, снижение минеральной плотности костей, а также возникновение литических поражений, переломов и аваскулярного некроза. В некоторых вариантах осуществления лечение является эффективным для снижения у пациентов с GD1 частоты или выраженности костных проявлений патологического процесса в течение периода времени после введения векторов на основе AAV по настоящему изобретению, составляющего самое большее, или по меньшей мере, или приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 или 180 дней, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 месяцев, или 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 или 6,0 лет, или диапазон времени между любыми из вышеуказанных перечисленных периодов времени и включая их.

[00189] Костный кризис при GD1 часто проявляется внезапным возникновением мучительной боли, ассоциированной с отеком и эритемой, лихорадкой и лейкоцитозом, после чего кость часто серьезно повреждается, так что может произойти перелом с последующим вторичным дегенеративным остеоартритом. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению для лечения GD1 приводят к снижению частоты костных кризисов за 12-месячный период как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1, например, от 2 или более событий костного кризиса до 1 или 0 событий за 12-месячный период. В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии.

[00190] Даже при отсутствии костного кризиса пациенты с GD1 часто испытывают боли в костях, которые могут варьироваться от легких до чрезвычайно сильных. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению для лечения GD1 приводят к снижению максимальной степени боли, испытываемой за 30-дневный период, как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1, от чрезвычайно сильной до сильной, умеренной, легкой, очень легкой или отсутствия боли, или от сильной до умеренной, легкой, очень легкой или отсутствия боли, или от умеренной до легкой, очень легкой или отсутствия боли, или от легкой до очень легкой или отсутствия боли, или от очень легкой до отсутствия боли. В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии. Максимальную боль, испытываемую

пациентом с GD1 за 30-дневный период, можно оценить с использованием стандартной шкалы боли.

[00191] Одним из межклеточных пространств, в которые инфильтрируют клетки Гоше, является костный мозг, нагрузку на который можно количественно определить с помощью стандартных способов, таких как магнитно-резонансная томография или сцинтиграфия. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению для лечения GD1 приводят к снижению частоты и выраженности инфильтрации костного мозга клетками Гоше, как определено с использованием одной или нескольких стандартных систем оценки, как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1. Таким образом, например, лечение пациентов с GD1 с использованием векторов на основе AAV по настоящему изобретению в некоторых вариантах осуществления способно снижать инфильтрацию костного мозга по шкале Розенталя с показателя, превышающего 7, например, от 8 до 11, до более низкого значения, например, от 4 до 7 или от 1 до 3, или значения 0. В других вариантах осуществления лечение приводит к снижению инфильтрации костного мозга по шкале Дюссельдорф с показателя, превышающего 6, например, 7 или 8, до более низкого значения, такого как от 4 до 6 или от 1 до 3 или значения 0. В других вариантах осуществления лечение приводит к снижению инфильтрации костного мозга по шкале Терка с показателя, превышающего 2a/b, например 3a/b, до более низкого значения, например 2a/b, или до 1a/b, или до значения 0. В других вариантах осуществления лечение приводит к снижению инфильтрации костного мозга по шкале отношения межпозвонкового диска (VDR) от показателя менее 1,0 до более высокого значения, например, от 1,0 до 1,5 или от 1,5 до 2,0 или значения более 2,0. В других вариантах осуществления лечение приводит к снижению инфильтрации костного мозга согласно нагрузке на костный мозг (ВМВ) от показателя, превышающего 12, например, 13-16, до более низкого значения, например, 8-12, или 3-7, или 0-2. В других вариантах осуществления лечение приводит к снижению инфильтрации костного мозга по шкале количественного индекса химического сдвига (QCSI) для жировой фракции от показателя менее 0,20 до более высокого значения, например, от 0,20 до 0,25 или от 0,25 до 0,30, или значения более 0,30. В других вариантах осуществления лечение приводит к снижению инфильтрации костного мозга по испанской шкале MRI от показателя, превышающего 17, например, 18-24, до более низких значений, например, 11-17, или 5-10, или 0-4. В других вариантах осуществления лечение приводит к снижению инфильтрации костного мозга по шкале ^{99m}Tc -сестамиби от показателя, превышающего 6, например, 7-8, до более низкого значения, например, 5-6, или 3-4, или 0-2. В других вариантах осуществления лечение приводит к снижению инфильтрации костного мозга по шкале ^{99m}Tc -радиоколлоида в сравнении с нормальной сцинтиграфической картиной от тяжелой до умеренной, легкой или нормальной, или от умеренной до легкой или нормальной, или от легкой до нормальной. В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как описано в

данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии. Более подробную информацию о шкалах оценки инфильтрации костного мозга можно найти, например, в Rosenthal DI, et al., *J Bone Joint Surg Am* 68:802-8 (1986); Poll LW, et al., *Skeletal Radiol* 9:496-503 (2001); Terk MR, et al., *Skeletal Radiol* 29:563-71 (2000); Vlieger EJ, et al., *J Comput Assist Tomogr* 26:843-8 (2002); Maas M, et al., *Radiology* 229:554-61 (2003); Poll LW, et al., *Blood Cells Mol Dis* 28:209-20 (2002).

[00192] Снижение минеральной плотности костной ткани (BMD) является еще одним костным проявлением болезни Гоше, которое может быть устранено, по меньшей мере частично, за счет лечения с помощью векторов на основе AAV по настоящему изобретению, что количественно определяется с использованием таких методик, как двухэнергетическая рентгеновская абсорбциометрия (DEXA), и выражается в виде показателя T или Z (отражающего стандартное отклонение BMD по сравнению со средним значением у молодого взрослого человека или контрольной группой соответствующего возраста и пола соответственно). Таким образом, например, в некоторых вариантах осуществления способы лечения GD1 по настоящему изобретению способны приводить к увеличению как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1 показателя Z от значения менее -1,5 до значения более -1,5, например, от -1,5 до -1,0, или от -1,0 до 0,0, или от 0,0 до +1,0. В качестве альтернативы в некоторых других вариантах осуществления способы лечения GD1 по настоящему изобретению способны приводить к увеличению как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1 показателя T от значения менее -2,5 до значения более -2,5, например, от -2,5 до -1,0, или от -1,0 до 0,0, или до значения более 0,0. В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии.

[00193] В других вариантах осуществления лечение пациентов с GD1 с помощью векторов на основе AAV по настоящему изобретению является эффективным для снижения частоты или выраженности как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1 других костных проявлений патологического процесса, включая остеонекроз, остеолитический некроз, инфаркт костного мозга, постоянные деформации, возникающие в результате переломов позвонков, вторичную артропатию, проявление деформации в виде колбы Эрленмейера, снижение потребления опиоидных и неопиоидных анальгетиков, необходимость замены суставов и, у детей, задержки роста (например, период времени, в течение которого рост остается ниже 5^{-го} перцентиля). В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии.

Биомаркеры тканей и плазмы крови

[00194] Метаболические нарушения, вызванные болезнью Гоше или дефицитом GСазы в более широком смысле, могут привести к значительному повышению уровня определенных белков и гликолипидов в клетках и тканях или в кровотоке. Некоторые из этих продуктов сверхэкспрессируются клетками Гоше, а некоторые являются побочными продуктами неполного расщепления GlcCer в лизосомах из-за дефицита активности GСазы. После лечения пациентов с GD1, как с использованием стандартного лечения, так и генной терапии, можно наблюдать снижение уровней этих продуктов и побочных продуктов, которые могут служить биомаркерами, указывающими на терапевтическую эффективность. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления способы лечения дефицита GСазы, включая болезнь Гоше типа 1 (GD1), с помощью векторов на основе AAV по настоящему изобретению (включая без ограничения вектор, описанный в данном документе как AAV3B-GBA клон 128) являются эффективными для снижения уровней биомаркеров, которые повышены у субъектов с GD1 или дефицитом GСазы в более широком смысле. В некоторых вариантах осуществления количественное определение изменений уровней биомаркеров у субъектов после лечения с помощью векторов на основе AAV по настоящему изобретению является показателем степени терапевтической эффективности.

Побочные продукты метаболизма, включая глюкозилсфингозин

[00195] В результате дефицита GСазы, как при GD1, уровни GlcCer в клетке увеличиваются, и он становится доступным в качестве субстрата для других ферментов, продуцирующих токсичные побочные продукты, уровни которых могут быть снижены после лечения согласно способам, раскрытым в данном документе. Например, при повышенном анаболизме GlcCer гликозилтрансферазами могут образоваться сложные ганглиозиды, включая GM3, которые можно обнаружить в плазме крови и селезенке у пациентов с GD1. См., например, DOI: 10.1016/j.cca.2007.12.001. Фермент β -глюкозидаза (GBA2) также может воздействовать на GlcCer с повышением уровня Cer, проапоптотической молекулы, а также переносить глюкозу с GlcCer на холестерин с образованием гликозил- β -холестерина (GlcChol). См., например, DOI: 10.1194/jlr.M064923; DOI: 10.1016/j.cbpa.2019.10.006. Кроме того, GlcCer, накапливающийся в лизосомах, преобразуется лизосомальной кислой церамидазой в его сфингоидное основание, глюкозилсфингозин (GlcSph; также известный как лизо-GL1, лизо-GB1, глюкосфингозин, сфингозил β -глюкозид, глюкопсихозин), что, по некоторым данным, может привести в среднем к 200-кратному увеличению уровня этого побочного продукта в плазме крови у не получавших лечение пациентов с симптомами GD1. См., например, DOI: 10.1002/1873-3468.12104; DOI: 10.1182/blood-2011-05-352971. В данной области техники известны способы количественного определения уровней GM3, Cer, GlcChol и GlcSph в образце плазмы, сыворотки крови или ткани от субъекта до или после лечения, или здорового человека, служащего в качестве контроля. Способы обнаружения и количественного определения GlcSph, например, с использованием анализа LC/MS-MS,

описаны в Rolfs, A, et al., PLOS One 8(11):e79732 (2013); Murugesan, V, et al., Am. J. Hematol. 91:1082-1089 (2016) (DOI:10.1002/ajh.24491); Beasley, J, et al., Clinica Chimica Acta 511:132-137 (2020) (doi.org/10.1016/j.cca.2020.10.007); Stiles, AR, et al., Mol Genetics Metabol Rep 27:100729 (2021) (doi.org/10.1016/j.ymgmr.2021.100729). В некоторых вариантах осуществления концентрацию глюкозилсфингозина можно выразить в единицах нанограммов на миллилитр (нг/мл) образца плазмы, сыворотки крови или гомогенизированной ткани.

[00196] В некоторых вариантах осуществления способы лечения дефицита GСазы, включая GD1, с помощью векторов на основе AAV по настоящему изобретению (включая без ограничения вектор, описанный в данном документе как AAV3B-GBA клон 128) являются эффективными для снижения количества побочного продукта, продуцируемого из GlcCer, включая GM3, Cer, GlcChol или глюкозилсфингозин, в образце сыворотки, плазмы крови или гомогенизированной ткани, полученном от пациента с GD1 или другой формой дефицита GСазы. В некоторых вариантах осуществления лечение является эффективным для снижения количества GM3, Cer, GlcChol или глюкозилсфингозина в образце сыворотки, плазмы крови или гомогенизированной ткани, полученном от прошедших лечение пациентов, в течение периода времени после введения вектора на основе AAV по настоящему изобретению, составляющего самое большее, или по меньшей мере, или приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 или 180 дней, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 месяцев, или 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 или 6,0 лет или диапазон времени между любыми из вышеуказанных перечисленных периодов времени и включая их.

[00197] В некоторых вариантах осуществления способы лечения являются эффективными для снижения количества GM3, Cer или GlcChol в образце сыворотки, плазмы крови или гомогенизированной ткани, полученном от пациентов с GD1, как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1 на по меньшей мере или приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% по сравнению со средними количествами GM3, Cer или GlcChol в образце сыворотки, плазмы крови или гомогенизированной ткани, полученном от такого пациента или пациентов до генной терапии, или по сравнению со средним количеством GM3, Cer или GlcChol в образце сыворотки, плазмы крови или гомогенизированной ткани от сопоставимых (например, соответствующих по возрасту и полу) контрольных пациентов с GD1 или другой формой дефицита GСазы. В некоторых вариантах осуществления в последнем случае контрольные группы не получали стандартное лечение или получают стандартную терапию на основе ERT или SRT. В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT

или SRT до генной терапии.

[00198] В некоторых вариантах осуществления способы лечения являются эффективными для снижения количества глюкозилсфингозина в образце сыворотки, плазмы крови или гомогенизированной ткани, полученном от пациентов с GD1, как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1, на по меньшей мере или приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% по сравнению со средними количествами глюкозилсфингозина в образце сыворотки, плазмы крови или гомогенизированной ткани, полученном от такого пациента или пациентов до генной терапии, или по сравнению со средним количеством глюкозилсфингозина в образце сыворотки, плазмы крови или гомогенизированной ткани от сопоставимых (например, соответствующих по возрасту и полу) контрольных пациентов с GD1 или другой формой дефицита GCase. В некоторых вариантах осуществления в последнем случае контрольные группы не получали стандартное лечение или получают стандартную терапию на основе ERT или SRT. В некоторых вариантах осуществления количество глюкозилсфингозина, присутствующего в образце сыворотки, плазмы крови или гомогенизированной ткани у пациентов с GD1, не получавших стандартное лечение, или у пациентов с GD1, получающих стандартную терапию на основе ERT или SRT, находится в диапазоне от приблизительно 3 нг/мл до 1000 нг/мл, от 4 нг/мл до 600 нг/мл, от 10 нг/мл до 500 нг/мл, от 20 нг/мл до 400 нг/мл, от 50 нг/мл до 300 нг/мл, от 100 нг/мл до 300 нг/мл или от 140 нг/мл до 220 нг/мл, или составляет в среднем приблизительно 180 нг/мл, или имеет другое значение, такое как приблизительно 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 320, 325, 340, 350, 360, 375, 380, 400, 425, 440, 450, 460, 475, 480, 500, 525, 540, 550, 560, 575, 580, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1500 или 2000 нг/мл, или диапазон, охватывающий любые из вышеуказанных специально перечисленных значений, или целое значение между ними. В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии.

[00199] В некоторых вариантах осуществления способы лечения являются эффективными для снижения количества глюкозилсфингозина в образце сыворотки, плазмы крови или гомогенизированной ткани, полученном от пациентов с GD1, как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1, до значения не более, менее или приблизительно 1500, 1000, 900, 800, 750, 700, 650, 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 240, 230, 225, 220, 215, 210, 205, 200, 195, 190, 185, 180, 175, 170, 165, 160, 155, 150, 145, 140, 135, 130, 125, 120, 115, 110, 105, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1,5 или 1 нг/мл образца сыворотки, плазмы крови или гомогенизированной ткани, или

диапазона, охватывающего любые из вышеуказанных специально перечисленных значений, или целого значения между ними. В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии.

Хитотриозидаза

[00200] К числу белков, которые сверхэкспрессируются и секретируются в кровотоке клетками Гоше при GD1, относится фермент хитотриозидаза, повышенный уровень которого служит биомаркером болезни Гоше. По некоторым данным активность хитотриозидазы может быть повышена в среднем в 1000 раз в плазме крови у не получавших лечение пациентов с симптомами GD1. Способы количественного определения уровней активности хитотриозидазы в образце плазмы, сыворотки крови или ткани субъекта до или после лечения или здорового человека, служащего в качестве контроля, известны в данной области техники, например, путем измерения количества флуоресцентного света, производимого при ферментативном расщеплении специфических искусственных флуорогенных субстратов, например, 4-метилумбеллиферил-хитотриозида, 4'-дезоксид-хитобиоза-4-метилумбеллиферона, 4-метилумбеллиферил- β -D-триацетилхитотриозидазы или других, известных в данной области техники. Дополнительную информацию об этом биомаркере см., например, в DOI: 10.1172/JCI117084; DOI: 10.1016/S0074-7696(06)52001-7; DOI: 10.1074/jbc.M301804200; DOI: 10.1016/j.cbpa.2019.10.006; DOI: 10.1007/s10545-014-9711-x. В некоторых вариантах осуществления активность хитотриозидазы может выражаться в виде массы на объем флуорогенного субстрата, который расщепляется за час, или в единицах наномолей на миллилитр в час (нмоль/мл/час).

[00201] В некоторых вариантах осуществления способы лечения дефицита GCase, включая болезнь Гоше типа 1 (GD1), с помощью векторов на основе AAV по настоящему изобретению (включая без ограничения вектор, описанный в данном документе как AAV3B-GBA клон 128) являются эффективными для снижения количества белка и/или ферментативной активности хитотриозидазы в сыворотке или плазме крови, полученной от пациента с GD1 или другой формой дефицита GCase. В некоторых вариантах осуществления лечение является эффективным для снижения количества белка и/или ферментативной активности хитотриозидазы в сыворотке или плазме крови, полученной от прошедших лечение пациентов, в течение периода времени после введения векторов на основе AAV по настоящему изобретению, составляющего самое большее, или по меньшей мере, или приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 или 180 дней, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 месяцев, или 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 или 6,0 лет или диапазон времени между любыми из вышеуказанных перечисленных периодов времени и включая их.

[00202] В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему

изобретению для лечения GD1 способны приводить к снижению величины ферментативной активности хитотриозидазы в сыворотке или плазме крови как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1, например, от более 15000 нмоль/мл/ч до более низкого значения, например, 4000-15000 нмоль/мл/ч, или 600-4000 нмоль/мл/ч, или до значения менее 600 нмоль/мл/ч. В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии.

[00203] В некоторых вариантах осуществления способы лечения являются эффективными для снижения величины ферментативной активности хитотриозидазы в сыворотке или плазме крови, полученной от пациентов с GD1, как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1, на по меньшей мере или приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% по сравнению со средними величинами ферментативной активности хитотриозидазы в сыворотке или плазме крови, полученной от такого пациента или пациентов до генной терапии, или по сравнению со средним количеством ферментативной активности хитотриозидазы в сыворотке или плазме крови от сопоставимых (например, соответствующих по возрасту и полу) контрольных пациентов с GD1 или другой формой дефицита GCase. В некоторых вариантах осуществления в последнем случае контрольные группы не получали стандартное лечение или получают стандартную терапию на основе ERT или SRT. В некоторых вариантах осуществления величина ферментативной активности хитотриозидазы в сыворотке или плазме крови пациентов с GD1, не получавших стандартное лечение, или пациентов с GD1, получающих стандартную терапию на основе ERT или SRT, находится в диапазоне от приблизительно 200 до 100000 нмоль/мл/ч, от 400 до 80000 нмоль/мл/ч, от 1000 до 50000 нмоль/мл/ч, от 2000 до 40000 нмоль/мл/ч, от 4000 до 20000 нмоль/мл/ч или от 5000 до 15000 нмоль/мл/ч, или имеет другое значение, например, приблизительно 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 11000, 12000, 13000, 14000, 15000, 16000, 17000, 18000, 19000, 20000, 25000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000 или 80000 нмоль/мл/ч, или диапазон, охватывающий любые из вышеуказанных специально перечисленных значений, или целое значение между ними. В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии.

[00204] В некоторых вариантах осуществления способы лечения являются эффективными для уменьшения величины ферментативной активности хитотриозидазы в сыворотке или плазме крови, полученной от пациентов с GD1, как у отдельных пациентов

с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1, до значения не более, менее или приблизительно 25000, 20000, 19000, 18000, 17000, 16000, 15000, 14000, 13000, 12000, 11000, 10000, 9000, 8000, 7000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 нмоль/мл/ч или меньше, или диапазона, охватывающего любые из вышеуказанных специально перечисленных значений, или целого значения между ними. В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии.

CCL18-PARC

[00205] Другим белком-биомаркером, продуцируемым и секретируемым клетками Гоше, является хемокин CCL18/PARC (хемокиновый (C-C мотив) лиганд 18; легочный и регулируемый активацией хемокин), уровень которого в плазме крови не получавших лечение пациентов с симптомами GD1 может быть повышен в 20-50 раз. В данной области техники известны способы количественного определения уровней CCL18/PARC в образце плазмы, сыворотки крови или ткани субъекта до или после лечения, или здорового человека, служащего в качестве контроля, например, с помощью ELISA с использованием специфических антител против белка. Дополнительную информацию об этом биомаркере см., например, в DOI: 10.1016/j.bbaliip.2013.11.004; DOI: 10.1182/blood-2003-05-1612.

[00206] В некоторых вариантах осуществления способы лечения дефицита GСазы, включая болезнь Гоше типа 1 (GD1), с помощью векторов на основе AAV по настоящему изобретению (включая без ограничения вектор, описанный в данном документе как AAV3В-GВА клон 128) являются эффективными для снижения количества CCL18 в сыворотке или плазме крови, полученной от пациента с GD1 или другой формой дефицита GСазы. В некоторых вариантах осуществления лечение является эффективным для снижения количества CCL18 в сыворотке или плазме крови, полученной от прошедших лечение пациентов, в течение периода времени после введения вектора на основе AAV по настоящему изобретению, составляющего самое большее, или по меньшей мере, или приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 или 180 дней, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 месяцев, или 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 или 6,0 лет или диапазон времени между любыми из вышеуказанных перечисленных периодов времени и включая их.

[00207] В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению для лечения GD1 способны приводить к снижению количества CCL18 в сыворотке или плазме крови как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1, например, от более 1000 нг/мл до более низкого значения, например, 237=1000 нг/мл, или 72-237 нг/мл, или до значения менее 72 нг/мл сыворотки или плазмы крови. В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как

описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии.

[00208] В некоторых вариантах осуществления способы лечения являются эффективными для снижения количества CCL18 в сыворотке или плазме крови, полученной от пациентов с GD1, как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1, на по меньшей мере или приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% по сравнению со средними количествами CCL18 в сыворотке или плазме крови, полученной от такого пациента или пациентов до генной терапии, или по сравнению со средним количеством CCL18 в сыворотке или плазме крови от сопоставимых (например, соответствующих по возрасту и полу) контрольных пациентов с GD1 или другой формой дефицита GCазы. В некоторых вариантах осуществления в последнем случае контрольные группы не получали стандартное лечение или получают стандартную терапию на основе ERT или SRT. В некоторых вариантах осуществления количество CCL18 в сыворотке или плазме крови у пациентов с GD1, не получавших стандартное лечение, или у пациентов с GD1, получающих стандартную терапию на основе ERT или SRT, находится в диапазоне от приблизительно 40 до 1500 нг/мл, от 100 до 1200 нг/мл, от 200 до 1000 нг/мл или от 400 до 800 нг/мл, или имеет другое значение, такое как приблизительно 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 320, 325, 340, 350, 360, 375, 380, 400, 425, 440, 450, 460, 475, 480, 500, 525, 540, 550, 560, 575, 580, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 или 1500 нг/мл, или диапазон, охватывающий любые из вышеуказанных специально перечисленных значений, или целое значение между ними. В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной терапии, как описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии.

[00209] В некоторых вариантах осуществления способы лечения являются эффективными для снижения количества CCL18 в сыворотке или плазме крови, полученной от пациентов с GD1, как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1, до значения не более, менее или приблизительно

[00210] 1500, 1400, 1300, 1200, 1100, 1000, 950, 900, 850, 800, 750, 700, 650, 600, 550, 500, 450, 400, 350, 325, 300, 275, 250, 240, 230, 225, 220, 215, 210, 205, 200, 195, 190, 185, 180, 175, 170, 165, 160, 155, 150, 145, 140, 135, 130, 125, 120, 115, 110, 105, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 нг/мл сыворотки или плазмы крови или меньше, или диапазона, охватывающего любые из вышеуказанных специально перечисленных значений, или целого значения между ними. В некоторых из этих вариантов осуществления пациенты с GD1 не получали стандартное лечение до генной

терапии, как описано в данном документе, тогда как в других вариантах осуществления пациенты с GD1 получали стандартную терапию на основе ERT или SRT до генной терапии.

Оценка степени тяжести болезни Гоше

[00211] В некоторых вариантах осуществления способы лечения болезни Гоше типа 1 (GD1) с помощью векторов на основе AAV по настоящему изобретению (включая без ограничения вектор, описанный в данном документе как AAV3B-GBA клон 128) являются эффективными для снижения степени тяжести болезни Гоше, как измерено с использованием индекса оценки степени тяжести болезни Гоше, при этом некоторые известны в данной области техники, как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1. Например, в некоторых вариантах осуществления способы лечения болезни Гоше, раскрытые в данном документе, являются эффективными для снижения степени тяжести болезни Гоше, определяемой с использованием индекса оценки степени тяжести Зимрана (SSI) (как описано в DOI: 10.1016/s0140-6736(89)90536-9 и Zimran A, et al., Gaucher disease. Clinical, laboratory, radiologic, and genetic features of 53 patients. *Medicine* 71:337-353 (1992)); определяемого с использованием индекса оценки степени тяжести болезни Гоше согласно Di Rosso и соавт. для пациентов с болезнью типа I (GauSS-I) (как описано в DOI: 10.3324/haematol.12379); или определяемого с использованием системы оценки степени тяжести болезни Гоше типа I согласно Weinreb и соавт. (GD-DS3) (как описано в Weinreb, NJ, et al., *Genetics Med* 12(1):44-51 (2010)), при этом возможно применение других индексов оценки степени тяжести. В некоторых вариантах осуществления лечение является эффективным для снижения у пациентов с GD1 степени тяжести болезни Гоше, как измерено с использованием индекса оценки степени тяжести болезни Гоше, в течение периода времени после введения векторов на основе AAV по настоящему изобретению, составляющего самое большее, или по меньшей мере, или приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 или 180 дней, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 месяцев, или 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 или 6,0 лет или диапазон времени между любыми из вышеуказанных перечисленных периодов времени и включая их.

[00212] В некоторых вариантах осуществления способы лечения болезни Гоше, раскрытые в данном документе, являются эффективными для снижения степени тяжести болезни Гоше от тяжелой до умеренной или легкой, или от умеренной до легкой, как определено с использованием индекса оценки Зимрана, или снижения оценки степени тяжести с использованием того же индекса от целого значения в диапазоне 26-51 балла до более низкого значения, например, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0, или от целого значения в диапазоне 11-25 баллов до более низкого значения, например, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 баллов. В некоторых вариантах осуществления способы лечения болезни Гоше, раскрытые в данном документе, являются эффективными для снижения степени тяжести болезни Гоше, как определено с

использованием индекса оценки GauSS-I согласно Di Rocco, от целого значения в диапазоне 1-42 баллов до более низкого значения, такого как 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 баллов. В некоторых вариантах осуществления способы лечения болезни Гоше, раскрытые в данном документе, являются эффективными для снижения степени тяжести болезни Гоше от тяжелой до выраженной, умеренной, легкой или пограничной, или от выраженной до умеренной, легкой или пограничной, или от умеренной до легкой или пограничной, или от легкой до пограничной, как определено с использованием индекса оценки GD-DS3 согласно Weinreb, или для снижения оценки степени тяжести с использованием того же индекса от целого значения в диапазоне 10-19 баллов до более низкого значения, например, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0, или от целого значения в диапазоне 6-9 баллов до более низкого значения, например, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0, или от целого значения в диапазоне 3-6 баллов до более низкого значения, например, 5, 4, 3, 2, 1 или 0, или от значения 3 балла до 2, 1 или 0, или от значения 2 балла до 1 или 0, или от значения 1 балл до 0.

Другие благоприятные эффекты лечения

[00213] В других вариантах осуществления лечение пациентов с GD1 с помощью векторов на основе AAV по настоящему изобретению (включая без ограничения вектор, описанный в данном документе как AAV3B-GBA клон 128) является эффективным как у отдельных пациентов с GD1, прошедших лечение, так и в среднем в популяции получивших лечение пациентов с GD1 для снижения частоты или выраженности других проявлений патологического процесса болезни Гоше, включая эндокринные и метаболические нарушения, неврологические симптомы и другие симптомы. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления способы лечения GD1, раскрытые в данном документе, являются эффективными для снижения частоты возникновения низкого аппетита, недостаточного веса, повышения базальной печеночной глюкозы, диабета 2 типа, низких уровней холестерина липопротеинов высокой плотности, периферической нейропатии, повышенного риска развития болезни Паркинсона, повышенного риска множественной миеломы и немиеломной болезни, инфильтрации легких клетками Гоше и ассоциированного легочного фиброза, рестриктивного легочного процесса, вызванного деформацией позвоночника, легочной артериальной гипертензии, дыхательной недостаточности, инфильтрации почечных клубочков клетками Гоше и ассоциированной протеинурии и гематурии, желто-коричневой гиперпигментации в результате вовлечения кожи, глазных проявлений и поражения миокарда или клапанов сердца.

Способы предупреждения

[00214] Среди других вариантов осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы предупреждения болезни Гоше, включая болезнь Гоше типа 1 (GD1), или другого типа дефицита GСазы путем введения субъекту, например, субъекту-человеку, нуждающемуся в предупреждении болезни Гоше (или дефицита GСазы),

профилактически эффективного количества вектора на основе AAV по настоящему изобретению (включая без ограничения вектор, описанный в данном документе как AAV3B-GBA клон 128) или фармацевтической композиции, содержащей такие векторы на основе AAV. Также предусмотрено применение вектора на основе AAV по настоящему изобретению в изготовлении лекарственного препарата для применения в способах профилактики, раскрытых в данном документе. Кроме того, предусмотрен вектор на основе AAV по настоящему изобретению или фармацевтическая композиция, содержащая такие векторы на основе AAV, для применения в способах профилактики, раскрытых в данном документе.

[00215] В некоторых вариантах осуществления введение субъекту профилактически эффективного количества вектора на основе AAV по настоящему изобретению (включая без ограничения вектор, описанный в данном документе как AAV3B-GBA клон 128) или фармацевтической композиции, содержащей такие векторы на основе AAV, является эффективным для предупреждения начала или появления у субъекта болезни Гоше; является эффективным для предупреждения начала или появления у субъекта любого вредоносного эффекта дефицита GСазы; является эффективным для предупреждения начала или появления у субъекта уменьшения величины активности GСазы; является эффективным для предупреждения начала или появления у субъекта по меньшей мере одного симптома или признака, ассоциированных с болезнью Гоше или дефицитом GСазы; является эффективным для предупреждения начала или появления у субъекта по меньшей мере одного нарушения или дисфункции организма, органа, ткани или клетки, вызванных болезнью Гоше или дефицитом GСазы; является эффективным для предупреждения начала или появления у субъекта любого снижения качества жизни, вызванного болезнью Гоше или дефицитом GСазы, которое в каждом случае иначе произошло бы в отсутствие профилактики.

[00216] В некоторых вариантах осуществления способов профилактики, описанных в данном документе, субъектом является субъект-человек с гомозиготной или гетерозиготной вредоносной мутацией в гене GBA, наличие которой определяется генотипированием до появления любого обнаруживаемого симптома или признака болезни Гоше или другого симптома или признака, ассоциированного с дефицитом GСазы. Способы генотипирования, такие как RFLP-анализ или геномное секвенирование, хорошо известны специалистам средней квалификации в данной области техники.

Композиции, составы, способы введения, дозировки векторов на основе AAV

[00217] В дополнение к векторам на основе AAV в настоящем изобретении предусмотрены композиции, содержащие такие векторы и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, разбавитель или носитель. Такие векторы могут применяться, среди прочего, в способах предупреждения и лечения GD1, также описанных в данном документе.

[00218] Композиции, содержащие векторы на основе AAV по настоящему

изобретению, могут обеспечиваться в виде водных растворов или суспензий, эмульсий и в других формах, таких как лиофилизированные таблетки. Композиции на основе векторов могут быть составлены с использованием любого подходящего разбавителя и вспомогательных веществ, которые могут быть необходимы для достижения требуемых свойств, таких как рН, ионная сила, тоничность, стабильность, срок хранения, устойчивость к циклам замораживания-оттаивания и возможность сублимационной сушки, а также с учетом способа введения. Примеры разбавителей и носителей включают без ограничения стерильную воду для инъекций, этанол и глицерин. Примеры вспомогательных веществ включают без ограничения соли, буферы, кислоты, основания, поверхностно-активные вещества, сахариды, сахарные спирты и многие другие, известные в данной области техники. Композиции, содержащие векторы на основе AAV по настоящему изобретению, для применения в предупреждении или лечении у субъекта заболевания или нарушения, такого как GD1, могут быть упакованы в любую подходящую форму, например, флаконы или предварительно заполненные шприцы. В некоторых вариантах осуществления наборы обеспечиваются несколькими флаконами, содержащими достаточное количество вектора для достижения требуемой общей дозы, подлежащей введению конкретному субъекту, которая определена на основе соответствующих переменных, таких как степень тяжести заболевания субъекта, масса тела, пол и другие.

[00219] Композиции, содержащие векторы на основе AAV по настоящему изобретению, можно вводить любым подходящим путем введения, неограничивающие примеры которых включают системное введение, введение непосредственно в ткань или орган, внутривенное введение, внутриартериальное введение, внутрилимфатическое введение, внутрибрюшинное введение, внутримышечное введение, интрапаренхиматозное введение, интратекальное введение, интрацеребровентрикулярное введение или интрацистернальное введение в большую цистерну, при этом возможны и другие способы. В некоторых вариантах осуществления, например, когда требуется, чтобы вектор на основе AAV нацеливался преимущественно на печень, композицию, содержащую такой вектор, можно вводить в воротную вену.

[00220] Композиции, содержащие векторы на основе AAV по настоящему изобретению, можно вводить отдельно, без каких-либо других видов терапии, или можно вводить одновременно, в одно время или с любым подходящим интервалом введения доз со стандартным лечением или каким-либо другим средством, соединением, лекарственным средством, методом лечения или терапевтической схемой. В некоторых вариантах осуществления композиции, содержащие векторы на основе AAV по настоящему изобретению, можно вводить после профилактики иммуносупрессором, например, стероидом или такролимусом, или другим иммуносупрессивным лекарственным средством, или иммуносупрессивные лекарственные средства можно вводить впоследствии для контроля любого гуморального и/или клеточного иммунного ответа на генную терапию.

[00221] Композиции на основе векторов могут содержать любое подходящее количество вектора на основе AAV, рассчитанное для доставки профилактически или терапевтически эффективного количества такого вектора субъекту в объеме, с которым легко обращаться или вводить субъекту, и/или ожидается, что оно не вызовет у субъекта никакого дискомфорта или нежелательных побочных эффектов.

[00222] В связи со способами предупреждения и лечения, предусмотренными настоящим изобретением, векторы на основе AAV и композиции, содержащие такие векторы, могут вводиться в любой подходящей дозе, прогнозируемой или определенной как эффективная для достижения требуемой степени предупреждения или лечения. В некоторых вариантах осуществления дозы вектора на основе AAV по настоящему изобретению для предупреждения или лечения болезни Гоше типа 1 могут быть количественно определены и выражены в виде геномов вектора (гв) на килограмм массы тела субъекта, сокращенно “гв/кг”. В некоторых вариантах осуществления иллюстративные эффективные дозы вектора на основе AAV по настоящему изобретению, включая, например, вектор на основе AAV, содержащий капсид AAV3B и геном, содержащий нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:17, включают без ограничения по меньшей мере или приблизительно 1×10^9 гв/кг, 1×10^{10} гв/кг, 1×10^{11} гв/кг, 1×10^{12} гв/кг, 1×10^{13} гв/кг, 1×10^{14} гв/кг или 1×10^{15} гв/кг, или любой диапазон доз между любыми из вышеуказанных специально перечисленных доз и включая их, при этом возможны и другие дозы.

* * *

[00223] Другие цели, признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из приведенного выше подробного описания. Однако следует понимать, что подробное описание и конкретные примеры, приведенные ниже, хотя и указывают на конкретные варианты осуществления настоящего изобретения, приведены только в качестве иллюстрации, поскольку различные изменения, модификации и эквиваленты в пределах сущности и объема настоящего изобретения будут очевидны для специалистов средней квалификации в данной области техники из подробного описания и примеров и попадают в объем прилагаемой формулы изобретения.

[00224] Если не указано иное, применение термина “или” при ссылке на один или несколько элементов из набора вариантов осуществления является эквивалентным по значению термину “и/или”, и не требуется, чтобы они были взаимоисключающими. Если не указано иное, несколько явно указанных числовых диапазонов также описывает диапазон, нижняя граница которого выводится из нижней или верхней границы любого одного из явно указанных диапазонов, а верхняя граница которого выводится из нижней или верхней границы любого другого из явно указанных диапазонов. Так, например, серия явно указанных диапазонов “10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 100-150, 200-250, 275-300” среди многих других также описывает диапазоны 10-50, 50-100, 100-200 и 150-250. Если не указано иное, применение термина “приблизительно” перед серией числовых значений или диапазонов предназначено для модификации не только значения или диапазона,

следующих непосредственно за ним, но и каждого значения или диапазона, следующих за ним в той же серии. Так, например, фраза “приблизительно 1, 2 или 3” эквивалентна “приблизительно 1, приблизительно 2 или приблизительно 3”.

[00225] Все публикации и ссылки, включая без ограничения статьи, рефераты, патенты, заявки на патент (опубликованные или неопубликованные) и биологические последовательности (включая без ограничения те, которые обозначены конкретными номерами ссылок в базе данных), цитируемые в данном документе, настоящим включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или ссылка была специально и индивидуально указана как включенная посредством ссылки. Любая заявка на патент, в отношении которой данная заявка прямо или косвенно заявляет приоритет, также включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00226] Если не указано иное, в приведенных ниже примерах описываются эксперименты, которые проводились или проводятся с использованием стандартных методов, хорошо известных и обычных для специалистов средней квалификации в данной области техники. Примеры являются иллюстративными и не ограничивают настоящее изобретение.

* * *

ПРИМЕРЫ

[00227] Следующие примеры, а также графические материалы включены для демонстрации предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения. Специалистам в данной области техники следует понимать, что методики, раскрытые в примерах или графических материалах, представляют собой методики, обнаруженные авторами настоящего изобретения для эффективного функционирования при реализации настоящего изобретения на практике, и, таким образом, могут рассматриваться как предпочтительные способы его реализации. Однако, в свете настоящего изобретения, специалисты в данной области техники должны понимать, что в конкретные раскрытые варианты осуществления можно вносить многочисленные изменения и при этом получать аналогичный или схожий результат, не выходя за рамки сущности и объема настоящего изобретения.

Пример 1

Разработка и продукция векторов на основе AAV для экспрессии GСазы

[00228] Разработали векторы на основе AAV, содержащие трансген для экспрессии бета-глокоцереброзидазы (GСазы) человека, и их продуцировали с использованием стандартных методик. Белок, экспрессируемый векторами, представляет собой полноразмерную GСазу человека дикого типа за исключением того, что нативную последовательность сигнального пептида секреции заменили последовательностью сигнального пептида секреции иммуноглобулина. Один геном вектора (клон 118) включал нативную человеческую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок hGСазы (исключая сигнальный пептид), тогда как трансген в другом геноме вектора (клон 128)

кодировал тот же белок, но был модифицирован для уменьшения числа мотивов CpG (66 мотивов CpG в клоне 128 по сравнению с 96 мотивами CpG в клоне 118). Оба генома содержали в порядке от 5' к 3': 5'-ITR из AAV2, две копии энхансерной области из гена предшественника альфа1-микроглобулина/бикунина (A1MB enh), одну копию проксимальной энхансерной области из гена альбумина человека (hALB), одну копию области корового промотора из гена hALB (hALB pro), одну копию интрона гена бета-глобина человека (который не прерывает кодирующую последовательность), кодирующую последовательность для сигнального пептида IgVH в рамке с кодирующей последовательностью для фермента GCазы (сигнальный пептид IgVH заменяет нативный сигнальный пептид), стоп-кодон, последовательность сигнала полиаденилирования (полиА) гена бычьего гормона роста (bGH) (т. е. терминатор), модифицированную последовательность интрона 2 TBP и 3'-ITR из AAV2.

[00229] Что касается генома вектора клона 128, полная последовательность которого представлена под SEQ ID NO:17 (включая оба ITR), номинальные номера начального и конечного нуклеотидов для каждого компонента генома изложены в следующей **таблице 1**.

Таблица 1

Компонент генома	Начальный нуклеотид в SEQ ID NO:17	Конечный нуклеотид в SEQ ID NO:17
5'-ITR	1	145
Энхансер A1MB	320	464
Проксимальный энхансер гена hALB	479	792
Коровый промотор hALB	793	1002
Интрон гена бета-глобина человека	1010	1859
Сигнальный пептид IgVH	1896	1952
Кодирующая последовательность hGCазы	1953	3446
полиА bGH	3454	3681
3'-ITR	4057	4202

[00230] Дополнительные полипептидные и нуклеотидные последовательности, относящиеся к описанным в данном документе векторам, изложены в **таблице последовательностей** ниже.

[00231] Для продуцирования векторных частиц клетки НЕК 293 в суспензионной культуре трансфицировали с использованием классического способа тройной трансфекции. Клетки НЕК 293 размножали из аликвоты банка рабочих клеток посредством нескольких пассажей, начиная с встряхиваемой колбы, через одноразовый биореактор Wave, и заканчивая одноразовым биореактором (SUB) в масштабе 250 л.

Клетки трансфицировали путем добавления смеси для трансфекции, содержащей PEI и три различные плазмиды: pHelper для экспрессии хелперных факторов AdV; pRepCap для экспрессии капсидных белков AAV3B и белков Rep AAV3B; а также плазмиду с трансгеном. После трансфекции в течение 3 часов осуществляли остановку трансфекции путем добавления среды CDM4 с последующим 72-часовым периодом инкубации, позволяющим клеткам продуцировать вектор на основе AAV. Вектор собирали за счет лизиса клеток с помощью Triton X-100, добавления домифена бромиды для флокуляции ДНК клетки-хозяина, фильтрации супернатанта и последующей очистки вектора на трех стадиях, включая аффинную хроматографию, анионообменную хроматографию и фильтрацию с тангенциальным потоком. После сбора и очистки векторы титровали с помощью количественной ПЦР, а затем тестировали *in vitro* и *in vivo* в отношении эффективности и токсичности.

Пример 2

Тестирование векторов GСазы на основе AAV *in vitro*

[00232] Эффективность двух векторов, содержащих геном клона 128, в одном из которых использовался капсид AAV3B (AAV3B-GBA клон 128), а в другом использовался капсид AAVDJ (AAVDJ-GBA клон 128), тестировали *in vitro* путем трансдукции клеток Huh7, линии клеток гепатомы человека, и измерения ферментативной активности GСазы в анализе с флуорогенными субстратами. Вектор с использованием капсида AAVDJ тестировали, поскольку известно, что капсид AAV3B трансдуцирует ткань печени мыши с низкой эффективностью, что потенциально искажает результаты экспериментов *in vivo*, описанных ниже. В клетках Huh7 оба вектора показали дозозависимое увеличение ферментативной активности GСазы в клетках Huh7 (**фиг. 1**).

Пример 3

Тестирование векторов GСазы на основе AAV на мышинной модели болезни Гоше типа 1

[00233] Эффективность генома вектора клона 128, доставляемого капсидами AAV3B и AAVDJ, тестировали на животной модели болезни Гоше типа 1 у трансгенных мышей D409V. У мышей с нокином D409V экспрессируется мутантный ген GBA мыши, который соответствует мутации D409V, обнаруженной в GСазе человека. Аналогично остаточному уровню GСазы, обнаруженному у пациентов с GD типа 1, активность GСазы у мышей D409V составляет ~10% от таковой у животных дикого типа (WT). Накопление сфинголипидов можно обнаружить в сыворотке крови и различных органах, включая печень и селезенку. Мышиная модель D409V дополнительно описана, например, в Xu, Y-H, et al., Viable Mouse Models of Acid β -Glucosidase Deficiency, *Am J Pathol.* 2003 Nov; 163(5): 2093-2101 (DOI: 10.1016/s0002-9440(10)63566-3); Sun, Y, et al., Gaucher disease mouse models: point mutations at the acid beta-glucosidase locus combined with low-level prosaposin expression lead to disease variants, *J Lipid Res.* 2005 Oct;46(10):2102-13 (DOI: 10.1194/jlr.M500202-JLR200).

[00234] Векторы, в которых капсиды AAV3B и AAVDJ инкапсулируют геном

вектора клона 128, могут обозначаться в данном документе как “AAV3B-GBA” и “AAVDJ-GBA” соответственно. В качестве альтернативы дозы вектора могут быть выражены с использованием экспоненциальной записи или E-записи. Так, например, доза “ 3×10^{12} гв/кг” означает то же самое, что и “3E12 гв/кг”.

Материалы и способы

Введение вектора и сбор образцов

[00235] Вектор AAV3B-GBA клона 128 (1E13 гв/кг) и AAVDJ-GBA клона 128 (1E12 гв/кг и 1E13 гв/кг) вводили в виде однократных доз внутривенной инъекцией через ретроорбитальный путь 5-месячным самцам гомозиготных по нокину D409V трансгенных мышей (Jackson Lab, кат. № 019106). В качестве отрицательного контроля 4 тестируемым животным того же типа вводили физиологический раствор. Для каждой дозы вектора использовали пять тестируемых животных. Двадцать восемь дней спустя тестируемых животных умертвили, а образцы сыворотки крови и тканей собрали и проанализировали. Образцы тканей быстро замораживали и хранили при температуре -80°C до применения. Для ИНС ткани фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине и готовили парафиновые срезы.

Выделение ДНК

[00236] Замороженные образцы тканей использовали для выделения ДНК с использованием способов экстракции ДНК фенолом/хлороформом. Замороженные образцы тканей перемалывали в замороженный сухой порошок с использованием измельчителя Covaris CP02 SugoPrep в соответствии с инструкциями производителя. Приблизительно 30 мг каждого замороженного порошка ткани переносили в новую пробирку и ресуспендировали в 292,5 мл лизирующего буфера TENS, содержащего 1% SDS. Затем в каждую пробирку добавляли 7,5 мл протеиназы К и инкубировали при температуре 56°C в термомиксере, встряхивая со скоростью 1000 об./мин в течение 3 часов и перемешивая в течение 15 секунд каждые 30 минут. Затем образцы охлаждали до комнатной температуры и обрабатывали РНКазой А в течение 5 минут. Каждый образец обрабатывали с помощью 300 мкл смеси фенол:хлороформ:изоамиловый спирт (25:24:1) и перемешивали в течение 20 секунд. Жидкость верхней фазы собирали для осаждения ДНК путем добавления 7,5 М NH_4OAc в объеме, составляющем приблизительно 0,5 объема верхней фазы, и добавления чистого этанола в объеме, составляющем 3 общих объема. Образцы охлаждали при -20°C в течение по меньшей мере 2 часов, после чего центрифугировали при 4°C в течение 30 минут при 16000 g. Осадок ДНК промывали ледяным 70% этанолом и ресуспендировали в воде, не содержащей нуклеаз. Концентрацию ДНК измеряли с помощью спектрофотометра Nanodrop.

Выделение РНК

[00237] Замороженный порошок ткани готовили, как описано в предыдущем разделе. Приблизительно 30 мг образца ткани использовали для гомогенизации в 1 мл Trizol в присутствии гранулы из нержавеющей стали диаметром 5 мм с использованием TissueLyzer II, установленного на частоту 25 1/с в течение 5 минут. Лизаты переносили в

пробирки для разделения фаз и добавляли 200 мкл хлороформа. Образцы встряхивали в течение 15 секунд, инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут и центрифугировали при 14000 g в течение 5 мин при 4°C. Прозрачный супернатант переносили в новую пробирку и обрабатывали с помощью мининабора для выделения РНК Purelink в соответствии с инструкциями производителя. Обработку ДНКазой проводили на колонке в течение 20 мин перед элюированием водой, не содержащей нуклеаз. Концентрацию РНК измеряли с использованием спектрофотометра Nanodrop.

Число копий генома вектора

[00238] Количественное определение VGC проводили с использованием ddPCR, использованием следующих последовательностей праймеров и зондов для амплификации трансгена GBA во всех образцах. В анализе ddPCR температура отжига составляла 60°C, последовательность праймера зонда представляла собой TTAGGAAAGGACAGTGGGAGTGGC (SEQ ID NO:43), последовательность прямого праймера представляла собой AATGCGATGCAATTCCTCATT (SEQ ID NO:44), последовательность обратного праймера представляла собой TGCCAGCCATCTGTTGTT (SEQ ID NO:45), флуорофором зонда был FAM, а гасителем был NFQ. ДНК разбавляли до 10 нг/мл. 20 мкл реакционной смеси для ПЦР, содержащей Supermix ddPCR, выделенную gDNA, праймеры GBA и зонды FAM (см. выше), праймеры конститутивного гена (ms)Tfrc и зонды VIC, готовили на рабочей станции Airclean 600 PCR, очищали с помощью DNAZap и добавляли в 96-луночный планшет для ddPCR. Капли получали с использованием генератора капель QX200. Планшеты герметизировали с помощью герметика для ПЦР-планшетов PX1. Программа ПЦР: 95°C в течение 10 мин □ [94°C в течение 30 с □ 60°C в течение 1 мин] (x40 циклов) □ 98°C в течение 10 мин □ завершали выдерживанием при 4°C. Количество и амплитуду капель регистрировали с использованием считывателя QX200 и анализировали с помощью программного обеспечения QuantaSoft для расчета числа копий ДНК. VGC, полученные из канала FAM, нормализуют по мкг gDNA ввода или сообщают как VGC на гаплоидный геном путем расчета отношения канала FAM к каналу VIC.

Экспрессия трансгена GBA

[00239] Образцы выделенной РНК подвергали обратной транскрипции для создания библиотеки cDNA с использованием набора для синтеза cDNA iScript (Bio-Rad, кат. № 1708891) в соответствии с протоколом производителя. В 20 мкл реакционной смеси использовали 500 нг общей РНК. Обратную транскрипцию проводили при 37°C в течение 60 минут, а затем при 95°C в течение 5 минут. Образцы cDNA хранили при температуре -20°C до анализа методом RT-PCR. Количественное определение экспрессии РНК трансгенов GBA проводили с использованием ddPCR с теми же праймерами и зондами GBA, которые описаны выше, а также с праймерами/зондами конститутивного гена MmHprt. Смесь для реакции ПЦР, содержащую Supermix ddPCR (без dUTP) и вышеуказанные праймеры/зонды, готовили на рабочей станции Airclean 600 PCR, очищали с помощью DNAZap и добавляли в 96-луночный планшет для ddPCR. Получение

капель, программы ПЦР и сбор данных выполняли, как описано выше. VGC нормализовали по мкг gDNA или количеству MmHprt.

Экспрессия белка GCазы согласно LC-MS/MS

[00240] Рекомбинантный белок GCазы человека, продуцируемый в тестируемых животных, обработанных вектором, обогащали из образцов сыворотки крови, РВМС и лизатов ткани печени и селезенки с помощью антитела, которое специфически связывает GCазу, а затем количественно определяли с помощью жидкостной хроматографии - тандемной масс-спектрометрии (LC-MS/MS). Срезы селезенки и печени готовили путем добавления объема M-PER+ингибитор протеазы для получения 100 мг/мл ткани в буфере, образцы обрабатывали с помощью шарикового измельчителя Next Advance в течение 7 минут. Образцы анализировали в различных объемах: 20 мкл сыворотки крови и 200 мкл лизата ткани в сравнении с суррогатной матрицей для стандартной кривой, содержащей 1% BSA в PBS с добавлением белка талиглуцеразы. Линейный диапазон анализа составил от 0,25 до 1000 нг/мл для образцов тканей и от 0,5 до 1000 нг/мл для образцов сыворотки крови. Проводили двойное IP с использованием 2 мкг антитела к GCазе+биотин и магнитных шариков со стрептавидином. Образцы обрабатывали на Thermo KingFisher Flex и элюировали с помощью 30 mM HCl+5% MeCl₂. Образцы доводили до pH 8,3 с помощью 1 M Tris-HCl, восстанавливали, алкилировали и расщепляли на протяжении ночи с использованием LysC-трипсин Promega. Образцы вводили в Thermo Altis MS или Sciex 6500E с использованием системы OptiFlow в объеме 85 мкл с использованием условий нанопотоковой LC с захватом и элюированием. Данные анализа LC-MS/MS получали либо с Sciex 6500 (SciexE) с использованием Analyst 1.7.1 с программным обеспечением для сбора данных HotFix 1, либо с Thermo Altis (Altis2) с использованием программного обеспечения для сбора данных Xcalibur 4.2.47. В частности, образцы сыворотки крови прогоняли на Sciex 6500E, а обработку данных выполняли с использованием программного обеспечения Sciex MultiQuant 3.0.3. Образцы тканей прогоняли на Altis2, а обработку данных образцов выполняли с использованием Skyline v. 21.1.0.146. Калибровочную кривую получали на основе соотношений площадей пиков аналитического пептида и пептида SIL, а концентрацию исследуемых образцов определяли путем обратного расчета соотношения площадей пиков в сравнении со стандартной кривой в обоих программных пакетах. Данные LC-MS/MS для лизата ткани нормализовали по весу общего белка.

Экспрессия белка GCазы согласно ICH

[00241] Парафиновые срезы окрашивали антителами к GCазе с использованием полностью автоматизированной системы окрашивания (Leica Biosystems Bond Rx). Вкратце, предметные стекла депарафинизировали и обрабатывали пероксидом в течение 10 минут. Затем предметные стекла промывали деионизированной водой и пермеабилizировали 0,3% раствором Triton в течение 1 часа перед инкубацией с первичным антителом к GCазе (Sigma-Aldrich) в течение 1 часа. Первичное антитело разводили в разбавителе для первичного антитела Bond в разведении 1:250. Затем

предметные стекла промывали и инкубировали во вторичном антителе (Leica, кат. № DS9800) в течение 8 минут. Наличие антител визуализируют путем инкубации с DAB (Leica, кат. № DS9800) в течение 10 минут. Наконец, предметные стекла промывали в воде и обезвоживали в батарее спиртов до ксилола перед покрытием покровным стеклом и визуализировали на сканере предметных стекол (Axio Scan Z1, Zeiss). Изображения воспроизводили с помощью программного обеспечения ZEN Blue.

Анализ активности GСазы

[00242] Замороженный порошок ткани готовили, как описано выше. Приблизительно 20 мг образцов тканей использовали для получения лизатов в присутствии шариков из нержавеющей стали в лизирующем буфере (цитратно-фосфатный буфер pH 5,4, содержащий 0,25% (вес/вес) таурохолата натрия, 0,25% Triton X-100 и ингибитор протеазы) с использованием Tissuelyzer II, установленного на частоту 25 1/с в течение ~8 минут. Концентрацию белка в лизате ткани измеряли с помощью набора для анализа белка BCA. В 96-луночном черном несвязывающем планшете 25 мкг лизата ткани, 10 мкл сыворотки крови или стандарт талиглюцеразы смешивали с 3 мМ синтетических субстратов GСазы (4-метилумбеллиферил β -D-глюкопиранозид) в 0,2 М растворе ацетата натрия (pH 4) при 37°C в течение 30 минут. Реакции ослабляли добавлением 0,7-кратного объема 1 М глицина, pH 10. Считыватель для планшетов Envision использовали для получения флуоресцентных сигналов (длина волны возбуждения/излучения: 355/450 нм). Значения рассчитывали путем вычитания фонового сигнала и последующей подгонки к стандартной кривой талиглюцеразы.

Анализ GluSph

[00243] Концентрацию D-глюкозил- β 1-1'-D-эритросфингозина (GluSph) в образцах сыворотки крови и тканей тестируемых животных анализировали методом LC-MS/MS. Белок в образцах осаждали смесью 97,5 части подвижной фазы А (100:0,5 ацетонитрил: муравьиная кислота) и 2,5 части подвижной фазы В (50 мМ формиата аммония в смеси метанол:деионизированная вода:муравьиная кислота (MPAB) в соотношении 60:40:0,5), GluSph экстрагировали, высушивали и восстанавливали. В качестве суррогатной матрицы для стандартов выбрали MPAB. Контроль качества проводили как на суррогатной, так и на реальной матрице (сыворотка крови, гомогенаты печени и селезенки). Для гомогенизации ткани ее взвешивали, добавляли буфер для гомогенизации (MPAB) в соотношении 4:1 мкл/мг, гомогенизировали, супернатант переносили в новую пробирку и строили стандартные кривые (0,005 нг/мл - 81,92 нг/мл). Для подготовки образцов стандарты, контроли качества, холостую матрицу и образцы вносили в 96-луночный круглодонный планшет аликвотами по 20 мкл, добавляли 20 мкл матрицы или суррогатной матрицы, добавляли 120 мкл рабочего раствора внутреннего стандарта (ISTD) в MPAB, затем встряхивали, центрифугировали и переносили смеси образцов в лунки нового планшета. Жидкость удаляли выпариванием путем инкубации при температуре 45°C, остаток восстанавливали в 100 мкл MPAB, затем встряхивали и вводили в MDS-SCIEX/Applied Biosystems 5500 QTrap с интерфейсом Turbo-Ion Spray.

Суррогатные стандарты готовили с МРАВ в трех повторностях при концентрациях 0,005, 0,01, 0,02, 0,04, 0,08, 0,16, 0,32, 0,64, 1,28, 2,56, 5,12, 10,24, 20,48, 40,96 и 81,92 нг/мл. Контроли качества суррогатной матрицы готовили с использованием МРАВ в трех повторностях при концентрациях 0,5, 1,25, 5 и 25 нг/мл. Затем суррогатную матрицу и матрицу мышинной ткани добавляли в подготовленный контроль качества. МРАВ использовали для контролей качества суррогатной матрицы, в то время как сыворотку крови и гомогенизированные ткани использовали для контроля качества матрицы. Контроль качества соответствовал критериям приемлемости $\pm 20\%$, и повторности проходили в пределах $\pm 20\%$ от номинальной концентрации. Для обеспечения стабильности в каждом анализе стандартные кривые прогоняли перед анализом, после контроля качества и еще раз в конце анализа. Регрессию калибровочной кривой выполняли с использованием программного обеспечения Sciex OS с настройкой квадратичной аппроксимации кривой с весом $1/x^2$. В качестве внутреннего стандарта использовали GluSph-d5.

Результаты

Число копий генома вектора

[00244] Вектор AAVDJ-GBA трансдуцировал печень и селезенку, как определено путем количественного определения числа копий генома вектора в образцах тканей, взятых у тестируемых животных, с тенденцией к дозозависимому ответу в печени (**фиг. 2**). Вектор AAV3B-GBA также трансдуцировал печень, но менее эффективно по сравнению с AAVDJ-GBA (**фиг. 2**). Нормализация числа копий генома вектора по копиям конститутивного гена Tfcс мыши показала, что AAVDJ-GBA был в 27 раз эффективнее в трансдуцировании печени по сравнению с той же дозой трансгена, доставляемого капсидом AAV3B (1E13 гв/кг), подтверждая, что капсид AAVDJ трансдуцирует печень мыши более эффективно, чем AAV3B (**фиг. 3**). Трансдукция селезенки обоими векторами была очевидна, когда число копий генома вектора нормализовали по количеству вводимой gDNA, но минимальная трансдукция была очевидна, когда число копий генома вектора нормализовали по копиям конститутивного гена (служащего в качестве заместителя гаплоидного генома клетки-хозяина) (**фиг. 3**). Данные по трансдукции для отдельных тестируемых животных приведены в **таблице 2** ниже.

Экспрессия трансгена GBA

[00245] Экспрессия мРНК трансгена GBA, нормализованная по экспрессии конститутивного гена клетки-хозяина Hprt, соответствовала картине трансдукции вектора. Экспрессия трансгена в печени у тестируемых животных, которым вводили вектор AAVDJ-GBA, была значительно выше, чем при использовании той же дозы вектора AAV3B-GBA (**фиг. 4**). В селезенке не была обнаружена экспрессия трансгена ни с одного из векторов (**фиг. 4**). Уровни экспрессии мРНК трансгена GBA для отдельных тестируемых животных представлены в **таблице 2** ниже.

Таблица 2

ИД	Ткань	Тестируемый	Доза	гв/мкг	гв/геном	РНК hGBA
----	-------	-------------	------	--------	----------	----------

живо тного		препарат	(гв/кг)	gDNA	мышь (hGBA /mTFRC)	(hGBA/ mHPRT)
26	Печень	Среда- носитель	0	0	0,000	0,001
27	Печень	Среда- носитель	0	200	0,002	0,000
28	Печень	Среда- носитель	0	N/A	N/A	0,001
11	Печень	AAV3B-GBA	1E13	3420	0,047	0,651
12	Печень	AAV3B-GBA	1E13	260	0,565	1,422
13	Печень	AAV3B-GBA	1E13	8060	0,065	0,761
6	Печень	AAVDJ-GBA	1E13	480400	6,063	38,871
7	Печень	AAVDJ-GBA	1E13	290000	3,539	27,325
8	Печень	AAVDJ-GBA	1E13	507800	8,849	37,834
21	Печень	AAVDJ-GBA	1E12	85600	N/A	N/A
22	Печень	AAVDJ-GBA	1E12	80800	N/A	N/A
23	Печень	AAVDJ-GBA	1E12	44200	N/A	N/A
26	Селезе нка	Среда- носитель	0	132	N/A	0,000
27	Селезе нка	Среда- носитель	0	0	N/A	0,001
11	Селезе нка	AAV3B-GBA	1E13	3460	0,009	0,000
12	Селезе нка	AAV3B-GBA	1E13	184000	0,552	0,004
13	Селезе нка	AAV3B-GBA	1E13	2380	0,007	0,000
6	Селезе нка	AAVDJ-GBA	1E13	49200	0,099	0,001
7	Селезе нка	AAVDJ-GBA	1E13	35580	0,076	0,003
8	Селезе нка	AAVDJ-GBA	1E13	38400	0,074	0,002

Экспрессия белка GСазы согласно LC-MS/MS

[00246] Количество белка GСазы человека в образцах тестируемых животных, которым вводили векторы GBA, количественно определяли с помощью иммуноаффинного анализа с LC-MS/MS. Уровни белка GСазы в печени, полученные в результате обработки вектором AAVDJ-GBA, были дозозависимыми, и, что согласуется экспрессией мРНК трансгена, это приводило к более высоким уровням GСазы в печени по сравнению с той же дозой вектора AAV3B-GBA (**фиг. 5А**). Эта картина также нашла отражение в уровнях белка GСазы, измеренных в образцах сыворотки крови тестируемых животных (**фиг. 5С**), это позволяет предположить, что AAV-опосредованная доставка кассеты экспрессии GBA может обеспечивать продукцию GСазы в печени, которая затем высвобождается в кровоток. Несмотря на отсутствие экспрессии мРНК GBA, белок GСазы можно было обнаружить в образцах селезенки тестируемых животных, обработанных обоими векторами (**фиг. 5В**), это позволяет предположить, что GСазы захватывалась селезенкой из белка в кровотоке, поступающего из печени. Как и в печени, количество GСазы, продуцируемой вектором AAVDJ-GBA в образцах селезенки, было дозозависимым. Концентрация белка GСазы в образцах сыворотки крови и тканей отдельных тестируемых животных представлена в **таблице 3** ниже.

Экспрессия белка GСазы согласно ICH

[00247] Белок GСазы человека у тестируемых животных, обработанных обоими векторами GBA, также изучали методом иммуногистохимии. Положительное окрашивание низкой интенсивности обнаружили в гепатоцитах, тогда как окрашивание высокой интенсивности обнаружили в клетках Купфера, расположенных вдоль синусоидов (**фиг. 6**). Интенсивность окрашивания белка GСазы методом ICH была выше для вектора AAVDJ-GBA по сравнению с той же дозой вектора AAV3B-GBA, что согласуется с концентрациями белка GСазы в печени, определенными методом LC-MS/MS.

Активность GСазы в сыворотке крови и тканях

[00248] При измерении с использованием анализа с флуорогенным субстратом активность GСазы в образцах сыворотки крови и тканей тестируемых животных увеличилась после обработки с помощью векторов AAVDJ-GBA и AAV3B-GBA по сравнению с контролем со средой-носителем (**фиг. 7А, 7В, 7С**). В печени оба вектора продуцировали активность GСазы выше по сравнению с тестируемыми животными, которым вводили только среду-носитель (**фиг. 7А**), тогда как только вектор AAVDJ-GBA продуцировал уровни активности GСазы в селезенке (**фиг. 7В**) и сыворотке крови (**фиг. 7С**), которые превышали отрицательные контроли, в том числе при более низкой протестированной дозе (1Е12 гв/кг). В сыворотке крови, печени и селезенке активность GСазы, продуцируемая вектором AAVDJ-GBA, была дозозависимой. В совокупности эти результаты показывают, что фермент GСаза человека, продуцированный с векторов в печени, был функциональным.

Уровни GluSph в сыворотке крови и тканях

[00249] Глюкозилсфингозин (GluSph) является биомаркером болезни Гоше. Дефицит GСазы при этом нарушении приводит к внутрилизосомальному накоплению глюкозилцерамида, который затем деацилируется кислой церамидазой с образованием глюкозилсфингозина. Можно ожидать, что восстановление активности GСазы, например, в результате замещения фактора или генной терапии, приведет к снижению уровней GluSph.

[00250] Концентрации GluSph в образцах сыворотки крови и тканей у тестируемых животных, обработанных вектором и средой-носителем, определяли методом LC-MS/MS. Трансгенные мыши D409V имеют дефицит активности GСазы и, следовательно, характеризуются повышенными уровнями GluSph в печени, селезенке и сыворотке крови. При обработке векторами AAVDJ-GBA или AAV3B-GBA уровни GluSph значительно снижались в тех же тканях и сыворотке крови по сравнению с уровнями, характерными для тестируемых животных, обработанных средой-носителем (**фиг. 8А, 8В, 8С**). В соответствии с другими результатами обработка с помощью AAVDJ-GBA привела к более выраженному снижению уровней GluSph по сравнению с той же дозой вектора AAV3B-GBA. Снижение уровней GluSph в ответ на вектор AAVDJ-GBA было дозозависимым, и более чем 84% снижение уровней GluSph в печени и селезенке достигалось при дозе 1Е12 гв/кг. Интересно отметить, что хотя количество белка GСазы, обнаруженного в печени тестируемых животных, обработанных с помощью 1Е13 гв/кг вектора AAV3B-GBA, составляло всего 6% от такового у животных, получавших ту же дозу AAVDJ-GBA, уровни GluSph в печени были снижены более чем на 70% (**фиг. 8А**). Аналогичные снижения концентрации GluSph наблюдали в селезенке (**фиг. 8В**) и сыворотке крови (**фиг. 8С**). Полученные результаты показали, что один из наиболее значимых маркеров болезни Гоше типа 1 - накопление сфинголипидов в печени и селезенке - можно снижать путем обработки животной модели заболевания с помощью векторов, разработанных для трансдукции печени и продуцирования ферментативно активного белка hGСазы, который секретируется в кровотоке.

Таблица 3

Конц. hGСазы, нг/мл	Конц. hGСазы, нг/мл	Конц. hGСазы, нг/г ткани	Конц. hGСазы, нг/г ткани	Активность hGСазы, мкг/мл	Активность hGСазы, мкг/мг белка	Активность hGСазы, мкг/мг белка	Конц. GluSph, мкг/мл	Конц. GluSph, нг/г ткани	Конц. GluSph, нг/г ткани
------------------------	------------------------	-----------------------------	-----------------------------	------------------------------	------------------------------------	------------------------------------	-------------------------	-----------------------------	-----------------------------

№ тестируемого животного	Тестируемый препарат	Доза (гв/кг)	Сыворотка крови, день 14	Сыворотка крови, день 28	Селезенка	Печень	Сыворотка крови	Селезенка	Печень	Сыворотка крови	Селезенка	Печень
26	Среда - носитель	NA	BLOQ	BLOQ	BLQQ	BLQQ	0,51	0,28	0,28	13,50	80,90	18,80
27	Среда - носитель	NA	BLOQ	BLOQ	BLQQ	BLQQ	0,59	0,37	0,33	13,50	139,00	21,20
28	Среда - носитель	NA	BLOQ	BLOQ	BLQQ	BLQQ	0,60	0,35	0,31	14,10	114,00	23,50
29	Среда - носитель	NA	BLOQ	BLOQ	BLQQ	BLQQ	0,59	N/A	0,33	14,70	96,40	23,40
21	AAV DJ-GBA	1E12	543	724	141	2030	2,48	1,00	2,68	5,58	5,00	3,52
22	AAV DJ-GBA	1E12	250	396	118	1380	0,77	0,64	2,14	5,24	11,30	5,15
23	AAV DJ-GBA	1E12	677	729	221	1860	2,49	1,09	2,64	4,89	5,11	3,11
24	AAV DJ-	1E12	407	621	164	1280	0,82	N/A	2,30	5,62	5,67	3,08

	GBA											
25	AAV DJ- GBA	1E 12	630	639	244	153 0	1,34	N/A	3,02	4,68	4,76	2,5 1
6	AAV DJ- GBA	1E 13	5230	6780	155 0	141 00	13,18	2,83	7,27	2,62	2,10	1,8 6
7	AAV DJ- GBA	1E 13	5440	5920	130 0	102 00	19,11	2,96	6,76	2,64	1,85	1,8 8
8	AAV DJ- GBA	1E 13	7770	9770	200 0	107 00	21,09	3,58	8,73	2,01	1,23	1,2 1
9	AAV DJ- GBA	1E 13	4110	4750	927	737 0	11,09	N/A	6,02	3,22	2,12	2,1 6
10	AAV DJ- GBA	1E 13	223	8930	175 0	103 00	22,54	N/A	6,25	2,00	1,39	1,2 5
11	AAV 3B- GBA,	1E 13	49,8	44,4	BL OQ	334	0,76	0,44	1,32	9,94	32,1 0	6,8 3
12	AAV 3B- GBA,	1E 13	154	118	297	561	0,83	0,43	1,41	7,27	16,4 0	4,9 2
13	AAV 3B- GBA,	1E 13	53,2	57,0	119 0	424	0,83	0,43	1,21	9,06	32,2 0	7,5 0
14	AAV 3B- GBA,	1E 13	169	162	176 0	103 0	0,89	N/A	1,65	7,11	16,1 0	5,7 6
15	AAV 3B- GBA,	1E 13	174	179	581	939	0,92	N/A	1,85	6,70	14,3 0	4,4 4

BLOQ=ниже предела количественного определения

Пример 4

Тестирование вектора GСазы на основе AAV на здоровых отличных от человека приматах

[00251] Выходя за пределы исследований на мышах, вектор AAV3В-GВА клон 128 и вектор AAVDJ-GВА клон 128 (обозначаемые в этом примере и связанных фигурах как AAV3В-GВА и AAVDJ-GВА соответственно) вводили путем внутривенной инъекции здоровым яванским макакам, и образцы отбирали после вскрытия для анализа числа копий генома вектора в трансдуцированных клетках, а также экспрессии РНК и белка в результате трансдукции вектора.

Материалы и способы

Введение вектора и сбор образцов

[00252] Вектор AAV3В-GВА клон 128 вводили яванским макакам в четырех возрастающих дозах путем внутривенной инъекции. Два самца и одна самка получили дозу 3Е12 генома вектора на кг массы тела (гв/кг); один самец и две самки получили дозу 1Е13 гв/кг; один самец и одна самка получили дозу 3Е13 гв/кг; и один самец и одна самка получили дозу 5,3Е13 гв/кг и 5,2Е13 гв/кг соответственно. Вектор AAVDJ-GВА клон 128 вводили IV одному самцу и одной самке обезьяны в дозе 3Е13 гв/кг. В общей сложности четыре животных, два самца и две самки, получили среду-носитель в качестве отрицательного контроля. На протяжении всего исследования животным вводили метилпреднизолон для подавления возможного иммунного ответа. Вскрытие проводили через примерно 30 дней после введения дозы. Образцы сыворотки крови и образцы тканей массой 100-200 мг из печени, селезенки и ганглия дорсального корешка собирали и хранили при температуре -80°C до применения. Для иммуногистохимического исследования (ИНС) ткани фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине, готовили парафиновые блоки и срезы.

Выделение ДНК

[00253] Замороженные образцы тканей использовали для выделения ДНК с использованием способов экстракции ДНК фенолом/хлороформом. Замороженные образцы тканей перемалывали в замороженный сухой порошок с использованием измельчителя Covaris CP02 SugoPrep в соответствии с инструкциями производителя. Приблизительно 30 мг каждого замороженного порошка ткани переносили в новую пробирку и ресуспендировали в 292,5 мл лизирующего буфера TENS, содержащего 1% SDS. Затем в каждую пробирку добавляли 7,5 мл протеиназы К и инкубировали при температуре 56°C в термомиксере, встряхивая со скоростью 1000 об./мин в течение 3 часов и перемешивая в течение 15 секунд каждые 30 минут. Затем образцы охлаждали до комнатной температуры и обрабатывали РНКазой А в течение 5 минут. Каждый образец обрабатывали с помощью 300 мл смеси фенол:хлороформ:изоамиловый спирт (25:24:1) и перемешивали в течение 20 секунд. Жидкость верхней фазы собирали для осаждения ДНК путем добавления 7,5 М NH₄ОAc в объеме, составляющем приблизительно 0,5 объема верхней фазы, и добавления чистого этанола в объеме, составляющем 3 общих объема.

Образцы охлаждали при -20°C в течение по меньшей мере 2 часов, после чего центрифугировали при 4°C в течение 30 минут при 16000 g. Осадок ДНК промывали ледяным 70% этанолом и ресуспендировали в воде, не содержащей нуклеаз. Концентрацию ДНК измеряли с помощью спектрофотометра Nanodrop.

Выделение РНК

[00254] Замороженный порошок ткани готовили, как описано в предыдущем разделе. Приблизительно 30 мг образца ткани использовали для гомогенизации в 1 мл Trizol в присутствии гранулы из нержавеющей стали диаметром 5 мм с использованием TissueLyser II, установленного на частоту 25 1/с в течение 5 минут. Лизаты переносили в пробирки для разделения фаз и добавляли 200 мкл хлороформа. Образцы встряхивали в течение 15 секунд, инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут и центрифугировали при 14000 g в течение 5 мин при 4°C . Прозрачный супернатант переносили в новую пробирку и обрабатывали с помощью мининабора для выделения РНК Purelink в соответствии с инструкциями производителя. Обработку ДНКазой проводили на колонке в течение 20 мин перед элюированием водой, не содержащей нуклеаз. Концентрацию РНК измеряли с использованием спектрофотометра Nanodrop.

Число копий генома вектора

[00255] Геномную ДНК (gDNA) извлекали из печени, селезенки и DRG, а копии генома вектора (VGC) определяли с помощью ddPCR трансгена GBA для количественного определения трансдукции вектора. VGC нормализовали либо по gDNA ввода, либо по экспрессии конститутивного гена Tfrc. В анализе ddPCR температура отжига составляла 60°C , последовательность праймера зонда представляла собой TTAGGAAAGGACAGTGGGAGTGGC (SEQ ID NO:43), последовательность прямого праймера представляла собой AATGCGATGCAATTCCTCATT (SEQ ID NO:44), последовательность обратного праймера представляла собой TGCCAGCCATCTGTTGTT (SEQ ID NO:45), флуорофором зонда был FAM, а гасителем был NFQ. ДНК разбавляли до 10 нг/мл. Двадцать мкл реакционной смеси для ПЦР, содержащей Supermix ddPCR, выделенную gDNA, праймеры GBA и зонды FAM (см. выше), праймеры конститутивного гена (mf)Tfrc и зонды VIC, готовили на рабочей станции Airclean 600 PCR, очищали с помощью DNAZap и добавляли в 96-луночный планшет для ddPCR. Капли получали с использованием генератора капель QX200. Планшеты герметизировали с помощью герметика для ПЦР-планшетов PX1. Программа ПЦР: 95°C в течение 10 мин □ 94°C в течение 30 с □ 60°C в течение 1 мин] (x40 циклов) □ 98°C в течение 10 мин □ завершали выдерживанием при 4°C . Количество и амплитуду капель регистрировали с использованием считывателя QX200 и анализировали с помощью программного обеспечения QuantaSoft для расчета числа копий ДНК. VGC, полученные из канала FAM, нормализуют по мкг gDNA ввода или сообщают как VGC на гаплоидный геном путем расчета отношения канала FAM к каналу VIC.

Экспрессия трансгена GBA

[00256] Экспрессию мРНК GBA с трансдуцированного трансгена количественно

определяли с помощью обратной транскрипции и ddPCR образцов РНК из печени, селезенки и DRG. Уровни транскрипции мРНК нормализовали по экспрессии конститутивного гена *Hprt*. Образцы выделенной РНК подвергали обратной транскрипции для создания библиотеки cDNA с использованием набора для синтеза cDNA iScript (Bio-Rad, кат. № 1708891) в соответствии с протоколом производителя. В 20 мкл реакционной смеси использовали 500 нг общей РНК. Обратную транскрипцию проводили при 37°C в течение 60 минут, а затем при 95°C в течение 5 минут. Образцы cDNA хранили при температуре -20°C до анализа методом RT-PCR. Количественное определение экспрессии РНК транскриптов GBA проводили с использованием ddPCR с теми же праймерами и зондами GBA, которые описаны выше, а также с праймерами/зондами конститутивного гена *mfHprt*. Смесь для реакции ПЦР, содержащую Supermix ddPCR (без dUTP) и вышеуказанные праймеры/зонды, готовили на рабочей станции Airclean 600 PCR, очищали с помощью DNAZap и добавляли в 96-луночный планшет для ddPCR. Получение капель, программы ПЦР и сбор данных выполняли, как описано выше. VGC нормализовали по мкг gDNA или количеству *mfHPRT*.

Экспрессия белка GCазы согласно LC-MS/MS

[00257] Рекомбинантный белок GCазы человека, продуцируемый в тестируемых животных, обработанных вектором, обогащали из образцов сыворотки крови, PBMC и лизатов ткани печени и селезенки с помощью антитела, которое специфически связывает GCазу, а затем количественно определяли с помощью жидкостной хроматографии - тандемной масс-спектрометрии (LC-MS/MS). Осадки PBMC объединяли во флаконе в буфере M-PER+ингибитор протеазы и лизировали путем измельчения в шаровой мельнице в течение 6 минут в шариковом измельчителе STORM 5. Срезы селезенки и печени готовили путем добавления объема M-PER+ингибитор протеазы для получения 50 мг/мл ткани в буфере, образцы обрабатывали с помощью Omni Bead Ruptor Elite в течение 1,5 минуты. Образцы анализировали в различных объемах: 50 мкл сыворотки крови, 200 мкл лизата ткани и 200-800 мкл лизата PBMC в сравнении с суррогатной матрицей для стандартной кривой, содержащей 1% BSA в PBS с добавлением белка талиглюцеразы. Линейный диапазон анализа составил от 0,25 до 1000 нг/мл. Проводили двойное IP с использованием 2 мкг антитела к GCазе+биотин и магнитных шариков со стрептавидином. Образцы обрабатывали на Thermo KingFisher Flex и элюировали с помощью 30 mM HCl+5% ACN. Образцы доводили до pH 8,3 с помощью 1 M Tris-HCl, восстанавливали, алкилировали и расщепляли на протяжении ночи с использованием LysC-трипсин Promega. Образцы вводили в Thermo Altis MS в объеме 85 мкл с использованием условий нанопотоковой LC с захватом и элюированием. Все данные для анализа LC-MS/MS получали с помощью Xcalibur v. 4.1 на Thermo Altis. Обработку данных производили с использованием Skyline v. 21.2.0.369 и экспортировали в Excel. Калибровочную кривую получали на основе соотношений площадей пиков аналитического пептида и пептида SIL, а концентрацию исследуемых образцов определяли путем обратного расчета соотношения площадей пиков в сравнении со

стандартной кривой. Данные LC-MS/MS для лизата PBMC и тканей нормализовали по массе общего белка для ткани и общему числу в миллионах собранных клеток для осадка PBMC.

Экспрессия белка GCазы согласно ICH

[00258] Парафиновые срезы печени, селезенки и DRG окрашивали антителами к GCазе с использованием полностью автоматизированной системы окрашивания (Leica Biosystems Bond Rx). Вкратце, предметные стекла депарафинизировали и обрабатывали пероксидом в течение 10 минут. Затем предметные стекла промывали деионизированной водой и пермеабилizировали 0,3% раствором Triton в течение 1 часа перед инкубацией с первичным антителом к GCазе (Sigma-Aldrich) в течение 1 часа. Первичное антитело разводили в разбавителе для первичного антитела Bond в разведении 1:250. Затем предметные стекла промывали и инкубировали во вторичном антителе (Leica, кат. № DS9800) в течение 8 минут. Наличие антител визуализируют путем инкубации с DAB (Leica, кат. № DS9800) в течение 10 минут. Наконец, предметные стекла промывали в воде и обезвоживали в батарее спиртов до ксилола перед покрытием покровным стеклом и визуализировали на сканере предметных стекол (Axio Scan Z1, Zeiss). Изображения воспроизводили с помощью программного обеспечения ZEN Blue.

Титр нейтрализующих антител к капсиду

[00259] Чтобы проверить возможность того, что наличие нейтрализующих антител к капсиду вектора может повлиять на эффективность трансдукции, в день введения вектора у тестируемых животных определяли титры nAb к AAV3B. Для оценки титра NAb проводили клеточный анализ подавления трансдукции. Вкратце, клетки HEK293T высевали на 96-луночные планшеты с поли-D-лизином в концентрации 60 тыс. клеток на 100 мкл на лунку и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ на протяжении ночи. На следующий день в планшет с клетками добавляли 10 мкл аденовируса WT при MOI 100 и инкубировали планшет в течение 2 часов. Выполняли серийные разведения образца сыворотки крови и инактивированной нагреванием сыворотки (используемой в качестве контроля) и смешивали вектор на основе AAV (при MOI 10000), инкубировали планшет в течение 1 часа при 37°C, 5% CO₂ для образования комплекса вектор-сыворотка крови. Затем комплекс вектор-сыворотка крови переносили (120 мкл) к клеткам и инкубировали планшет при 37°C, 5% CO₂ в течение 18-24 часов. Затем в планшет добавляли 100 мкл реагента Bight Glo согласно инструкции для пользователя. Планшет считывали на Envision. Титры NAb рассчитывали с использованием порогового значения для инактивированной нагреванием сыворотки. Титры регистрировали как наименьшее обратное разведение сыворотки крови (5, 10, 20, 40 до 5120), которое характеризовалось \geq 50% подавлением трансдукции.

Результаты

Число копий генома вектора

[00260] Вектор AAV3B-GVA трансдуцировал печень и селезенку, как определено путем количественного определения числа копий генома вектора в образцах тканей,

взятых у тестируемых животных, с тенденцией к дозозависимому ответу (**фиг. 9**). Вектор AAVDJ-GBA также трансдуцировал печень, но в приблизительно 29 раз менее эффективно по сравнению с вектором AAV3B-GBA в той же дозе (3E13 гв/кг), это подтверждает, что капсид AAV3B трансдуцирует печень НРР более эффективно, чем AAVDJ. Число копий генома вектора, обнаруженное в ганглиях дорсальных корешков (DRG), находилось на фоновых уровнях, что указывает на отсутствие трансдукции данной ткани каким-либо вектором (**фиг. 9**). Аналогичные результаты наблюдались при нормализации числа копий генома вектора по конститутивному гену Tfrс яванского макака. По мере увеличения дозы вектора AAV3B-GBA относительное число геномов вектора на копию конститутивного гена (служащего в качестве заместителя гаплоидного генома клетки-хозяина) также увеличивалось с 7-кратного при самой низкой дозе 3E12 гв/кг до 117-кратного при самой высокой дозе 5E13 гв/кг (**фиг. 10**). На основании данных, нормализованных по конститутивному гену, вектор AAV3B трансдуцировал селезенку, но только при двух самых высоких протестированных дозах и, следовательно, менее эффективно, чем печень (**фиг. 10**). Нормализованные данные подтвердили отсутствие трансдукции DRG. Данные по трансдукции для отдельных тестируемых животных приведены в **таблице 4** ниже.

Экспрессия трансгена GBA

[00261] Хотя геномы вектора после трансдукции с помощью вектора AAV3B-GBA можно было обнаружить как в печени, так и в селезенке (**фиг. 9** и **фиг. 10**), мРНК hGСазы, продуцируемую этим вектором, обнаружили только в печени, но не в селезенке (**фиг. 11**), это позволяет предположить, что специфичные для печени энхансер и промотор, используемые в каскаде экспрессии, были эффективны в ограничении экспрессии трансгена GBA трансдуцированными клетками печени. Что согласуется с эффективностью трансдукции, определенной путем обнаружения ДНК генома вектора, очень низкие уровни экспрессии происходили при трансдукции печени вектором AAVDJ-GBA, а в селезенке или DRG не наблюдали экспрессию РНК ни с одного из векторов. Экспрессия в печени трансгена GBA, доставляемого вектором AAV3B, также была дозозависимой. При нормализации по уровням мРНК конститутивного гена клетки-хозяина Hprt, уровни мРНК GBA увеличились от 1-кратных при дозе 3E12 гв/кг, до 7-кратных при дозе 1E13 гв/кг, 17-кратного при дозе 3E13 гв/кг и 125-кратного при дозе 5E13 гв/кг. Данные по экспрессии мРНК трансгена GBA для отдельных тестируемых животных приведены в **таблице 4** ниже.

Таблица 4

ИД животного	Ткань	Тестируемый препарат	Доза (гв/кг)	гв/мкг gDNA	гв/геном обезьяны (hGBA/супоTFR C)	РНК hGBA (hGBA/супоHPR T)

1A	Печень	Среда-носитель	0	2340	0,025	0,007
6A	Печень	Среда-носитель	0	1720	0,013	0,000
2A	Печень	AAV3B-GBA	3E13	6974000	84,404	125,262
7A	Печень	AAV3B-GBA	3E13	3714000	32,333	17,578
3A	Печень	AAV3B-GBA	5E13	10076000	106,604	64,914
8A	Печень	AAV3B-GBA	5E13	15200000	116,741	125,659
4A	Печень	AAVDJ-GBA	3E13	676000	8,063	3,131
9A	Печень	AAVDJ-GBA	3E13	3880	0,032	0,000
1A	Селезенка	Среда-носитель	0	2060	0,007	0,001
6A	Селезенка	Среда-носитель	0	2840	0,007	0,001
2A	Селезенка	AAV3B-GBA	3E13	1342000	4,056	0,032
7A	Селезенка	AAV3B-GBA	3E13	197000	0,786	0,004
3A	Селезенка	AAV3B-GBA	5E13	13800000	45,590	0,052
8A	Селезенка	AAV3B-GBA	5E13	4386000	14,860	0,029
1A	DRG	Среда-носитель	0	6160	0,034	0,046
6A	DRG	Среда-носитель	0	7000	0,055	0,000
2A	DRG	AAV3B-GBA	3E13	9400	0,065	0,016
7A	DRG	AAV3B-GBA	3E13	2800	0,031	0,000
3A	DRG	AAV3B-GBA	5E13	8200	0,058	0,000
8A	DRG	AAV3B-GBA	5E13	7600	0,063	0,002
4A	DRG	AAVDJ-GBA	3E13	7200	0,050	0,001
9A	DRG	AAVDJ-GBA	3E13	6600	0,053	0,000
1B	Печень	Среда-носитель	0	100	0,001	0,000
5B	Печень	Среда-носитель	0	680	0,006	0,000
2B	Печень	AAV3B-GBA	3E12	1766000	10,600	1,770
3B	Печень	AAV3B-GBA	3E12	1330000	6,604	1,160

6B	Печень	AAV3B-GBA	3E12	3714000	21,419	3,550
4B	Печень	AAV3B-GBA	1E13	3660000	17,395	4,420
7B	Печень	AAV3B-GBA	1E13	5518000	29,667	6,560
8B	Печень	AAV3B-GBA	1E13	1190000	7,881	1,020
1B	Селезенка	Среда-носитель	0	122	0,000	0,000
5B	Селезенка	Среда-носитель	0	720	0,002	0,000
2B	Селезенка	AAV3B-GBA	3E12	41760	0,059	0,010
3B	Селезенка	AAV3B-GBA	3E12	59380	0,143	0,000
6B	Селезенка	AAV3B-GBA	3E12	486000	1,559	0,000
4B	Селезенка	AAV3B-GBA	1E13	70000	0,227	0,000
7B	Селезенка	AAV3B-GBA	1E13	90800	0,245	0,000
8B	Селезенка	AAV3B-GBA	1E13	232400	0,521	0,000
1B	DRG	Среда-носитель	0	198	0,002	0,000
5B	DRG	Среда-носитель	0	360	0,004	0,000
4B	DRG	AAV3B-GBA	1E13	1140	0,008	0,000
7B	DRG	AAV3B-GBA	1E13	3960	0,022	0,000
8B	DRG	AAV3B-GBA	1E13	6520	0,038	0,000

Экспрессия белка GCазы согласно LC-MS/MS

[00262] Количество белка GCазы человека в образцах тестируемых животных, которым вводили векторы GBA, количественно определяли с помощью иммуноаффинного анализа с LC-MS/MS. Уровни белка GCазы, продуцируемого с вектора AAV3B-GB, А были в среднем выше в печени, чем в селезенке, и коррелировали с дозой вектора в обеих тканях (**фиг. 12А** и **фиг. 12В**). Поскольку мРНК GBA обнаружили в печени, но не в селезенке тестируемых животных, которых обрабатывали вектором, наличие белка GCазы в селезенке, вероятно, было результатом его поглощения из циркулирующего белка, секретируемого в кровь трансдуцированными гепатоцитами. Уровни белка hGCазы, наблюдаемые в печени тестируемых животных, обработанных с помощью AAV3B-GBA, превышали средний уровень в образцах печени здоровых людей при всех протестированных дозах (**фиг. 12А**), в то время как уровни белка в селезенке тестируемых животных, обработанных вектором при двух самых высоких дозах, соответствовали уровням GCазы в селезенке здоровых людей (**фиг. 12В**). Образцы крови также собирали в нескольких временных точках после введения вектора, и количества

	носи тель											
5B	Сре да- носи тель	NA	F	BLO Q	BLO Q	BLO Q	BLO Q	BLO Q	BLO Q	BLO Q	BLO Q	BLO Q
2B	AA V3B - GB A	3,0E 12	M	129	236	200	176	-	119	127	87	93
3B	AA V3B - GB A	3,0E 12	M	117	264	141	142	-	76	95	72	45
6B	AA V3B - GB A	3,0E 12	F	80	324	259	217	-	242	176	114	99
4B	AA V3B - GB A	1,0E 13	M	94	300	344	380	-	267	237	182	193
7B	AA V3B - GB A	1,0E 13	F	136	364	282	371	-	330	300	188	144
8B	AA V3B -	1,0E 13	F	100	220	79	86	-	63	59	44	35

	GB A											
2A	AA V3B - GB A	3,0E 13	M	200	623	6067	8240	8226	-	-	-	-
7A	AA V3B - GB A	3,0E 13	F	140	187	228	231	161	-	-	-	-
3A	AA V3B - GB A	5,3E 13	M	278	496	904	2871	3930	-	-	-	-
8A	AA V3B - GB A	5,2E 13	F	373	736	2581	3550	7366	-	-	-	-
4A	AA VDJ - GB A	3,0E 13	M	23	86	99	51	40	-	-	-	-
9A	AA VDJ - GB A	3,0E 13	F	0,4	0,9	2,7	BLO Q	0,5	-	-	-	-

BLOQ=ниже предела количественного определения

Таблица 6

№ тестируемого животного	Тестируемый препарат	Доза (гв/кг)	Пол	Конц. hGCазы, пг/1Е6 клеток		Конц. hGCазы, пг/1Е6 клеток	Конц. hGCазы, пг/1Е6 клеток	Конц. hGCазы, пг/1Е6 клеток	Конц. hGCазы, пг/1Е6 клеток	Конц. hGCазы, нг/г ткани	Конц. hGCазы, нг/г ткани	Конц. hGCазы, нг/г ткани	Конц. hGCазы, нг/г ткани
				РВМС День 15	РВМС День 29								
1А	Среданоситель	NA	M	BLO Q	BLO Q	-	-	-	BLO Q	-	BLO Q	-	
6А	Среданоситель	NA	F	BLO Q	BLO Q	-	-	-	BLO Q	-	BLO Q	-	
1В	Среданоситель	NA	M	BLO Q	-	BLO Q	BLO Q	BLO Q	-	BLO Q	-	BLO Q	
5В	Среданоситель	NA	F	BLO Q	-	BLO Q	BLO Q	BLO Q	-	BLO Q	-	BLO Q	
2В	AA V3B - GB A	3,0E 12	M	BLO Q	-	BLO Q	BLO Q	BLO Q	-	19	-	276	

3B	AA V3B - GB A	3,0E 12	M	5	-	4	BLO Q	BLO Q	-	9	-	156
6B	AA V3B - GB A	3,0E 12	F	BLO Q	-	9	BLO Q	BLO Q	-	39	-	377
4B	AA V3B - GB A	1,0E 13	M	BLO Q	-	BLO Q	BLO Q	BLO Q	-	15	-	430
7B	AA V3B - GB A	1,0E 13	F	4	-	25	3	BLO Q	-	14	-	608
8B	AA V3B - GB A	1,0E 13	F	BLO Q	-	BLO Q	BLO Q	BLO Q	-	6	-	187
2A	AA V3B - GB A	3,0E 13	M	52	63	-	-	-	403	-	3112 3	-
7A	AA V3B - GB A	3,0E 13	F	249	12	-	-	-	8	-	837	-

3A	AA V3B - GB A	5,3E 13	M	9	40	-	-	-	163	-	1627 5	-
8A	AA V3B - GB A	5,2E 13	F	457	315	-	-	-	668	-	3389 1	-
4A	AA VDJ - GB A	3,0E 13	M	BLO Q	BLO Q	-	-	-	7	-	354	-
9A	AA VDJ - GB A	3,0E 13	F	BLO Q	BLO Q	-	-	-	BLO Q	-	BLO Q	-

BLOQ=ниже предела количественного определения

Экспрессия белка GCазы согласно ICH

[00263] Белок GCазы человека у тестируемых животных, обработанных вектором AAV3B-GBA, также изучали методом иммуногистохимии. Положительное окрашивание выше фонового наблюдали в гепатоцитах, окружающих периферические ветви воротной вены в образцах печени животных, обработанных всеми дозами вектора, хотя число положительных клеток было намного больше при двух самых высоких протестированных дозах (**фиг. 13В**) в сравнении с двумя более низкими дозами (**фиг. 13А**). Кроме того, при двух самых высоких дозах у отдельных тестируемых животных наблюдалось соответствие между числом клеток печени, с положительным окрашиванием на GCазу, и количеством мРНК GBA, обнаруживаемым в образцах печени. В образцах селезенки и DRG от тестируемых животных, обработанных вектором, окрашивание на hGCазу находилось на фоновом уровне (данные не показаны).

Титр нейтрализующих антител к капсиду

[00264] Титр нейтрализующих антител к капсиду AAV3B измеряли в сыворотке крови тестируемых животных, собранной до введения вектора AAV3B-GBA и через 22 дня после. До обработки титры nAb были отрицательными или низкими (коэффициент

разведения 20-40 для $\geq 50\%$ подавления трансдукции в анализе), это позволяет предположить, что высокий титр nAb не был основной причиной низкой эффективности трансдукции, наблюдаемой у некоторых тестируемых животных. При двух самых высоких дозах вектора тестируемые животные характеризовались высокими титрами nAb к капсиду AAV3B (до коэффициента разведения 5120) через 22 дня после обработки. Напротив, титры nAb оставались низкими у тестируемых животных, получавших более низкие дозы вектора, что указывает на то, что для сероконверсии животных требовалось по меньшей мере $3E13$ гв/кг вектора. Титры нейтрализующих антител к капсиду у отдельных тестируемых животных приведены в **таблице 7**.

Таблица 7

Титр nAb к AAV3B				
Номер животного	Пол	Доза (гв/кг)	Титр NAb в день 1	Титр NAb в день 22
1B	M	0	<5	<5
5B	F	0	<5	<5
2B	M	$3E+12$	<5	>40
3B	M	$3E+12$	<5	>40
6B	F	$3E+12$	<5	>40
4B	M	$1E+13$	<5	>40
7B	F	$1E+13$	<5	>40
8B	F	$1E+13$	<5	>40
1A	M	0	80	40
6A	F	0	40	10
2A	M	$3E+13$	40	2560
7A	F	$3E+13$	20	5120
3A	M	$5E+13$	20	2560
8A	F	$5E+13$	20	2560

Другие наблюдения

[00265] В ходе эксперимента здоровье тестируемых животных и маркеры, ассоциированные с иммунной реактивностью в отношении вектора, оценивали в нескольких временных точках. Никаких клинических изменений, связанных с тестируемым препаратом, или изменений массы тела или потребления пищи не наблюдали. Связанное с тестируемым препаратом увеличение цитокинов IL-10 (пиковые изменения до 3,83-кратного от исходного уровня) и IP-10 (пиковое увеличение до 3,99-кратного от исходного уровня) наблюдали у животных, которым вводили вектор AAV3B-GVA $\geq 3E13$ гв/кг, но не при более низких дозах. Ни у одного из тестируемых животных не наблюдали увеличения IFN-альфа-2а, MCP-1, IL-6, IFN-гамма, TNF-альфа или

продуктов активации комплемента C3a и C5b-9. Повышение уровней печеночного фермента аланинаминотрансферазы (ALT), но не аспаратаминотрансферазы (AST) в сыворотке крови, считающееся связанным с тестируемым препаратом, наблюдали у четырех животных в диапазоне от 2,1 до 11,5-кратного относительно уровней, наблюдавшихся до введения вектора, но оно не коррелировало с титром pAb к AAV3B, или степенью трансдукции печени, или экспрессией GBA у соответствующего тестируемого животного. У двух тестируемых животных наблюдали временное повышение уровня С-реактивного белка (CRPHS), связанное с тестируемым препаратом. У определенных тестируемых животных в определенные дни также наблюдали повышение числа ретикулоцитов, лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов или моноцитов, а также уровней триглицеридов в сыворотке крови.

Таблица последовательностей

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
1	Аминокислотная последовательность капсидного белка VP1 AAV3B	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGVPQPKA NQQHQDNRRGLVLPGYKYLPGNGLDKGEVNEA DAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLYKYNHADAEFQ ERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEAA KTAPGKKRPVDQSPQEPDSSSGVVGKSGKQPARKRL NFGQTGDSESVDPQPLGEPPAAPTSLGSNTMASG GGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGD VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYF GYSTPWGYFDFNRFHCHFSRWDQRLINNNWGFR PKKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVF TDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYL TLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSY TFEDVPFHSSYAHQSGLDRLMNPLIDQYLYLNRT QGTTS GTTNQSRLLFSQAGPQMSLQARNWLPGPC YRQQRLSKTANDNNNSNFPWTAASKYHLNGRDSL VNP GPAMASHKDDEEKFFPMHG NLI FGKEGTTASN AELDNVMITDEEEIRTTNPVATEQYGTVANLQSS NTAPTTRTVNDQGALPGMVWQDRDVYLQGPWA KIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIMIKNTPVPA NPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPRPI GTRYLTRNL

2	Аминокислотная последовательность капсидного белка VP2 AAV3B	<p>MAPGKKRPVDQSPQEPDSSSGVVGKSGKQPARKRL NFGQTGDSESVDPQPLGEPPAAPTSLGSNTMASG GGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGDR VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYF GYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFR PKKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVF TDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYL TLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSY TFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRT QGTTSGTTNQSRLIFSQAGPQSMQLQARNWLPGPC YRQQRSLKANDNNNSNFPWTAASKYHLNGRDSL VNP GPAMASHKDDEEKFFPMHG NLI FGKEGTTASN AELDNV MITDEEEIRTTPVATEQYGTVANNLQSS NTAPTTRTVNDQGALPGMVWQDRDVYLQGPWA KIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIMIKNTPVPA NPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPRPI GTRYLTRNL</p>
3	Аминокислотная последовательность капсидного белка VP3 AAV3B	<p>MASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQW LGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASND NHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNN WGFRPKKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTST VQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQ YGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNF QFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLN NRTQGTTSGTTNQSRLIFSQAGPQSMQLQARNWLP GPCYRQQRSLKANDNNNSNFPWTAASKYHLNGR DSL VNP GPAMASHKDDEEKFFPMHG NLI FGKEGTT ASNAELDNV MITDEEEIRTTPVATEQYGTVANNL QSSNTAPTTRTVNDQGALPGMVWQDRDVYLQGPW WAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIMIKNTPV PANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKE NSKRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPR PIGTRYLTRNL</p>
4	Аминокислотная	MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKP

	<p>последовательность капсидного белка VP1 AAV-DJ</p>	<p>AERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEA DAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADA EFQE RLKEDTSFGGNLGRAV FQAKKRLLEPLGLVEEAAK TAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLN FGQTGDADSVDPDPQPIGEPPAAPSGVGS LTMAAGG GAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVI TTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYF GYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFR PKRLSFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFT DSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLT LNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFTYT FEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQT TGGTTNTQTLGFSQGGPNTMANQAKNWLPGPCYR QQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL VN PGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVD IEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQ AATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGP IWAKIP HTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPADPP TTFNQSKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRW NPEIQYTSNYYKSTSVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRY LTRNL</p>
5	<p>Аминокислотная последовательность капсидного белка VP2 AAV-DJ</p>	<p>MAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRL NFGQTGDADSVDPDPQPIGEPPAAPSGVGS LTMAAG GGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDR VITSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNA YFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWG FRPKRLSFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQV FTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGY LTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFT YTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRT QTTGGTTNTQTLGFSQGGPNTMANQAKNWLPGPC YRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL VNP GPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTN VDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGN RQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGP IWAK</p>

		IPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADP PTTFNQSKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKR WNPEIQYTSNYYKSTSVDFAVNTEGVYSEPRPIGTR YLTRNL
6	Аминокислотная последовательность капсидного белка VP3 AAV-DJ	MAAGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTW MGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSS NDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRPDWQRLIN NNWGFRPKRLSFKLFNIQVKEVTQNEGKTIANNL TSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVMI PQYGYLTLNNGSQA VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGN NFQFTYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLY YLSRTQTGGTTNTQTLGFSQGGPNTMANQAKNW LPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLN GRDSLVPNPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQG SEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTPVATEQYGSVSTN LQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQG PIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTP VPADPPTTFNQSKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQK ENSKRWNPEIQYTSNYYKSTSVDFAVNTEGVYSEP RPIGTRYLTRNL
7	Нуклеотидная последовательность (флоп- конфигурация) 5'- инвертированного концевого повтора (5'-ITR)	TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCA CTGAGGCCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGG CGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCA ACTCCATCAC TAGGGGTTCCCT
8	Нуклеотидная последовательность энхансера гена АМВР	GTTAATTTTTAAAAAGCAGTCAAAAGTCCAAGTG GCCCTTGGCAGCATTACTCTCTGTGTTGCTCTG GTTAATAATCTCAGGAGCACAAACATTCCTGGAG GCAGGAGAAGAAATCAACATCCTGGACTTATCCT CTGGGCCT
9	Нуклеотидная последовательность проксимального	GCATGCGTGAGTACTTGTGTGTA AATTTTTTCATT ATCTATAGGTAAAAGCACACTTGGAATTAGCAAT AGATGCAATTTGGGACTTAACTCTTTCAGTATGT

	энхансера гена hALB	<p>CTTATTTCTAAGCAAAGTATTTAGTTTGGTTAGTA ATTACTAAACACTGAGAACTAAATTGCAAACACC AAGAACTAAAATGTTCAAGTGGGAAATTACAGT TAAATACCATGGTAATGAATAAAAGGTACAAAT CGTTTAAACTCTTATGTAAAATTTGATAAGATGT TTTACACAACCTTAAATACATTGACAAGGTCTTGT GGAGAAAAC</p>
10	Нуклеотидная последовательность корового промотора гена hALB	<p>AGTTCAGATGGTAAATATACACAAGGGATTTAG TCAAACAATTTTTTGGCAAGAATATTATGAATTT TGTAATCGGTTGGCAGCCAATGAAATACAAAGA TGAGTCTAGTTAATAATCTACAATTATTGGTTAA AGAAGTATATTAGTGCTAATTTCCCTCCGTTTGTC CTAGCTTTTCTCTTCTGTCAACCCACACGCCTTT GGCAC</p>
11	Нуклеотидная последовательность интрона гена бета-глобина человека	<p>GTGAGTCTATGGGACCCTTGATGTTTTCTTTCCCC TTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTCATAGGAAG GGGAGAAGTAACAGGGTACAGTTTAGAATGGGA AACAGACGAATGATTGCATCAGTGTGGAAGTCTC AGGATCGTTTTAGTTTCTTTTATTTGCTGTTCATA ACAATTGTTTTCTTTGTTAATTCTTGCTTTCTTT TTTTTTCTTCTCCGCAATTTTTACTATTATACTTA ATGCCTTAACATTGTGTATAACAAAAGGAAATAT CTCTGAGATACATTAAGTAACTTAAAAAAAACCT TTACACAGTCTGCCTAGTACATTAATTTGGAA TATATGTGTGCTTATTTGCATATTCATAATCTCCC TACTTTATTTTCTTTTATTTTAATTGATACATAA TCATTATACATATTTATGGGTAAAGTGTAATGT TTAATATGTGTACACATATTGACCAAATCAGGG TAATTTTGCATTTGTAATTTTAAAAAATGCTTTCT TCTTTAATATACTTTTTTGTATCTTATTTCTAA TACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTCAGGGCAATAAT GATACAATGTATCATGCCTCTTTGCACCATTCTA AAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTAAAGGCA ATAGCAATATTTCTGCATATAAATATTTCTGCAT ATAAATTGTAACCTGATGTAAGAGGTTTCATATTG</p>

		<p>СТААТАGСAGCTACAATCCAGCTACCATTCTGCT TTTATTTTATGGTTGGGATAAGGCTGGATTATTCT GAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCATGTTC ATACCTCTTATCTTCCTCCCACAG</p>
12	<p>Нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид секреции белка IgVH</p>	<p>ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTGG CAACAGCTACAGGTGTGCACTCC</p>
13	<p>Нуклеотидная последовательность, кодирующая зрелый полипептид белка GСазы человека из генома вектора pAAV-GBA клон 128</p>	<p>GCCAGACCCTGCATCCCTAAGAGCTTTGGCTATA GTTCTGTGGTTTGTGTGTGCAATGCCACATACTG TGACTCATTGACCCTCCTACATTTCTGCACTGG GCACTTTCAGCAGGTATGAGTCTACCAGATCTGG CAGGAGGATGGAGCTGAGCATGGGGCCTATCCA GGCTAACCACACCGGCACAGGGCTGCTGCTGAC TCTGCAGCCCGAACAGAAATTCAGAAAGGTTAA GGGTTTTGGAGGAGCCATGACAGATGCAGCAGC CCTGAACATTTTGGCTCTCAGCCCTCCAGCTCAG AACCTGCTCCTTAAATCATACTTCAGTGAAGAAG GAATTGGCTACAACATCATAAGAGTACCCATGGC CAGCTGTGATTTTTCCATTAGAACCTACACTTAT GCTGATACTCCTGATGATTTTCAGCTGCACAACCT TTTCCCTCCCTGAAGAGGACACAAAGCTCAAGAT TCCCCTCATTACAGAGCCCTGCAACTGGCCCAG AGGCCTGTGTCCCTGCTGGCCAGCCCCTGGACAT CTCCAACATGGCTGAAAACCAATGGAGCAGTAA ATGGCAAAGGTTCCCTTAAGGGCCAGCCAGGAG ACATCTACCACCAAACCTGGGCCAGGTATTTTGT GAAGTTCCTGGATGCCTATGCAGAGCATAAGCTG CAGTTTTGGGCAGTGAAGTCTGAAAATGAACCCT CTGCTGGACTGCTCTCAGGGTATCCCTTCCAGTG CCTGGGATTTACTCCTGAGCACCAGAGAGATTTC ATTGCCAGAGACCTGGGGCCACCCTTGCCAACA GCACACACCACAATGTTAGACTGCTGATGCTGGA TGACCAGAGGCTGCTCCTTCCCCACTGGGCAAAA</p>

		<p>GTGGTGCTGACTGACCCAGAGGCCGCCAAGTAT GTCCATGGCATCGCCGTTTATTGGTACCTGGACT TCCTGGCCCCTGCCAAGGCCACCTTGGGGGAGAC ACATAGGCTCTTCCCCAACACCATGCTGTTTGCC TCAGAAGCCTGTGTGGGTTCCAAATTTTGGGAGC AGTCTGTTAGGCTGGGCTCCTGGGACAGGGGCAT GCAGTACAGCCATTCCATCATCACCAATCTGCTG TACCATGTGGTAGGCTGGACCGACTGGAATCTTG CCCTCAACCCAGAAGGTGGCCCCAACTGGGTGA GAAACTTCGTGGACAGCCCCATCATCGTGGATAT TACCAAAGACACCTTCTACAAGCAGCCCATGTTT TATCACCTGGGCCACTTCTCCAAGTTCATCCCTG AGGGAAGCCAGAGAGTGGGATTGGTTGCCTCCC AGAAGAATGATCTCGATGCTGTGGCCCTCATGCA CCCAGATGGCAGCGCAGTGGTAGTAGTACTGAA CAGGTCATCTAAGGATGTGCCTCTCACTATTTAA GATCCTGCAGTGGGCTTCTTGGAGACCATCAGCC CCGGATACAGCATCCACACCTACCTGTGGAGGA GACAGTGA</p>
14	Нуклеотидная последовательность полиА bGH	<p>CGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTT TGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAG GTGCCACTCCCCTGTCCCTTTCCTAATAAAATGA GGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCAT TCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC AAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCAT GCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG</p>
15	Нуклеотидная последовательность (флор- конфигурация) 3'- инвертированного концевого повтора (3'-ITR)	<p>AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTC TCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGA CCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGG GCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAG GGAGTGGCCAA</p>
16	Аминокислотная последовательность	<p>MGWSCILFLVATATGVHSARPCIPKSFYSSVVCV CNATYCDSFDPPTFPALGTFSRYESTRSGRRMELSM</p>

	<p>белка- предшественника GCазы человека, кодируемая трансгеном GCазы в геноме вектора pAAV-GBA клон 128 (последовательность сигнального пептида секреции IgVH)</p>	<p>GPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKGFGGAMTD AAALNILALSPPAQNLLLKSYFSEEGIGYNIIRVPMA SCDFSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEEDTKLKIPLI HRALQLAQRPVSLASPWTSPTWLKTNGAVNGKG SLKGQPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFWA VTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQRFIARDLG PTLANSTHHNVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDP EAAKYVHGIAVHWYLDLAPAKATLGETHRLFPN TMLFASEACVGSKFWEQSVRLGSWDRGMQYSHSII TNLLYHVVGWTDWNLALNPEGGPNWVRNFVDSPI IVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQRVGLVA SQKNLDLDAVALMHPDGSVVVVVLRSSKDVPLTI KDPAVGFLETISPGYSIHTYLRWRQ</p>
17	<p>Нуклеотидная последовательность генома вектора pAAV-GBA клон 128 (от 5'-ITR до 3'-ITR)</p>	<p>TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCA CTGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCCGGG CGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCAC TAGGGGTTTCCTTACGTACCTAGGCTCGAGAATTC GTTAATTTTTAAAAAGCAGTCAAAAGTCCAAGTG GCCCTTGGCAGCATTACTCTCTCTGTTTGCTCTG GTTAATAATCTCAGGAGCACAAACATTCCTGGAG GCAGGAGAAGAAATCAACATCCTGGACTTATCCT CTGGGCCTGGATCCGTTAATTTTTAAAAAGCAGT CAAAAGTCCAAGTGGCCCTTGGCAGCATTACTC TCTCTGTTTGCTCTGGTTAATAATCTCAGGAGCA CAAACATTCCTGGAGGCAGGAGAAGAAATCAAC ATCCTGGACTTATCCTCTGGGCCTCAGATCTGTT AACAGCATGCGTGAGTACTTGTGTGTAAATTTTT CATTATCTATAGGTAAGCACACTTGGAAATAG CAATAGATGCAATTTGGGACTTAACTCTTTCAGT ATGTCTTATTTCTAAGCAAAGTATTTAGTTTGTT AGTAATTAATAAACAACACTGAGAACTAAATTGCAA ACACCAAGAATAAAATGTTCAAGTGGGAAATT ACAGTTAAATACCATGGTAATGAATAAAAGGTA CAAATCGTTTAAACTCTTATGTAAATTTGATAA</p>

GATGTTTTACACAACCTTTAATACATTGACAAGGT
CTTGTGGAGAAAACAGTTCCAGATGGTAAATATA
CACAAGGGATTTAGTCAAACAATTTTTTGGCAAG
AATATTATGAATTTTGTAATCGGTTGGCAGCCAA
TGAAATACAAAGATGAGTCTAGTTAATAATCTAC
AATTATTGGTTAAAGAAGTATATTAGTGCTAATT
TCCCTCCGTTTGTCTAGCTTTTCTCTTCTGTCAA
CCCCACACGCCTTTGGCACTAGTCAGGTGAGTCT
ATGGGACCCTTGATGTTTTCTTTCCCTTCTTTTC
TATGGTTAAGTTCATGTCATAGGAAGGGGAGAA
GTAACAGGGTACAGTTTAGAATGGGAAACAGAC
GAATGATTGCATCAGTGTGGAAGTCTCAGGATCG
TTTTAGTTTCTTTTATTTGCTGTTTATAACAATTG
TTTTCTTTTGTTTAATTCTTGCTTCTTTTTTTTTCT
TCTCCGCAATTTTTACTATTATACTTAATGCCTTA
ACATTGTGTATAACAAAAGGAAATATCTCTGAGA
TACATTAAGTAACTTAAAAAAAAACTTTACACAG
TCTGCCTAGTACATTACTATTTGGAATATATGTGT
GCTTATTTGCATATTCATAATCTCCCTACTTTATT
TTCTTTTATTTTTAATTGATACATAATCATTATAC
ATATTTATGGGTAAAGTGTAATGTTTTAATATG
TGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTTGC
ATTTGTAATTTTAAAAAATGCTTTCTTCTTTAAT
ATACTTTTTTGTATCTTATTTCTAATACTTTCCC
TAATCTCTTTCTTTCAGGGCAATAATGATACAAT
GTATCATGCCTCTTTGCACCATTCTAAAGAATAA
CAGTGATAATTTCTGGGTAAAGGCAATAGCAATA
TTTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAAATTGTA
ACTGATGTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAG
CTACAATCCAGCTACCATTCTGCTTTTATTTTATG
GTTGGGATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGC
TAGGCCCTTTTGGCTAATCATGTTTCATACCTCTTAT
CTTCCTCCCACAGGTGTCGTTCTAGCACTATCAA
GCTTCCCTGGCCACCATGGGATGGAGCTGTATCA
TCCTCTTCTTGGTGGCAACAGCTACAGGTGTGCA

CTCCGCCAGACCCTGCATCCCTAAGAGCTTTGGC
TATAGTTCTGTGGTTTGTGTGTGCAATGCCACAT
ACTGTGACTCATTGACCCTCCTACATTTCCCTGCA
CTGGGCACTTTCAGCAGGTATGAGTCTACCAGAT
CTGGCAGGAGGATGGAGCTGAGCATGGGGCCTA
TCCAGGCTAACCACACCGGCACAGGGCTGCTGCT
GACTCTGCAGCCCGAACAGAAATTCCAGAAGGT
TAAGGGTTTTGGAGGAGCCATGACAGATGCAGC
AGCCCTGAACATTTTGGCTCTCAGCCCTCCAGCT
CAGAACCTGCTCCTTAAATCATACTTCAGTGAAG
AAGGAATTGGCTACAACATCATAAGAGTACCCA
TGGCCAGCTGTGATTTTTCCATTAGAACCTACAC
TTATGCTGATACTCCTGATGATTTTCAGCTGCAC
AACTTTTCCCTCCCTGAAGAGGACACAAAGCTCA
AGATTCCCCTCATTACAGAGCCCTGCAACTGGC
CCAGAGGCCTGTGTCCCTGCTGGCCAGCCCCTGG
ACATCTCCAACATGGCTGAAAACCAATGGAGCA
GTAAATGGCAAAGGTTCCCTTAAGGGCCAGCCA
GGAGACATCTACCACCAAACCTGGGGCCAGGTAT
TTTGTGAAGTTCCTGGATGCCTATGCAGAGCATA
AGCTGCAGTTTTGGGCAGTGACTGCTGAAAATGA
ACCCTCTGCTGGACTGCTCTCAGGGTATCCCTTC
CAGTGCCTGGGATTTACTCCTGAGCACCAGAGAG
ATTTCAATTGCCAGAGACCTGGGGCCCACCCTTGC
CAACAGCACACACCACAATGTTAGACTGCTGAT
GCTGGATGACCAGAGGCTGCTCCTTCCCCACTGG
GCAAAAGTGGTGCTGACTGACCCAGAGGCCGCC
AAGTATGTCCATGGCATCGCCGTTTCATTGGTACC
TGGACTTCCTGGCCCCTGCCAAGGCCACCTTGGG
GGAGACACATAGGCTCTTCCCCAACACCATGCTG
TTTGCCTCAGAAGCCTGTGTGGGTTCCAAATTTT
GGGAGCAGTCTGTTAGGCTGGGCTCCTGGGACA
GGGGCATGCAGTACAGCCATTCCATCATCACCAA
TCTGCTGTACCATGTGGTAGGCTGGACCGACTGG
AATCTTGCCCTCAACCCAGAAGGTGGCCCCAACT

		<p>GGGTGAGAACTTCGTGGACAGCCCCATCATCGT GGATATTACCAAAGACACCTTCTACAAGCAGCCC ATGTTTTATCACCTGGGCCACTTCTCCAAGTTCAT CCCTGAGGGAAGCCAGAGAGTGGGATTGGTTGC CTCCCAGAAGAATGATCTCGATGCTGTGGCCCTC ATGCACCCAGATGGCAGCGCAGTGGTAGTAGTA CTGAACAGGTCATCTAAGGATGTGCCTCTACTA TTAAAGATCCTGCAGTGGGCTTCTTGAGACCAT CAGCCCCGGATACAGCATCCACACCTACCTGTGG AGGAGACAGTGACATATGGCGACTGTGCCTTCTA GTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTG CCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTG TCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCA TTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGT GGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGG GAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTG GGCTCTATGGCTAGCGTACGCTTGTGGCAAACCT CGTCAGTCTTATTTTAAGAAATTGCCACAGCTAC CACCTGATCAGTCAGCAGCCAACAACAACGAG GCAAGATCCTCTGTCAGCAAAAAGATTTTGATTT GCTGCAGGCTCACAAGATTGTTAGCAATTTTAGC AATAAAGCAATTTTAAATTAAGTTATATACAAAT TATTAGACAAATTGCTATTGCACACTTAATAGAC TTTAGTGCTAACAAAACCTTTGTAGGCACTGGGA AACCAAAAATTGTTGCCGCTTGCTTTATTGAGT TGGTCTGGAACCTAACCTGTAGTATCTCCGAGGT TTGCCTGTATCTTTAATTGTAATTTGTCCTTCACA GCTAGCAGTACTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTT GGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACT GAGGCCGGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCG GGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGA GCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA</p>
18	ITR AAV2 (130 п. о.)	<p>aggaaaccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcctcgcctc tgaggccggggcgaccaaaggctgccccgacgccccgggctttgccccggcggc ctcagtgagcgagcgagcgcgag</p>

19	ITR AAV2 (130 п. о.)	ctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcggg cgaccttgggtgccccggcctcagtgagcagcagcgcgcagagagggagt ggccaactccatcactaggggtcct
20	Энхансер CMV и промотор гена бета-актина курицы	gacattgattattgactagttattaatagtaataactacggggtcattagttcatagc ccatataatggagtccgcgttacataactacggtaaatggcccgcctggctgacc gccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacg ccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggactattacggtaactgccca cttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatg acggtaaatggcccgcctggcattatgccagtacatgacctatgggactttcct acttggcagtacatctacgtattagtcacgctattaccatgggtcaggtgagcc ccaacttctgcttactctccccatctcccccccccccccccccaattttgtattt atftatttttaattattttgtgcagc gatgggggccccggggggggggggggcgcg gccagggccccggg aggtgcggcggcagccaatcagagcggcgcgctccgaaagtctctttatggc gagggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
21	Энхансер CMV	gacattgattattgactagttattaatagtaataactacggggtcattagttcatagc ccatataatggagtccgcgttacataactacggtaaatggcccgcctggctgacc gccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacg ccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggactattacggtaactgccca cttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatg acggtaaatggcccgcctggcattatgccagtacatgacctatgggactttcct acttggcagtacatctacgtattagtcacgctattaccatg
22	Промотор гена бета-актина курицы	tcgaggtgagccccacgttctgcttactctccccatctcccccccccccccccc ccaattttgtattttatttttttaattttttgtgcagc gatgggggccccgggggggg ggggggggsgcgcgccccgggggggggggggggggggggggggggggggggggg gggsgrggcgagaggtgcggcggcagccaatcagagcggcgcgctccgaa agtctctttatggcagggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc gccccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
23	Промотор SV40	gcattcattatgacgaaccatagtcggcccctaacctccgccatcccggccc ctaacctccggcagttccgccattctccggcccattgctgactaattttttattta tgcagaggccgagggcggcctcggcctctgagctattccagaagtagtgaggag gctttttggaggcctaggcttttgcaaa
24	Сигнал поли(A) SV40	taagatacattgatgagttggacaaccacaactagaatgcagtgaaaaaatg ctttatttgtaaatttgatgctattgctttatttgaaccattataagctgcaataaa caagtt

25	Сигнал поли(А) SV40	aacttgtttattgcagcttataatggttacaataaagcaatagcatcacaatttca caataaagcattttttcactgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgat cttatcatgtctggatc
26	Сигнал поли(А) гена бета-глобина кролика	aataaaggaaattattttcattgcaatagtgtgttggaatttttgtctctca
27	WPRE	aatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggattcttaactatgttgc tcctttacgctatgtggatacgcctttaatgcctttgatcatgctattgctcccg tatggctttcattttctcctccttgataaatcctggttgctgtctcttatgaggagtg tggcccgtgtcaggcaacgtggcgtggtgtgactgtgttctgacgcaaccc cactggttggggcattgccaccacctgcagctccttccgggactttcgctttcc ccctcctattgccagggcgaactcaccgcccctgcccgtgctggac aggggctcggctgttggcactgacaattccgtggtgttctggggaaatcatcg tcctttccttggctgctgcctgtgttggcactggattctgcgcgggacgtccttct gtacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccctcccgggcctgctgcc ggctctcggcctcttccgcgtcttgccttcgccctcagacgagtcggatctccc tttgggcccgcctccccgc
28	Глюкозилцерамидаза -бета (GBA) Homo sapiens, вариант 1 транскрипта; эталонная последовательность NCBI: NM_000157.4	ATGGAGTTTTCAAGTCCTTCCAGAGAGGAATGTC CCAAGCCTTTGAGTAGGGTAAGCATCATGGCTGG CAGCCTCACAGGATTGCTTCTACTTCAGGCAGTG TCGTGGGCATCAGGTGCCCGCCCCTGCATCCCTA AAAGCTTCGGCTACAGCTCGGTGGTGTGTGTCTG CAATGCCACATACTGTGACTCCTTTGACCCCCCG ACCTTTCCTGCCCTTGGTACCTTCAGCCGCTATG AGAGTACACGCAGTGGGCGACGGATGGAGCTGA GTATGGGGCCCATCCAGGCTAATCACACGGGCA CAGGCCTGCTACTGACCCTGCAGCCAGAACAGA AGTTCAGAAAGTGAAGGGATTTGGAGGGGCCA TGACAGATGCTGCTGCTCTCAACATCCTTGCCCT GTCACCCCCTGCCCAAATTTGCTACTTAAATCG TACTTCTCTGAAGAAGGAATCGGATATAACATCA TCCGGGTACCCATGGCCAGCTGTGACTTCTCCAT CCGCACCTACACCTATGCAGACACCCCTGATGAT TTCCAGTTGCACAACCTTCAGCCTCCCAGAGGAAG ATACCAAGCTCAAGATACCCCTGATTCACCGAGC

		<p>CCTGCAGTTGGCCCAGCGTCCCGTTTCACTCCTT GCCAGCCCCTGGACATCACCCACTTGGCTCAAGA CCAATGGAGCGGTGAATGGGAAGGGGTCCTCA AGGGACAGCCCGGAGACATCTACCACCAGACCT GGGCCAGATACTTTGTGAAGTTCCTGGATGCCTA TGCTGAGCACAAGTTACAGTTCTGGGCAGTGACA GCTGAAAATGAGCCTTCTGCTGGGCTGTTGAGTG GATACCCCTTCCAGTGCCTGGGCTTCACCCCTGA ACATCAGCGAGACTTCATTGCCCGTGACCTAGGT CCTACCCTCGCCAACAGTACTCACCACAATGTCC GCCTACTCATGCTGGATGACCAACGCTTGCTGCT GCCCCACTGGGCAAAGGTGGTACTGACAGACCC AGAAGCAGCTAAATATGTTTCATGGCATTGCTGTA CATTGGTACCTGGACTTTCTGGCTCCAGCCAAAG CCACCCTAGGGGAGACACACCGCCTGTTCCCCAA CACCATGCTCTTTGCCTCAGAGGCCTGTGTGGGC TCCAAGTTCTGGGAGCAGAGTGTGCGGCTAGGCT CCTGGGATCGAGGGATGCAGTACAGCCACAGCA TCATCACGAACCTCCTGTACCATGTGGTCGGCTG GACCGACTGGAACCTTGCCCTGAACCCCGAAGG AGGACCCAATTGGGTGCGTAACTTTGTCGACAGT CCCATCATTGTAGACATCACCAAGGACACGTTTT ACAAACAGCCCATGTTCTACCACCTTGGCCACTT CAGCAAGTTCATTCTGAGGGCTCCCAGAGAGTG GGGCTGGTTGCCAGTCAGAAGAACGACCTGGAC GCAGTGGCACTGATGCATCCCGATGGCTCTGCTG TTGTGGTCGTGCTAAACCGCTCCTCTAAGGATGT GCCTCTTACCATCAAGGATCCTGCTGTGGGCTTC CTGGAGACAATCTCACCTGGCTACTCCATTACA CCTACCTGTGGCGTCGCCAGTGA</p>
29	<p>Глюкозилцерамидаза -бета (GBA) Homo sapiens, вариант 2 транскрипта; эталонная</p>	<p>ATGGAGTTTTCAAGTCCTTCCAGAGAGGAATGTC CCAAGCCTTTGAGTAGGGTAAGCATCATGGCTGG CAGCCTCACAGGATTGCTTCTACTTCAGGCAGTG TCGTGGGCATCAGGTGCCCGCCCCTGCATCCCTA AAAGCTTCGGCTACAGCTCGGTGGTGTGTGTCTG</p>

последовательность NCBI: NM_001005741.3	CAATGCCACATACTGTGACTCCTTTGACCCCCCG ACCTTTCCTGCCCTTGGTACCTTCAGCCGCTATG AGAGTACACGCAGTGGGCGACGGATGGAGCTGA GTATGGGGCCCATCCAGGCTAATCACACGGGCA CAGGCCTGCTACTGACCCTGCAGCCAGAACAGA AGTTCAGAAAGTGAAGGGATTTGGAGGGGCCA TGACAGATGCTGCTGCTCTCAACATCCTTGCCCT GTCACCCCCTGCCAAAATTTGCTACTTAAATCG TACTTCTCTGAAGAAGGAATCGGATATAACATCA TCCGGGTACCCATGGCCAGCTGTGACTTCTCCAT CCGCACCTACACCTATGCAGACACCCCTGATGAT TTCCAGTTGCACAACCTTCAGCCTCCCAGAGGAAG ATACCAAGCTCAAGATACCCCTGATTCACCGAGC CCTGCAGTTGGCCCAGCGTCCCGTTTCACTCCTT GCCAGCCCCTGGACATCACCCACTTGGCTCAAGA CCAATGGAGCGGTGAATGGGAAGGGGTCACTCA AGGGACAGCCCGGAGACATCTACCACCAGACCT GGGCCAGATACTTTGTGAAGTTCCTGGATGCCTA TGCTGAGCACAAGTTACAGTTCTGGGCAGTGACA GCTGAAAATGAGCCTTCTGCTGGGCTGTTGAGTG GATACCCCTTCCAGTGCCTGGGCTTCACCCCTGA ACATCAGCGAGACTTCATTGCCCGTGACCTAGGT CCTACCCTCGCCAACAGTACTCACCACAATGTCC GCCTACTCATGCTGGATGACCAACGCTTGCTGCT GCCCCACTGGGCAAAGGTGGTACTGACAGACCC AGAAGCAGCTAAATATGTTTCATGGCATTGCTGTA CATTGGTACCTGGACTTTCTGGCTCCAGCCAAAG CCACCCTAGGGGAGACACACCCGCCTGTTCCCCAA CACCATGCTCTTTGCCTCAGAGGCCTGTGTGGGC TCCAAGTTCTGGGAGCAGAGTGTGCGGCTAGGCT CCTGGGATCGAGGGATGCAGTACAGCCACAGCA TCATCACGAACCTCCTGTACCATGTGGTCGGCTG GACCGACTGGAACCTTGCCCTGAACCCCGAAGG AGGACCCAATTGGGTGCGTAACTTTGTCGACAGT CCCATCATTGTAGACATCACCAAGGACACGTTTT
---	--

		<p>ACAAACAGCCCATGTTCTACCACCTTGGCCACTT CAGCAAGTTCATTCCTGAGGGCTCCCAGAGAGTG GGGCTGGTTGCCAGTCAGAAGAACGACCTGGAC GCAGTGGCACTGATGCATCCCGATGGCTCTGCTG TTGTGGTCGTGCTAAACCGCTCCTCTAAGGATGT GCCTCTTACCATCAAGGATCCTGCTGTGGGCTTC CTGGAGACAATCTCACCTGGCTACTCCATTCACA CCTACCTGTGGCGTCGCCAGTGA</p>
30	<p>Глюкозилцерамидаза -бета (GBA) Homo sapiens, вариант 3 транскрипта; эталонная последовательность NCBI: NM_001005742.3</p>	<p>ATGGAGTTTTCAAGTCCTTCCAGAGAGGAATGTC CCAAGCCTTTGAGTAGGGTAAGCATCATGGCTGG CAGCCTCACAGGATTGCTTCTACTTCAGGCAGTG TCGTGGGCATCAGGTGCCCGCCCCTGCATCCCTA AAAGCTTCGGCTACAGCTCGGTGGTGTGTGTCTG CAATGCCACATACTGTGACTCCTTTGACCCCCCG ACCTTTCCTGCCCTTGGTACCTTCAGCCGCTATG AGAGTACACGCAGTGGGCGACGGATGGAGCTGA GTATGGGGCCCATCCAGGCTAATCACACGGGCA CAGGCCTGCTACTGACCCTGCAGCCAGAACAGA AGTTCAGAAAGTGAAGGGATTTGGAGGGGCCA TGACAGATGCTGCTGCTCTCAACATCCTTGCCCT GTCACCCCCTGCCCAAATTTGCTACTTAAATCG TACTTCTCTGAAGAAGGAATCGGATATAACATCA TCCGGGTACCCATGGCCAGCTGTGACTTCTCCAT CCGCACCTACACCTATGCAGACACCCCTGATGAT TTCCAGTTGCACAACCTTCAGCCTCCCAGAGGAAG ATACCAAGCTCAAGATACCCCTGATTCACCGAGC CCTGCAGTTGGCCCAGCGTCCCGTTTCACTCCTT GCCAGCCCCTGGACATCACCCACTTGGCTCAAGA CCAATGGAGCGGTGAATGGGAAGGGGTCACTCA AGGGACAGCCCGGAGACATCTACCACCAGACCT GGGCCAGATACTTTGTGAAGTTCCTGGATGCCTA TGCTGAGCACAAGTTACAGTTCTGGGCAGTGACA GCTGAAAATGAGCCTTCTGCTGGGCTGTTGAGTG GATACCCCTTCCAGTGCCTGGGCTTCACCCCTGA ACATCAGCGAGACTTCATTGCCCGTGACCTAGGT</p>

		<p>CCTACCCTCGCCAACAGTACTCACCACAATGTCC GCCTACTCATGCTGGATGACCAACGCTTGCTGCT GCCCCACTGGGCAAAGGTGGTACTGACAGACCC AGAAGCAGCTAAATATGTTTCATGGCATTGCTGTA CATTGGTACCTGGACTTTCTGGCTCCAGCCAAAG CCACCCTAGGGGAGACACACCGCCTGTTCCCAA CACCATGCTCTTTGCCTCAGAGGCCTGTGTGGGC TCCAAGTTCTGGGAGCAGAGTGTGCGGCTAGGCT CCTGGGATCGAGGGATGCAGTACAGCCACAGCA TCATCACGAACCTCCTGTACCATGTGGTCGGCTG GACCGACTGGAACCTTGCCCTGAACCCCGAAGG AGGACCCAATTGGGTGCGTAACTTTGTCGACAGT CCCATCATTGTAGACATCACCAAGGACACGTTTT ACAAACAGCCCATGTTCTACCACCTTGGCCACTT CAGCAAGTTCATTCCTGAGGGCTCCAGAGAGTG GGGCTGGTTGCCAGTCAGAAGAACGACCTGGAC GCAGTGGCACTGATGCATCCCGATGGCTCTGCTG TTGTGGTCGTGCTAAACCGCTCCTCTAAGGATGT GCCTCTTACCATCAAGGATCCTGCTGTGGGCTTC CTGGAGACAATCTCACCTGGCTACTCCATTCACA CCTACCTGTGGCGTCGCCAGTGA</p>
31	<p>Глюкозилцерамидаза -бета (GBA) Homo sapiens, вариант 4 транскрипта; эталонная последовательность NCBI: NM_001171811.2</p>	<p>ATGGAGCTGAGTATGGGGCCATCCAGGCTAATC ACACGGGCACAGGCCTGCTACTGACCCTGCAGC CAGAACAGAAGTTCAGAAAGTGAAGGGATTTG GAGGGGCCATGACAGATGCTGCTGCTCTCAACAT CCTTGCCCTGTCACCCCCTGCCCAAATTTGCTA CTTAAATCGTACTTCTCTGAAGAAGGAATCGGAT ATAACATCATCCGGGTACCCATGGCCAGCTGTGA CTTCTCCATCCGCACCTACACCTATGCAGACACC CCTGATGATTTCCAGTTGCACA ACTTCAGCCTCC CAGAGGAAGATACCAAGCTCAAGATACCCCTGA TTCACCGAGCCCTGCAGTTGGCCCAGCGTCCCGT TTCACCTCCTTGCCAGCCCCTGGACATCACCCACT TGGCTCAAGACCAATGGAGCGGTGAATGGGAAG GGGTCACCTCAAGGGACAGCCCGGAGACATCTAC</p>

		<p>CACCAGACCTGGGCCAGATACTTTGTGAAGTTCC TGGATGCCTATGCTGAGCACAAGTTACAGTTCTG GGCAGTGACAGCTGAAAATGAGCCTTCTGCTGG GCTGTTGAGTGGATAACCCCTTCCAGTGCCTGGGC TTCACCCCTGAACATCAGCGAGACTTCATTGCC GTGACCTAGGTCTACCCTCGCCAACAGTACTCA CCACAATGTCCGCCTACTCATGCTGGATGACCAA CGCTTGCTGCTGCCCCACTGGGCAAAGGTGGTAC TGACAGACCCAGAAGCAGCTAAATATGTTTCATG GCATTGCTGTACATTGGTACCTGGACTTTCTGGC T CCAGCCAAAGCCACCCTAGGGGAGACACACCGC CTGTTCCCAACACCATGCTCTTTCGCTCAGAGG CCTGTGTGGGCTCCAAGTTCTGG GAGCAGAGTGTGCGGCTAGGCTCCTGGGATCGA GGGATGCAGTACAGCCACAGCATCATCACGAAC CTCCTGTACCATGTGGTTCGGCTGGACCGACTGGA ACCTTGCCCTGAACCCCGAAGGAGGACCCAATT GGGTGCGTAACTTTGTCGACAGTCCCATCATTGT AGACATCACCAAGGACACGTTTTACAAACAGCC CATGTTCTACCACCTTGGCCACTTCAGCAAGTTC ATTCCTGAGGGCTCCCAGAGAGTGGGGCTGGTTG CCAGTCAGAAGAACGACCTGGACGCAGTGGCAC TGATGCATCCCGATGGCTCTGCTGTTGTGGTCGT GCTAAACCGCTCCTCTAAGGATGTGCCTCTTACC ATCAAGGATCCTGCTGTGGGCTTCCTGGAGACAA TCTCACCTGGCTACTCCATTCACACCTACCTGTG GCGTCGCCAGTGA</p>
32	<p>Глюкозилцерамидаза -бета (GBA) Homo sapiens, вариант 5 транскрипта; эталонная последовательность NCBI:</p>	<p>ATGGAGTTTTCAAGTCCTTCCAGAGAGGAATGTC CCAAGCCTTTGAGTAGGGTAAGCATCATGGCTGG CAGCCTCACAGGATTGCTTCTACTTCAGGCAGTG TCGTGGGCATCAGGTGCCCCGCCCTGCATCCCTA AAAGCTTCGGCTACAGCTCGGTGGTGTGTGTCTG CAATGCCACATACTGTGACTCCTTTGACCCCCCG ACCTTTCCTGCCCTTGGTACCTTCAGCCGCTATG</p>

NM_001171812.2	AGAGTACACGCAGTGGGCGACGGATGGAGCTGA GTATGGGGCCCATCCAGGCTAATCACACGGGCA CAGGAATCGGATATAACATCATCCGGGTACCCAT GGCCAGCTGTGACTTCTCCATCCGCACCTACACC TATGCAGACACCCCTGATGATTTCCAGTTGCACA ACTTCAGCCTCCCAGAGGAAGATAACCAAGCTCA AGATACCCCTGATTCACCGAGCCCTGCAGTTGGC CCAGCGTCCCGTTTCACTCCTTGCCAGCCCCTGG ACATCACCCACTTGGCTCAAGACCAATGGAGCG GTGAATGGGAAGGGGTCACTCAAGGGACAGCCC GGAGACATCTACCACCAGACCTGGGCCAGATAC TTTGTGAAGTTCCTGGATGCCTATGCTGAGCACA AGTTACAGTTCTGGGCAGTGACAGCTGAAAATG AGCCTTCTGCTGGGCTGTTGAGTGGATACCCCTT CCAGTGCCTGGGCTTCACCCCTGAACATCAGCGA GACTTCATTGCCCGTGACCTAGGTCCTACCCTCG CCAACAGTACTCACCACAATGTCCGCCTACTCAT GCTGGATGACCAACGCTTGCTGCTGCCCCACTGG GCAAAGGTGGTACTGACAGACCCAGAAGCAGCT AAATATGTTTCATGGCATTGCTGTACATTGGTACC TGGACTTTCTGGCTCCAGCCAAAGCCACCCTAGG GGAGACACACCGCCTGTTCCCCAACACCATGCTC TTTGCCTCAGAGGCCTGTGTGGGCTCCAAGTTCT GGGAGCAGAGTGTGCGGCTAGGCTCCTGGGATC GAGGGATGCAGTACAGCCACAGCATCATCACGA ACCTCCTGTACCATGTGGTCGGCTGGACCGACTG GAACCTTGCCCTGAACCCCGAAGGAGGACCCAA TTGGGTGCGTAACTTTGTGCGACAGTCCCATCATT GTAGACATCACCAAGGACACGTTTTACAAACAG CCCATGTTCTACCACCTTGGCCACTTCAGCAAGT TCATTCTGAGGGCTCCCAGAGAGTGGGGCTGGT TGCCAGTCAGAAGAACGACCTGGACGCAGTGGC ACTGATGCATCCCGATGGCTCTGCTGTTGTGGTC GTGCTAAACCGCTCCTCTAAGGATGTGCCTCTTA CCATCAAGGATCCTGCTGTGGGCTTCTGGAGAC
----------------	--

		AATCTCACCTGGCTACTCCATTACACCTACCTG TGGCGTCGCCAGTGA
33	WO2019070894_15	ATGGAATTCAGCAGCCCCAGCAGAGAGGAATGC CCCAAGCCTCTGAGCCGGGTGTCAATCATGGCCG GATCTCTGACAGGACTGCTGCTGCTTCAGGCCGT GTCTTGGGCTTCTGGCGCTAGACCTTGCATCCCC AAGAGCTTCGGCTACAGCAGCGTCGTGTGCGTGT GCAATGCCACCTACTGCGACAGCTTCGACCCTCC TACCTTTCCTGCTCTGGGCACCTTCAGCAGATAC GAGAGCACCAGATCCGGCAGACGGATGGAAGTGT AGCATGGGACCCATCCAGGCCAATCACACAGGC ACTGGCCTGCTGCTGACACTGCAGCCTGAGCAGA AATTCCAGAAAGTGAAAGGCTTCGGCGGAGCCA TGACAGATGCCGCCGCTCTGAATATCCTGGCTCT GTCTCCACCAGCTCAGAACCTGCTGCTCAAGAGC TACTTCAGCGAGGAAGGCATCGGCTACAACATC ATCAGAGTGCCCATGGCCAGCTGCGACTTCAGCA TCAGGACCTACACCTACGCCGACACACCCGACG ATTTCCAGCTGCACA ACTTCAGCCTGCCTGAAGA GGACACCAAGCTGAAGATCCCTCTGATCCACAG AGCCCTGCAGCTGGCACAAAGACCCGTGTCACT GCTGGCCTCTCCATGGACATCTCCACCTGGCTG AAAACAAATGGCGCCGTGAATGGCAAGGGCAGC CTGAAAGGCCAACCTGGCGACATCTACCACCAG ACCTGGGCCAGATACTTCGTGAAGTTCCTGGACG CCTATGCCGAGCACAAGCTGCAGTTTTGGGCCGT GACAGCCGAGAACGAACCTTCTGCTGGACTGCT GAGCGGCTACCCCTTTCAGTGCCTGGGCTTTACA CCCGAGCACCAGCGGGACTTTATCGCCCGTGATC TGGGACCCACACTGGCCAATAGCACCCACCATA ATGTGCGGCTGCTGATGCTGGACGACCAGAGACT GCTTCTGCCCCACTGGGCTAAAGTGGTGCTGACA GATCCTGAGGCCGCCAAATACGTGCACGGAATC GCCGTGCACTGGTATCTGGACTTTCTGGCCCCTG CCAAGGCCACACTGGGAGAGACACACAGACTGT

		<p>TCCCCAACACCATGCTGTTTCGCCAGCGAAGCCTG TGTGGGCAGCAAGTTTTGGGAACAGAGCGTGCG GCTCGGCAGCTGGGATAGAGGCATGCAGTACAG CCACAGCATCATCACCAACCTGCTGTACCACGTC GTCGGCTGGACCGACTGGAATCTGGCCCTGAATC CTGAAGGCGGCCCTAACTGGGTCCGAACTTCGT GGACAGCCCCATCATCGTGGACATCACCAAGGA CACCTTCTACAAGCAGCCCATGTTCTACCACCTG GGACACTTCAGCAAGTTCATCCCCGAGGGCTCTC AGCGCGTTGGACTGGTGGCTTCCCAGAAGAACG ATCTGGACGCCGTGGCTCTGATGCACCCTGATGG ATCTGCTGTGGTGGTGGTCCTGAACCGCAGCAGC AAAGATGTGCCCTGACCATCAAGGATCCCGCC GTGGGATTCCTGGAAACAATCAGCCCTGGCTACT CCATCCACACCTACCTGTGGCGTAGACAG</p>
34	WO2020012164_13	<p>ATGGAGTTCAGCTCCCCTTCTAGGGAGGAGTGCC CTAAGCCACTGTCTCGCGTGAGCATCATGGCAGG AAGCCTGACCGGACTGCTGCTGCTGCAGGCCGTG TCCTGGGCATCTGGAGCAAGGCCCTGCATCCCTA AGTCCTTCGGCTACTCTAGCGTGGTGTGCGTGTG CAACGCCACCTATTGTGACTCCTTCGATCCCCCT ACCTTTCCCGCCCTGGGCACATTTTCTCGGTACG AGAGCACAAGATCCGGCCGGAGAATGGAGCTGT CTATGGGCCCCATCCAGGCCAATCACACCGGAA CAGGACTGCTGCTGACCCTGCAGCCTGAGCAGA AGTTCAGAAAGGTGAAGGGCTTTGGAGGAGCAA TGACAGACGCAGCCGCCCTGAACATCCTGGCCCT GAGCCCACCCGCCAGAATCTGCTGCTGAAGTCT TACTTCAGCGAGGAGGGCATCGGCTATAACATCA TCCGGGTGCCAATGGCCTCCTGTGACTTTTCTATC AGAACCTACACATATGCCGATAACCCCGACGATT TCCAGCTGCACAATTTTCCCTGCCTGAGGAGGA TACAAAGCTGAAGATCCCACTGATCCACAGGGC CCTGCAGCTGGCACAGAGGCCTGTGAGCCTGCTG GCATCCCCATGGACCTCTCCCACATGGCTGAAGA</p>

		<p> CCAACGGCGCCGTGAATGGCAAGGGAAGCCTGA AGGGACAGCCAGGCGACATCTACCACCAGACAT GGGCCCGGTATTTTCGTGAAGTTTCTGGATGCCTA CGCCGAGCACAAGCTGCAGTTCTGGGCAGTGAC CGCAGAGAACGAGCCATCTGCCGGACTGCTGAG CGGATATCCATTCCAGTGCCTGGGCTTTACACCC GAGCACCAGAGGGACTTTATCGCAAGGGATCTG GGACCTACCCTGGCCAACTCCACACACCACAATG TGCGGCTGCTGATGCTGGACGATCAGAGACTGCT GCTGCCCCACTGGGCCAAGGTGGTGCTGACCGA CCCTGAGGCCGCCAAGTACGTGCACGGCATCGC CGTGCACTGGTATCTGGATTTCTGGCACCAGCA AAGGCCACCCTGGGAGAGACACACAGGCTGTTC CCCAACACCATGCTGTTTGCCAGCGAGGCCTGCG TGGGCTCCAAGTTTTGGGAGCAGTCCGTGCGGCT GGGATCTTGGGACAGAGGCATGCAGTACAGCCA CTCCATCATCACCAATCTGCTGTATCACGTGGTG GGCTGGACAGACTGGAACCTGGCCCTGAATCCT GAGGGCGGCCCAAACCTGGGTGAGAAATTTTCGTG GATAGCCCCATCATCGTGGACATCACCAAGGAT ACATTCTACAAGCAGCCTATGTTTTATCACCTGG GCCACTTCTCTAAGTTTATCCCAGAGGGAAGCCA GAGGGTGGGACTGGTGGCAAGCCAGAAGAACGA CCTGGATGCCGTGGCCCTGATGCACCCAGATGGC TCCGCCGTGGTGGTGGTGTGAATCGCTCCTCTA AGGACGTGCCCTGACCATCAAGGATCCTGCCGT GGGCTTTCTGGAGACCATCAGCCCCGGCTACTCC ATCCACACATATCTGTGGAGGGCGCCAGTGA </p>
35	WO2020012164_14	<p> ATGGAGTTCTCTTCTCCATCTCGCGAGGAGTGCC CTAAGCCACTGAGTCGAGTGTCTATCATGGCCGG CAGTCTGACAGGACTCCTCCTCCTACAAGCTGTG TCTTGGGCCAGTGGCGCCCCGGCCATGCATCCCAA AGTCTTTCGGGTACTCTAGCGTGGTGTGCGTGTG CAACGCTACATACTGCGACTCTTTCGACCCACCT ACATTCCCCGCCCTGGGAACCTTCAGCCGATACG </p>

AGTCTACACGGTCCGGGCGGGCGCATGGAGCTGT
CAATGGGGCCAATTCAGGCTAACCACACCGGAA
CAGGACTCCTGCTGACATTACAACCCGAGCAGA
AGTTCAGAAGGTGAAGGGGTTTCGGCGGAGCTA
TGACCGACGCTGCCGCTCTGAACATTCTGGCCCT
GTCCCCACCCGCTCAGAACCTGCTCCTCAAGTCT
TACTTCAGCGAGGAGGGAATCGGGTACAACATT
ATTAGAGTGCCTATGGCTTCTTGCGACTTCAGCA
TCCGCACATACATACGCCGACACCCCTGACGA
CTTCCAGCTGCACAACCTCAGCCTCCCAGAGGAG
GACACAAAGCTCAAGATCCCCTGATTCACCGC
GCTTTACAGCTCGCTCAGAGGCCAGTGTCTCTGC
TCGCTTCCCCTTGGACATCTCCAACATGGTTAAA
AACAAACGGCGCCGTGAACGGAAAGGGGTCCT
GAAGGGGCAGCCCGGAGACATTTACCACCAGAC
ATGGGCCAGGTACTTCGTGAAGTTCCTCGACGCT
TACGCTGAGCACAAGCTCCAGTTCTGGGCCGTGA
CCGCCGAGAACGAGCCTAGCGCCGGCCTGCTGT
CCGGATACCCTTCCAGTGCCTCGGATTCACACC
AGAGCACCAGCGGGACTTCATTGCTAGAGACCT
CGGGCCAACACTCGCTAACTCTACCCACCACAAC
GTGAGACTGCTGATGCTCGACGACCAGCGCCTCC
TGCTGCCTCACTGGGCTAAGGTGGTGCTCACAGA
CCCCGAGGCCGCCAAGTACGTGCACGGAATTGC
CGTGCACTGGTATCTCGACTTCCTCGCCCCAGCT
AAGGCTACACTCGGCGAGACCCACAGGCTGTTC
CCTAACACAATGCTGTTCGCCAGCGAGGCTTGCG
TGGGAAGCAAGTTCTGGGAGCAGTCCGTGAGAC
TCGGATCTTGGGACCGCGGAATGCAGTACTCTCA
CTCTATCATTACAAACCTCCTGTACCACGTGGTG
GGATGGACCGACTGGAACCTGGCTCTCAACCCC
GAGGGCGGCCCAAACCTGGGTGAGAACTTCGTG
GACAGCCCTATTATTGTGGACATTACAAAGGACA
CCTTCTACAAGCAGCCTATGTTCTACCACCTCGG
GCACTTCAGCAAGTTCATCCCCGAGGGATCTCAG

		<p>AGAGTGGGACTGGTGGCCTCTCAGAAGAACGAC CTCGACGCTGTGGCTCTGATGCACCCTGACGGGT CGGCCGTGGTGGTGGTGGTCAACCGATCTAGCAA GGACGTGCCACTGACAATTAAGGACCCCGCCGT GGGGTTCCCTGGAGACAATTAGCCCCGGATACTCC ATTCACACATACTGTGGCGCAGGCAGTGA</p>
36	WO2020012164_15	<p>ATGGAGTTTAGCAGCCCTAGCAGAGAAGAGTGC CCTAAGCCTCTGTCTCGTGTGAGCATCATGGCCG GCTCCTTAACCGGATTATTACTGCTGCAAGCTGT GTCTTGGGCTTCCGGCGCTAGGCCTTGTATTCCC AAGTCCTTCGGCTACTCCTCCGTGGTGTGCGTCT GTAATGCCACCTACTGTGACAGCTTCGATCCCC CACATTCCCCGCTCTGGGCACATTTTCTCGTTAC GAAAGCACTCGTAGCGGAAGGAGGATGGAGCTG AGCATGGGCCCTATTCAAGCTAACACACCCGGC ACCGGTTTATTACTGACTTTACAACCCGAGCAGA AGTTCCAGAAGGTGAAGGGCTTTGGAGGCGCCA TGACAGACGCCGCCGCTTTAAATATTCTGGCTTT AAGCCCTCCCGCCCAAATCTGCTGCTGAAGTCC TACTTCTCCGAGGAAGGCATCGGCTACAACATCA TTAGGGTCCCTATGGCCTCTTGTGACTTCAGCATT AGGACCTACACCTACGCCGACACCCCGACGAC TTCCAGCTGCACAACCTTCTCTTTACCCGAGGAGG ATACAAAGCTGAAGATCCCTTTAATCCATCGTGC CCTCCAGCTGGCTCAGAGGCCCGTTAGCTTATTA GCCTCCCCTTGGACATCCCCTACTTGGCTGAAAA CCAACGGCGCTGTCAACGGAAAGGGCTCTTTAA AGGGACAGCCCGGCGACATTTACCACCAGACAT GGGCTAGGTACTTCGTGAAGTTTTTAGACGCTTA TGCCGAACACAAGCTGCAGTTCTGGGCCGTGACC GCTGAGAACGAGCCTTCCGCCGGTTTACTGTCCG GATACCCCTTCCAATGTCTGGGATTCACCCCGA ACACCAGAGGGACTTCATCGCCAGAGATCTGGG CCCCACACTGGCCAATTCCACACACCACAACGTG AGACTGCTCATGCTGGACGACCAGAGGTTATTAC</p>

		<p>TCCCTCACTGGGCCAAAGTGGTGCTGACCGACCC CGAAGCTGCCAAGTATGTGCATGGAATCGCCGTG CACTGGTATCTGGACTTTCTGGCCCCCGCCAAGG CTACTGGGCGAGACCCACAGACTGTTCCCTAA CACCATGCTCTTCGCCAGCGAAGCTTGCGTGGGA AGCAAGTTCTGGGAGCAATCCGTGAGGCTGGGC AGCTGGGATCGTGGCATGCAGTACTCCCACTCCA TTATCACAAATCTGCTCTACCACGTCGTGGGATG GACCGATTGGAATTTAGCTCTGAACCCCGAGGGA GGCCCCAATTGGGTGAGGAACTTCGTGGATTCCC CCATCATCGTCGATATCACCAAGGACACATTCTA CAAGCAGCCCATGTTCTACCATTTAGGCCACTTT AGCAAGTTCATCCCCGAGGGAAGCCAGAGAGTG GGTTTAGTGGCCTCCCAGAAGAACGATCTGGACG CCGTCGCCCTCATGCATCCCGATGGCAGCGCTGT GGTCGTCGTGCTGAATAGAAGCTCCAAAGACGTC CCTTTAACCATCAAGGACCCCGCCGTGGGCTTTC TGGAACCATCTCCCCGGTTATAGCATCCACAC CTATTTATGGAGAAGACAGTAA</p>
37	WO2020012164_16	<p>ATGGAATTTTCTAGCCCCTCCAGAGAGGAATGCC CCAAGCCTCTGAGCCGGGTGTCAATCATGGCCGG ATCTCTGACAGGACTGCTGCTGCTTCAGGCCGTG TCTTGGGCTTCTGGCGCTAGACCTTGCATCCCCA AGAGCTTCGGCTACAGCAGCGTCGTGTGCGTGTG CAATGCCACCTACTGCGACAGCTTCGACCCTCCT ACCTTTCCTGCTCTGGGCACCTTCAGCAGATACG AGAGCACCAGATCCGGCAGACGGATGGAAGTGA GCATGGGACCCATCCAGGCCAATCACACAGGCA CTGGCCTGCTGCTGACACTGCAGCCCGAGCAGA AATTCCAGAAAGTGAAAGGCTTCGGCGGAGCCA TGACAGATGCCGCCGCTCTGAATATCCTGGCTCT GTCTCCACCAGCTCAGAACCTGCTGCTCAAGAGC TACTTCAGCGAGGAAGGCATCGGCTACAACATC ATCAGAGTGCCCATGGCCAGCTGCGACTTCAGCA TCAGGACCTACACCTACGCCGACACACCCGACG</p>

		<p> ATTTCCAGCTGCACAACCTTCAGCCTGCCTGAAGA GGACACCAAGCTGAAGATCCCTCTGATCCACAG AGCCCTGCAGCTGGCACAAAGACCCGTTTCTCTG CTGGCTAGCCCCTGGACATCTCCACCTGGCTGA AAACAAATGGCGCCGTGAATGGCAAGGGCAGCC TGAAAGGCCAACCTGGCGATATCTACCACCAGA CCTGGGCCAGATACTTCGTGAAGTTCCTGGACGC CTATGCCGAGCACAAGCTGCAGTTTTGGGCCGTG ACAGCCGAGAACGAACCTTCTGCTGGACTGCTG AGCGGCTACCCCTTTCAGTGCCTGGGCTTTACAC CCGAGCACCAGCGGGACTTTATCGCCAGAGATCT GGGACCCACACTGGCCAATAGCACCCACCATAA TGTGCGGCTGCTGATGCTGGACGACCAGAGACTG CTTCTGCCCCACTGGGCTAAAGTGGTGCTGACAG ATCCTGAGGCCGCCAAATACGTGCACGGAATCG CCGTGC ACTGGTATCTGGACTTTCTGGCCCCTGC CAAGGCCACACTGGGAGAGACACACAGACTGTT CCCAACACCATGCTGTTTCGCCAGCGAAGCCTGT GTGGGCAGCAAGTTTTGGGAACAGAGCGTGCGG CTCGGCAGCTGGGATAGAGGCATGCAGTACAGC CACAGCATCATCACCAACCTGCTGTACCACGTCG TCGGCTGGACCGACTGGAATCTGGCCCTGAATCC TGAAGGCGGCCCTAACTGGGTCCGAACTTCGTG GACAGCCCCATCATCGTGGACATCACCAAGGAC ACCTTCTACAAGCAGCCCATGTTCTACCACCTGG GACTTTCAGCAAGTTCATCCCCGAGGGCTCTCA GCGCGTTGGACTGGTGGCCAGCCAGAAGAATGA TCTGGACGCCGTGGCTCTGATGCACCCTGATGGA TCTGCTGTGGTGGTGGTCCTGAACCGGTCCAGCA AAGATGTGCCCTGACCATCAAGGATCCCGCCGT GGGATTCTGGAAACAATCAGCCCTGGCTACTCC ATCCACACCTACCTGTGGCGGAGACAGTAG </p>
38	Аминокислотная последовательность сигнального пептида	MGWSCIIIFLVATATGVHS

	секреции тяжелой цепи IgG, кодируемая SEQ ID NO:12	
39	Аминокислотная последовательность сигнального пептида секреции изоформы 1 белка GCазы человека (кодируется эталонной последовательностью NCBI: NM_000157.4)	MEFSSPSREECPKPLSRV SIMAGSLTG LLLLQAVSW ASG
40	Аминокислотная последовательность зрелого полипептида изоформы 1 белка GCазы человека (кодируется эталонной последовательностью NCBI: NM_000157.4)	ARPCIPKSF GYSSVVCVCNATYCD SFDPP TFPALGT FSRYESTRSGRRMELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPE QKFQKVKGF GGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLKS YFSEEGIGYNIIRVPMASCD FSIRTYTYADTPDDFQL HNFSLPEEDTKLKIPLIHRALQLAQRPV SLLASPWT SPTWLKTNGAVNGK GSKGQPGDIYHQTWARYFV KFLDAYAEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCL GFTPEHQ RDFIARDLGPTLANSTHHNV RLLMLDDQ RLLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGIAVHWYLDFLA PAKATLGETHRLFPNTMLFA SEACVGSKFWEQSVR LGSWDRGMQYSHSITNLLYHVVGWTDWNLALNP EGGPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGH FSKFIPEGSQRVGLVASQKNDLDAVALMHPDGS AV VVVLNRSSKDVPLTIKDP AVGFLETISPGYSIHTYL WRRQ
41	Нуклеотидная последовательность, кодирующая белок-предшественник GCазы человека	ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTGG CAACAGCTACAGGTGTGCACTCCGCCAGACCCTG CATCCCTAAGAGCTTTGGCTATAGTTCTGTGGTTT GTGTGTGCAATGCCACATACTGTGACTCATTGA CCCTCCTACATTTCTGCACTGGGCACTTTCAGC

<p>(SEQ ID NO:16); в рамке считывания комбинация SEQ ID NO:12 и SEQ ID NO:13</p>	<p>AGGTATGAGTCTACCAGATCTGGCAGGAGGATG GAGCTGAGCATGGGGCCTATCCAGGCTAACCAC ACCGGCACAGGGCTGCTGCTGACTCTGCAGCCCG AACAGAAATTCCAGAAGGTTAAGGGTTTTGGAG GAGCCATGACAGATGCAGCAGCCCTGAACATTTT GGCTCTCAGCCCTCCAGCTCAGAACCTGCTCCTT AAATCATACTTCAGTGAAGAAGGAATTGGCTAC AACATCATAAGAGTACCCATGGCCAGCTGTGATT TTCCATTAGAACCCTACACTTATGCTGATACTCCT GATGATTTTCAGCTGCACAACCTTTCCCTCCCTGA AGAGGACACAAAGCTCAAGATTCCTCATTAC AGAGCCCTGCAACTGGCCCAGAGGCCTGTGTCCC TGCTGGCCAGCCCCTGGACATCTCCAACATGGCT GAAAACCAATGGAGCAGTAAATGGCAAAGGTTC CCTTAAGGGCCAGCCAGGAGACATCTACCACCA AACCTGGGCCAGGTATTTTGTGAAGTTCCTGGAT GCCTATGCAGAGCATAAGCTGCAGTTTGGGCAG TGA CTGCTGAAAATGAACCCTCTGCTGGACTGCT CTCAGGGTATCCCTTCCAGTGCCTGGGATTTACT CCTGAGCACCAGAGAGATTTCA TTGCCAGAGAC CTGGGGCCCACCCTTGCCAACAGCACACACCAC AATGTTAGACTGCTGATGCTGGATGACCAGAGGC TGCTCCTTCCCCACTGGGCAAAAGTGGTGCTGAC TGACCCAGAGGCCGCCAAGTATGTCCATGGCATC GCCGTTCA TTGGTACCTGGACTTCCTGGCCCCTG CCAAGGCCACCTTGGGGGAGACACATAGGCTCT TCCCCAACACCATGCTGTTTGCCTCAGAAGCCTG TGTGGGTTCCAAATTTTGGGAGCAGTCTGTTAGG CTGGGCTCCTGGGACAGGGGCATGCAGTACAGC CATTCATCATCACC AATCTGCTGTACCATGTGG TAGGCTGGACCGACTGGAATCTTGCCCTCAACCC AGAAGGTGGCCCCA ACTGGGTGAGAACTTCGT GGACAGCCCCATCATCGTGGATATTACCAAAGA CACCTTCTACAAGCAGCCCATGTTTTATCACCTG GGCCACTTCTCCAAGTTCATCCCTGAGGGAAGCC</p>
--	--

		AGAGAGTGGGATTGGTTGCCTCCCAGAAGAATG ATCTCGATGCTGTGGCCCTCATGCACCCAGATGG CAGCGCAGTGGTAGTAGTACTGAACAGGTCATCT AAGGATGTGCCTCTCACTATTAAGATCCTGCAG TGGGCTTCTTGGAGACCATCAGCCCCGGATACAG CATCCACACCTACCTGTGGAGGAGACAGTGA
42	Область контроля транскрипции, содержащая два AMBP ehn, hALB прох ehn и hALB pro	GTTAATTTTTAAAAAGCAGTCAAAAGTCCAAGTG GCCCTTGGCAGCATTACTCTCTCTGTTTGCTCTG GTTAATAATCTCAGGAGCACAAACATTCCTGGAG GCAGGAGAAGAAATCAACATCCTGGACTTATCCT CTGGGCCTGGATCCGTTAATTTTTAAAAAGCAGT CAAAAGTCCAAGTGGCCCTTGGCAGCATTACTC TCTCTGTTTGCTCTGGTTAATAATCTCAGGAGCA CAAACATTCCTGGAGGCAGGAGAAGAAATCAAC ATCCTGGACTTATCCTCTGGGCCTCAGATCTGTT AACAGCATGCGTGAGTACTTGTGTGTAATTTTT CATTATCTATAGGTAAGCACACTTGGAAATAG CAATAGATGCAATTTGGGACTTAACTCTTTCAGT ATGTCTTATTTCTAAGCAAAGTATTTAGTTTGGTT AGTAATTAATAAACAAGTACTGAGAACTAAATTGCAA ACACCAAGAATAAATGTTCAAGTGGGAAATT ACAGTTAAATACCATGGTAATGAATAAAAGGTA CAAATCGTTTAAACTCTTATGTAAAATTTGATAA GATGTTTTACACAACCTTAAATACATTGACAAGGT CTTGTGGAGAAAACAGTTCAGATGGTAAATATA CACAAGGGATTTAGTCAAACAATTTTTTGGCAAG AATATTATGAATTTTGTAATCGGTTGGCAGCCAA TGAAATACAAAGATGAGTCTAGTTAATAATCTAC AATTATTGGTTAAAGAAGTATATTAGTGCTAATT TCCCTCCGTTTGTCCCTAGCTTTTCTCTTCTGTCAA CCCCACACGCCTTTGGCAC
43	Зонд/праймер GBA	TTAGGAAAGGACAGTGGGAGTGGC
44	Прямой праймер GBA	AATGCGATGCAATTCCTCATT
45	Обратный праймер	TGCCAGCCATCTGTTGTT

	GBA	
--	-----	--

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Геном вектора на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (AAV), содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую белок бета-глюкоцереброзидазы (GСазы), содержащий последовательность сигнального пептида секреции и зрелую полипептидную последовательность, где указанная последовательность сигнального пептида секреции получена из белка GСазы человека дикого типа или из белка, отличного от GСазы.

2. Геном вектора на основе AAV по п. 1, где указанная зрелая полипептидная последовательность GСазы идентична зрелой полипептидной последовательности белка GСазы человека дикого типа.

3. Геном вектора на основе AAV по п. 2, где указанная последовательность сигнального пептида секреции получена из белка иммуноглобулина.

4. Геном вектора на основе AAV по п. 1, где указанная зрелая полипептидная последовательность GСазы содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:40, и указанная последовательность сигнального пептида секреции содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:38 или SEQ ID NO:39.

5. Геном вектора на основе AAV по п. 1, где аминокислотная последовательность указанного белка GСазы представлена аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:16.

6. Геном вектора на основе AAV по любому из пп. 1-5, где указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая белок GСазы, является последовательностью дикого типа или кодон-оптимизированной.

7. Геном вектора на основе AAV по п. 6, где указанная кодон-оптимизированная нуклеотидная последовательность характеризуется уменьшенным числом динуклеотидов CpG по сравнению с нуклеотидной последовательностью дикого типа.

8. Геном вектора на основе AAV по любому из пп. 1-7, где указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая зрелый полипептид GСазы, на по меньшей мере 70% идентична нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:13.

9. Геном вектора на основе AAV по любому из пп. 1-8, где указанный геном содержит по меньшей мере один инвертированный концевой повтор (ITR) AAV.

10. Геном вектора на основе AAV по любому из пп. 1-9, где указанный геном вектора дополнительно содержит область контроля транскрипции, функционально связанную с указанной нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок GСазы.

11. Геном вектора на основе AAV по п. 10, где указанная область контроля транскрипции является специфичной для ткани печени.

12. Геном вектора на основе AAV по п. 11, где указанная область контроля транскрипции содержит промотор, полученный из гена альбумина (ALB) человека, и энхансер, полученный из гена альбумина (ALB) человека или гена предшественника альфа-1-микроглобулина/бикунина (AMBВ).

13. Геном вектора на основе AAV по любому из пп. 1-12, где указанный геном

вектора дополнительно содержит последовательность сигнала терминации транскрипции.

14. Геном вектора на основе AAV по любому из пп. 1-13, где указанный геном вектора дополнительно содержит интрон или посттранскрипционный регуляторный элемент (PRE).

15. Геном вектора на основе AAV по любому из пп. 1-14, где указанный геном вектора содержит в направлении от 5' к 3':

- (a) первый ITR AAV2,
- (b) первую копию последовательности энхансера гена AMBP,
- (c) вторую копию последовательности энхансера гена AMBP,
- (d) последовательность энхансера гена ALB,
- (e) последовательность промотора гена ALB,
- (f) последовательность интрона гена бета-глобина человека (HBB),

(g) нуклеотидную последовательность, кодирующую белок GCазы человека, функционально связанную с указанными первой и второй копиями энхансера AMBP, указанным энхансером ALB и указанным промотором ALB, где указанный белок GCазы содержит последовательность сигнального пептида секреции и зрелую полипептидную последовательность,

(h) последовательность сигнала терминации транскрипции гена бычьего гормона роста (bGH),

- (i) модифицированную последовательность интрона 2 TBP и
- (j) второй ITR AAV2.

16. Геном вектора на основе AAV по п. 15, где каждая из указанных первой и второй копий последовательности энхансера гена AMBP содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:8; или указанная последовательность энхансера гена ALB содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:9; или указанная последовательность промотора гена ALB содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:10; или указанная последовательность интрона гена бета-глобина человека (HBB) содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:11; или указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая белок GCазы человека, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:41; или указанная последовательность сигнала терминации транскрипции гена bGH содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:14.

17. Геном вектора на основе AAV по любому из пп. 1-16, где нуклеотидная последовательность указанного генома вектора содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:17 или ее обратно-комплементарную последовательность.

18. Вектор на основе AAV, содержащий геном вектора на основе AAV по любому из пп. 1-17 и капсид AAV.

19. Вектор на основе AAV по п. 18, где указанный капсид AAV является гепатотропным.

20. Вектор на основе AAV по п. 18 или п. 19, где указанный капсид AAV выбран из группы, состоящей из: AAV2, AAV3B, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV13, AAVrh.74, AAVrh.10, AAV-DJ, AAV-LK03, AAV-KP1, AAV-hu.Lvr01, AAV-hu.Lvr02, AAV-hu.Lvr03, AAV-hu.Lvr04, AAV-hu.Lvr05, AAV-hu.Lvr06, AAV-hu.Lvr07, AAV-Anc80, AAV-NP40, AAV-NP59, AAV-NP84, AAV-hu.37, AAV-rh.8, AAV-rh.64R1, RHM4-1, RHM15-1, RHM15-2, RHM15-3/RHM15-5, RHM15-4 и RHM15-6, AAVHSC7, AAVHSC15 и AAVHSC17; или где указанный капсид AAV содержит белок VP1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:4.

21. Способ лечения субъекта-человека, нуждающегося в лечении болезни Гоше типа 1, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества вектора на основе AAV по любому из пп. 18-20.

22. Способ по п. 21, где указанное терапевтически эффективное количество указанного вектора на основе AAV представляет собой дозу, находящуюся в диапазоне от 1×10^{10} до 1×10^{15} геномов вектора на килограмм (гв/кг) массы тела субъекта, и где указанный вектор на основе AAV вводят указанному субъекту внутривенно в композиции с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом.

23. Способ по п. 22, где указанный способ является эффективным для увеличения количества активного белка GCase в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) указанного субъекта до уровня по меньшей мере 20 пг/1E6 клеток.

24. Способ по п. 22, где указанный способ является эффективным для снижения степени тяжести симптома или признака болезни Гоше типа 1, выбранных из группы, состоящей из гепатоспленомегалии, гепатомегалии, спленомегалии, анемии, лейкоцитопении, панцитопении, тромбоцитопении, моноклональной гипергаммаглобулинемии, поликлональной гипергаммаглобулинемии, анорексии, хронической усталости, аваскулярного некроза костей, боли в костях, остеолита, остеонекроза и остеопении.

25. Применение вектора на основе AAV по любому из пп. 18-20 в изготовлении лекарственного препарата для лечения или предупреждения болезни Гоше типа 1 у субъекта-человека.

26. ДНК-плазида, содержащая нуклеотидную последовательность генома вектора на основе AAV по любому из пп. 1-17.

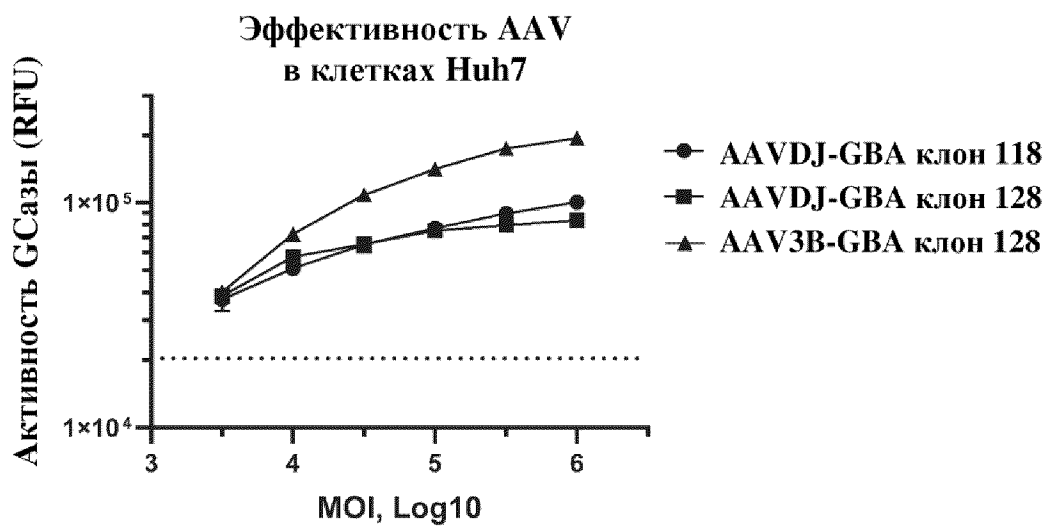
27. Клетка-хозяин для продукции вектора на основе AAV, содержащая ДНК-плазмиду по п. 26.

28. Способ получения вектора на основе AAV, включающий инкубацию клетки-хозяина по п. 27 в условиях, подходящих для продукции векторов на основе AAV, и очистку векторов на основе AAV, полученных таким образом.

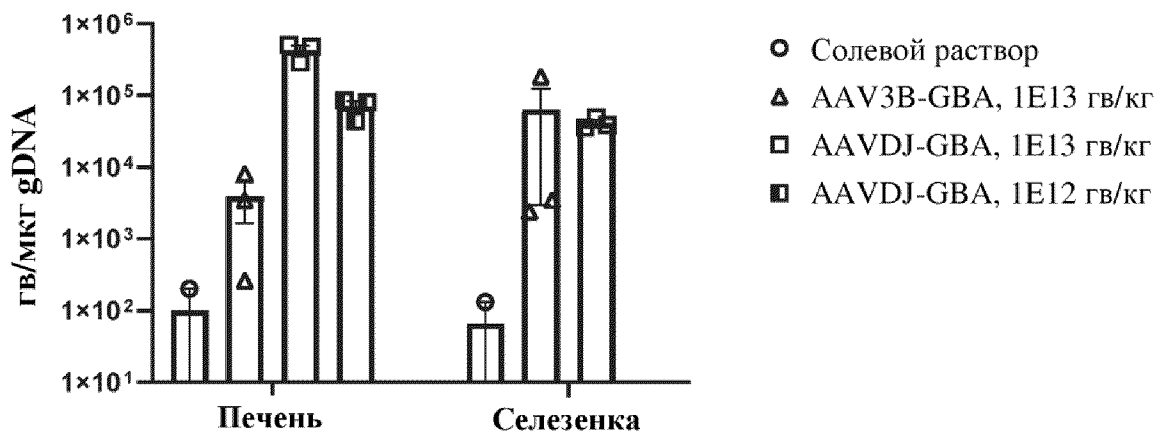
29. Вектор на основе AAV, полученный с помощью способа по п. 28.

По доверенности

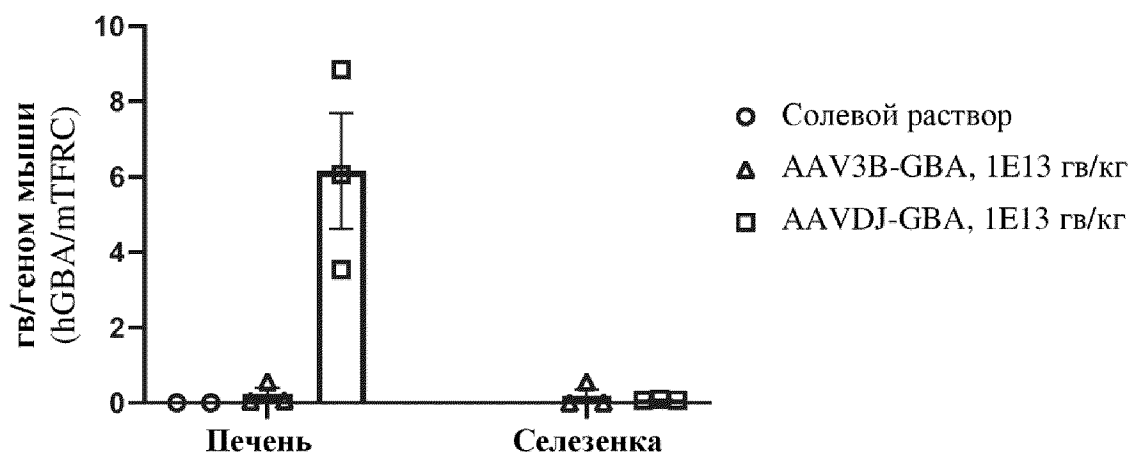
ФИГУРА 1



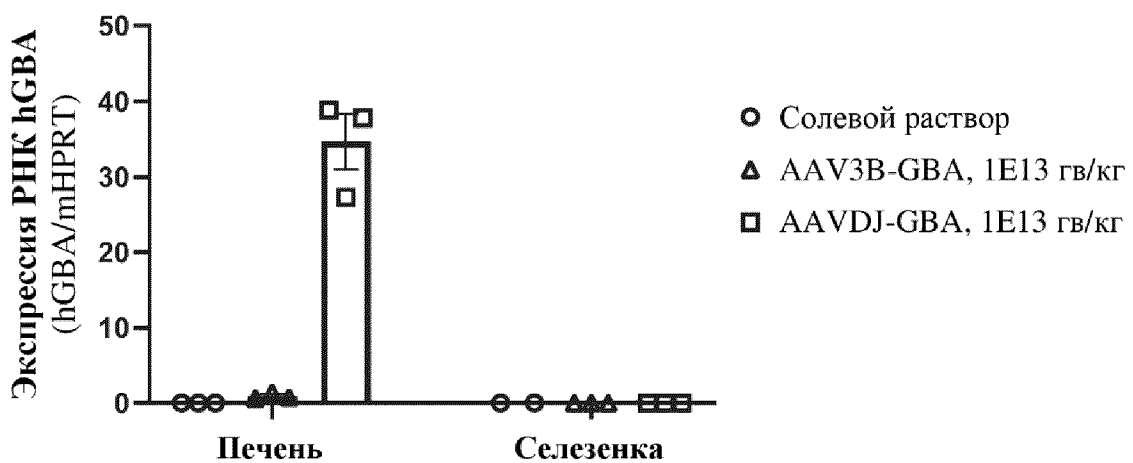
ФИГУРА 2



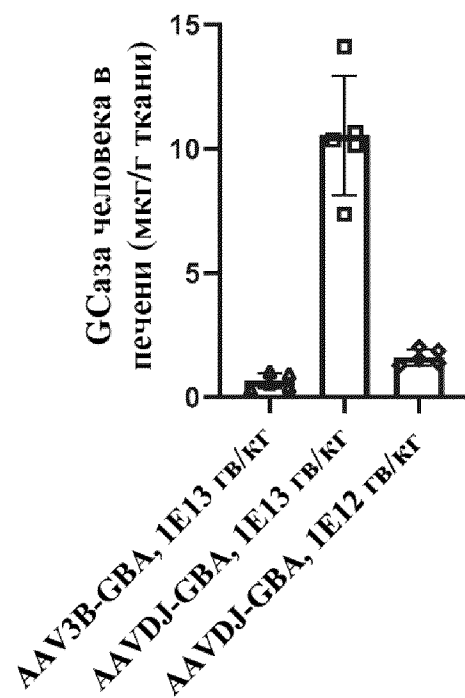
ФИГУРА 3



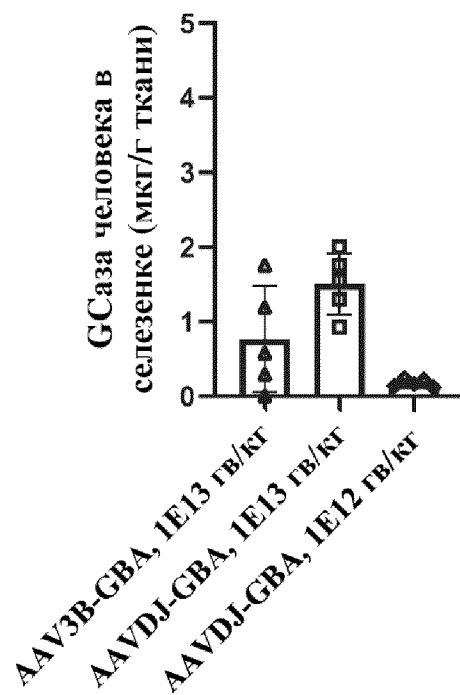
ФИГУРА 4



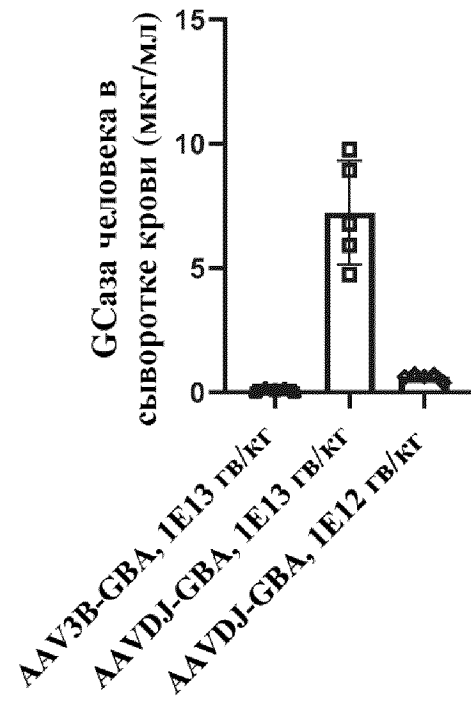
ФИГУРА 5А



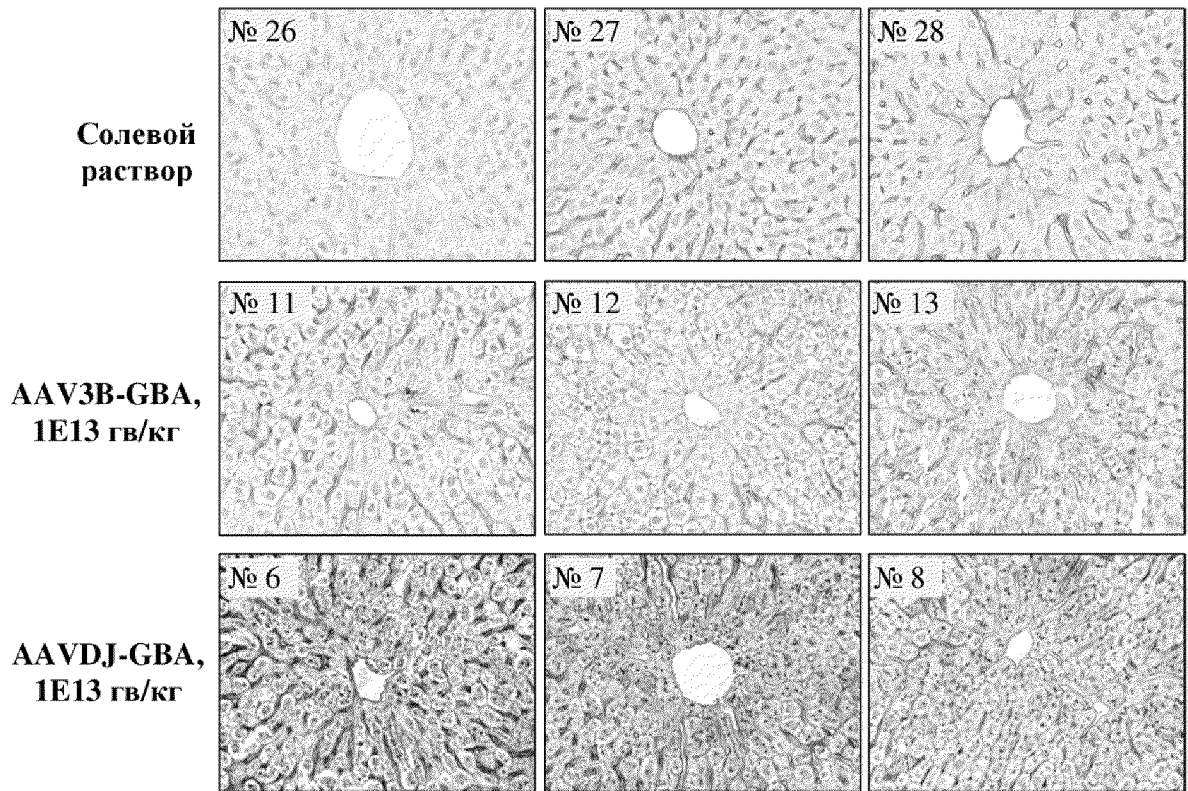
ФИГУРА 5В



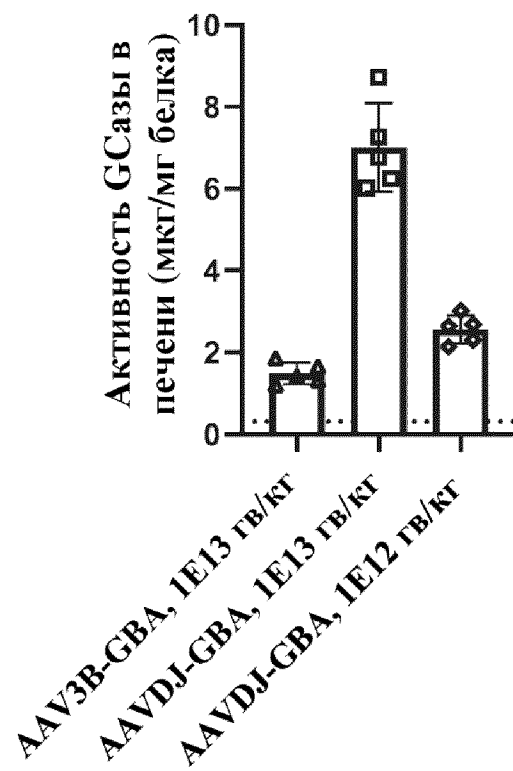
ФИГУРА 5С



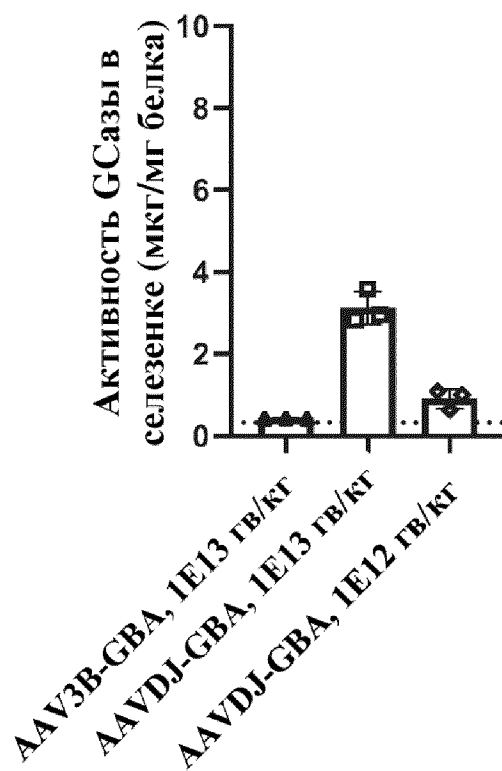
ФИГУРА 6



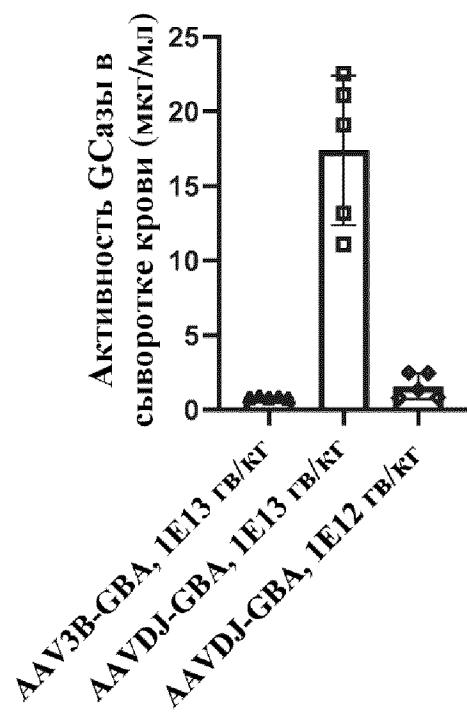
ФИГУРА 7А



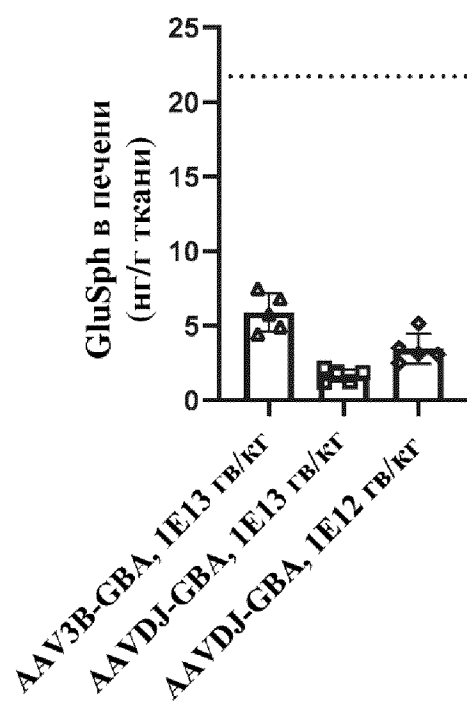
ФИГУРА 7В



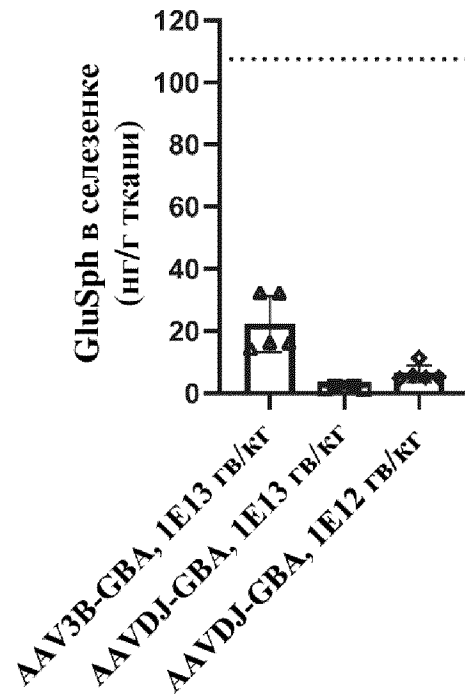
ФИГУРА 7С



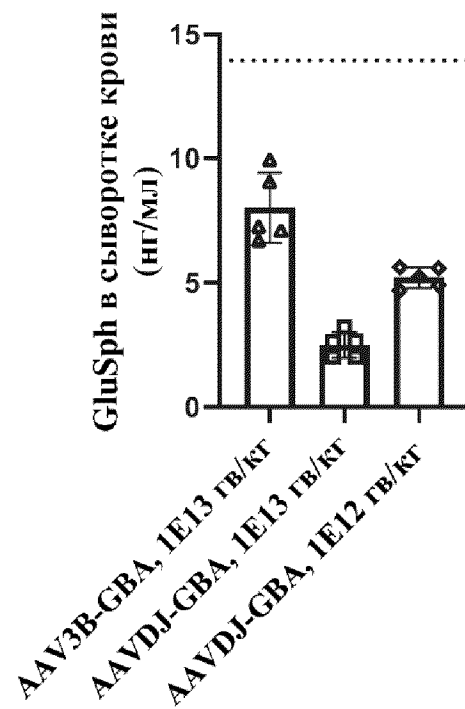
ФИГУРА 8А



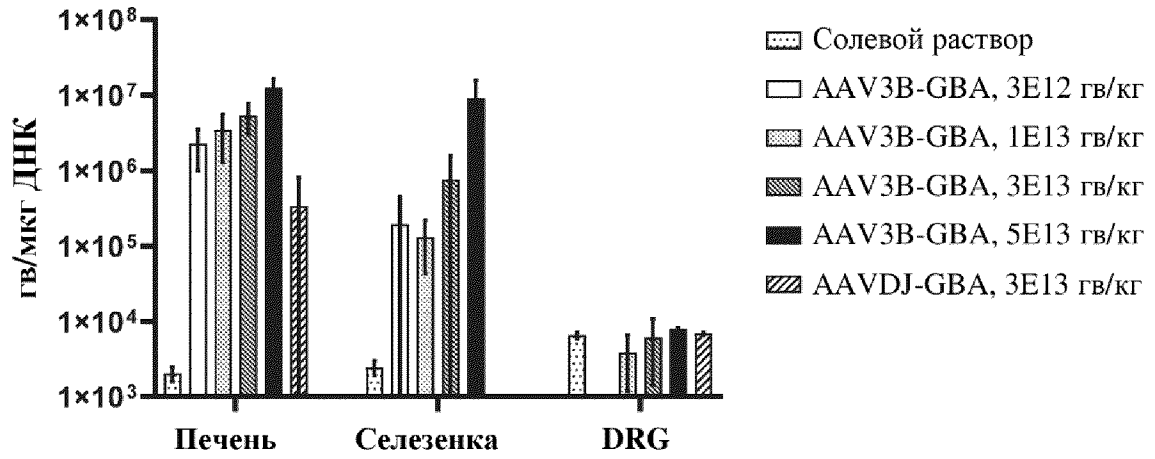
ФИГУРА 8В



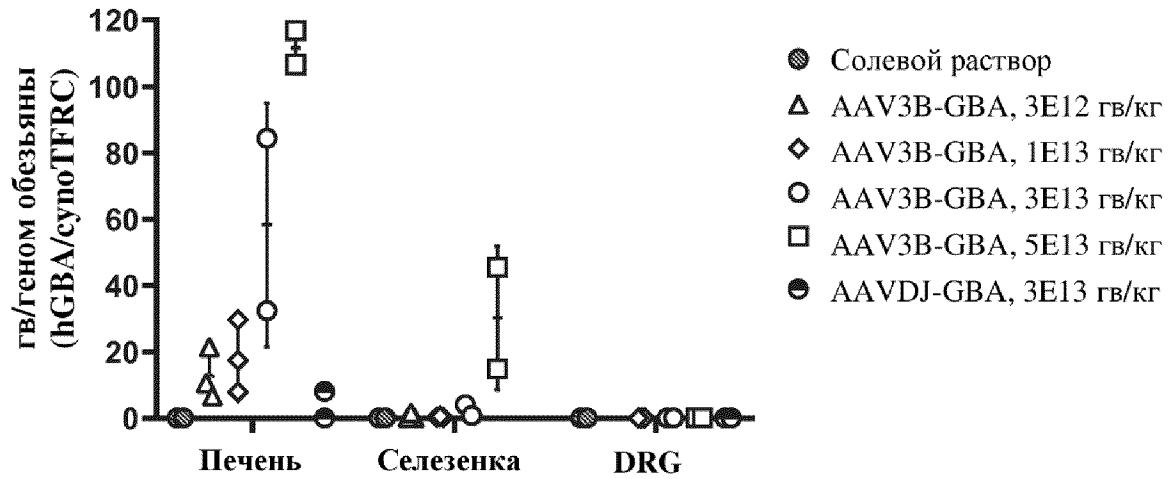
ФИГУРА 8С



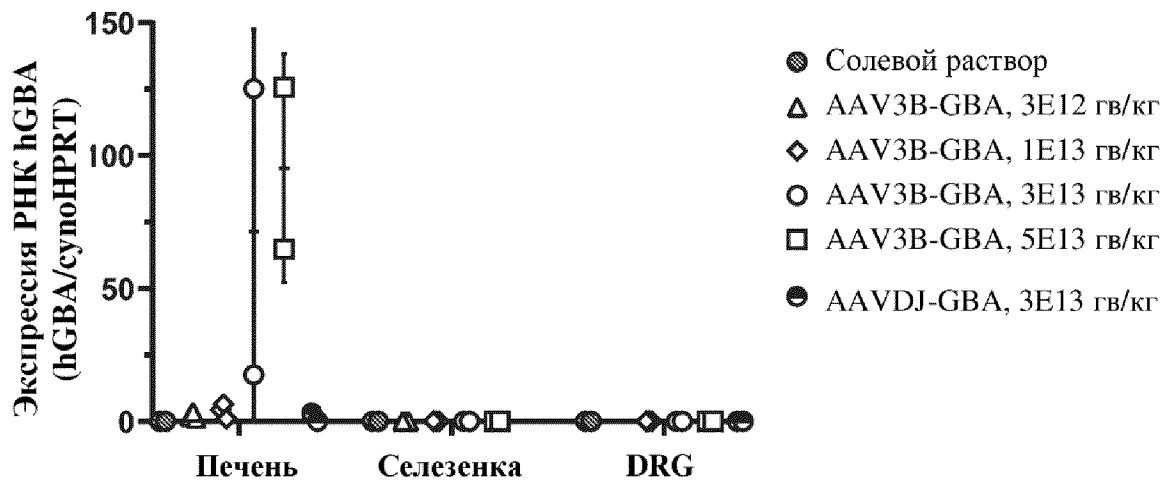
ФИГУРА 9



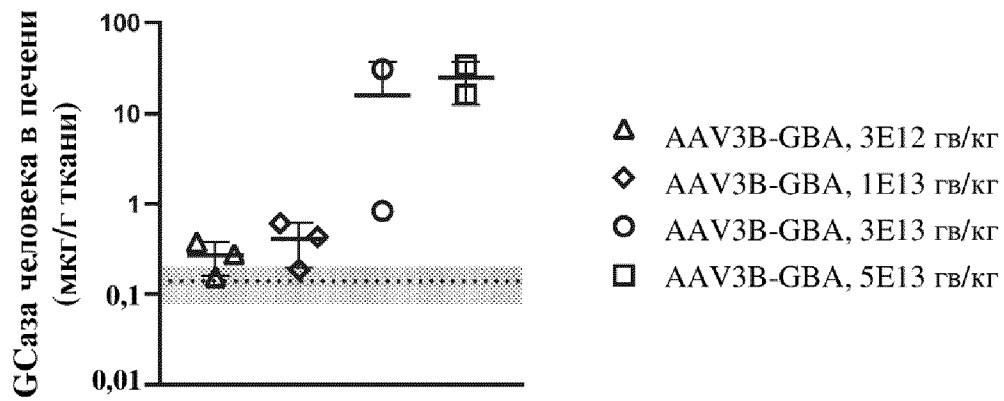
ФИГУРА 10



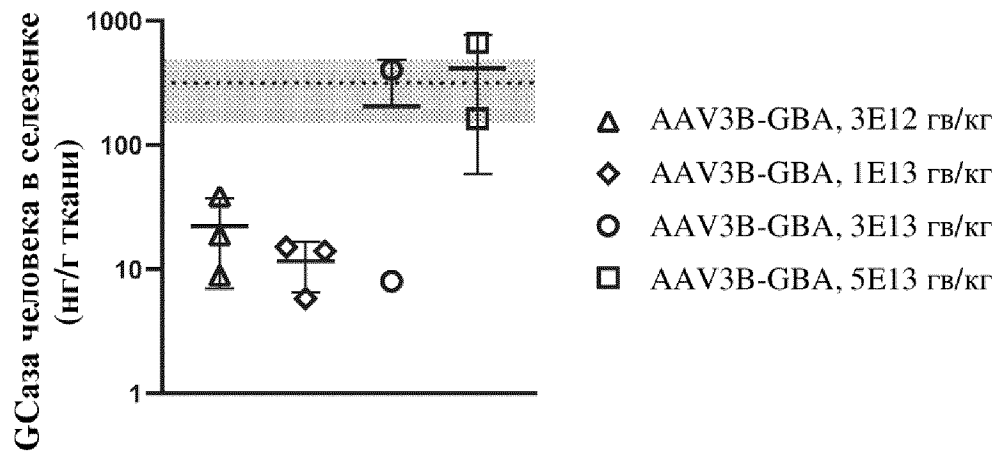
ФИГУРА 11

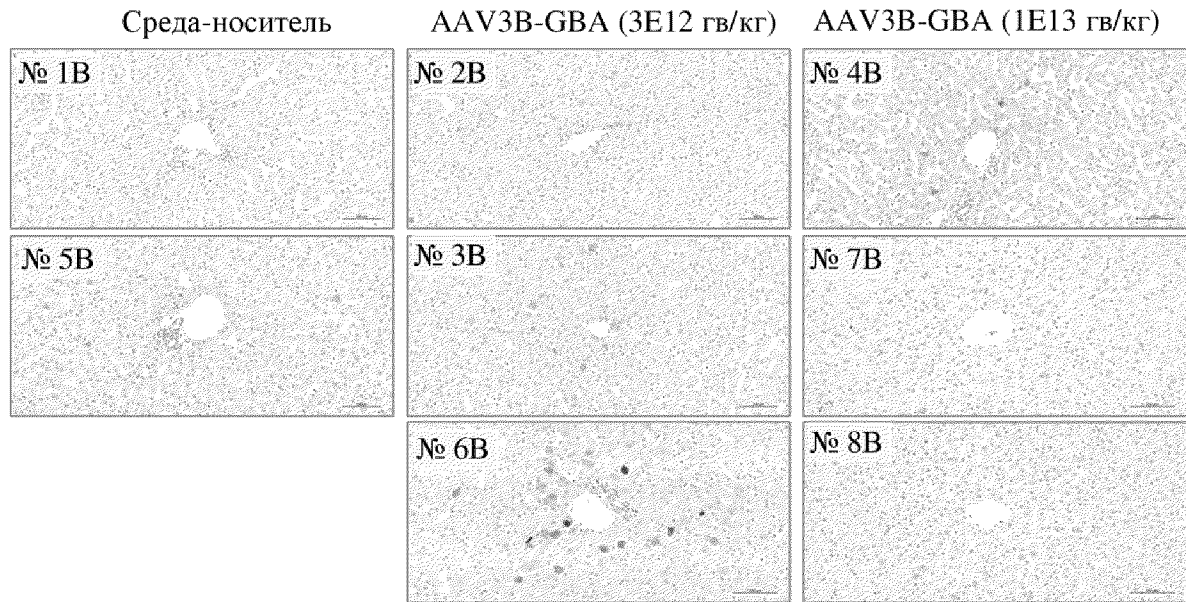


ФИГУРА 12А



ФИГУРА 12В



ФИГУРА 13А**ФИГУРА 13В**