

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202291832 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2022.10.06

(51) Int. Cl. C12N 15/56 (2006.01)  
C12N 9/26 (2006.01)  
A61K 38/47 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2020.12.18

(54) ВАРИАНТЫ СКОНСТРУИРОВАННОЙ КИСЛОЙ АЛЬФА-ГЛЮКОЗИДАЗЫ

(31) 62/951,625

(32) 2019.12.20

(33) US

(86) PCT/US2020/066041

(87) WO 2021/127457 2021.06.24

(71) Заявитель:  
КОДЕКСИС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Хэллоуз Уилльям Кейси, Ботем

Рэйчел Кетлин, Чжу Юй, Чнг

Чинпинг, Деллас Никки, Хейсман

Гьялт В., Алауи Исмаили Мулай

Хичам, Хоумен Дэвид Уилльям,

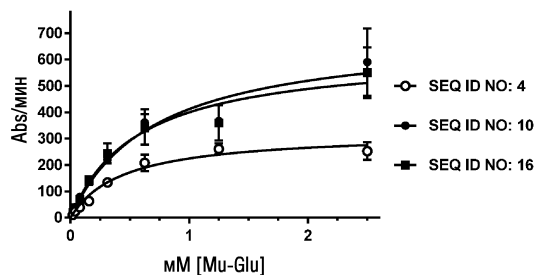
Силверман Адам П., Врум Джонатан,

Лао Джессика П. (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение предлагает сконструированные полипептиды кислой альфа-глюкозидазы (GAA) и их композиции. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды GAA были оптимизированы для обеспечения повышенной экспрессии, стабильности при нейтральном pH и активности в клеточных лизатах. Изобретение также предлагает способы использования композиций, содержащих сконструированные полипептиды GAA, для терапевтических и других целей.



A1

202291832

202291832

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-574878EA/032

### ВАРИАНТЫ СКОНСТРУИРОВАННОЙ КИСЛОЙ АЛЬФА-ГЛЮКОЗИДАЗЫ

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США, серийный № 62/951,625, поданной 20 декабря 2019, полностью включенной в настоящий документ посредством ссылки для всех целей.

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение предлагает сконструированные полипептиды кислой альфа-глюкозидазы (GAA) и их композиции. В некоторых вариантах осуществления, сконструированные полипептиды GAA были оптимизированы для обеспечения повышенной экспрессии, стабильности при нейтральном и кислом pH, повышенного поглощения клетками и активности в клеточных лизатах. Изобретение также предлагает способы использования композиций, содержащих сконструированные полипептиды GAA, для терапевтических и других целей.

#### ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ТАБЛИЦУ ИЛИ КОМПЬЮТЕРНУЮ ПРОГРАММУ

Официальная копия перечня последовательностей представляется одновременно со спецификацией в виде текстового файла в формате ASCII через EFS-Web с именем файла «CX7-199WO2\_ST25.txt», датой создания 17 декабря 2020 и размером 18,2 мегабайта. Перечень последовательностей, представленный через EFS-Web, является частью спецификации и полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Болезнь Помпе представляет собой аутосомно-рецессивную лизосомальную болезнь накопления, которая вызывается мутациями в гене, кодирующем кислую альфа-глюкозидазу. Этот генетический дефект приводит к уменьшению или отсутствию GAA в тканях организма. Возникающее в результате накопление гликогена в лизосомах приводит к набуханию и разрыву лизосом, что может привести к повреждению клеток, дисфункции органелл и другим клеточным дефектам. Существует две формы болезни Помпе, включающие классическую младенческую форму и форму с поздним началом (в детском или взрослом возрасте). Тяжесть заболевания связана с активностью ферментов, присутствующих в клетках пораженных людей. Младенческая форма является наиболее тяжелой и быстро прогрессирующей формой, обычно с активностью GAA менее 1%, что приводит к заметному накоплению гликогена в скелетных мышцах, а также в сердце и других тканях (см., например, Nahn and Schänzer, *Ann. Transl. Med.*, 7:283 [2019]). У этих пациентов наблюдается мультисистемное хранение накопленного лизосомального и не лизосомального связанного гликогена в сердце, скелетных мышцах и тканях головного мозга (см. Schoser, *Ann. Transl. Med.*, 7:292 [2019]). У пациентов отмечаются повышенный уровень креатининкиназы, гипертрофическая кардиомиопатия, задержка развития, мышечная гипотония и слабость осевых мышц. При отсутствии лечения, пациенты обычно умирают в течение первого года жизни из-за кардиореспираторной

недостаточности. Выживание после 18-месячного возраста является исключительным. Эта форма отличается от неклассической или поздней детской болезни Помпе, при которой у пациентов наблюдается гораздо менее выраженная гипертрофия сердца. Пациенты с болезнью Помпе с поздним началом обычно имеют прогрессирующую поясно-конечностную миопатию и респираторную дисфункцию. У этих пациентов наблюдается преимущественное, но не исключительное поражение мышц. Со временем пациенты становятся зависимыми от инвалидных колясок и/или аппаратов ИВЛ. Дыхательная недостаточность является ведущей причиной смерти этих больных. Некоторые пациенты могут синтезировать нефункциональную форму GAA, но другие не способны продуцировать какой-либо тип нативного фермента. Ген GAA человека, кодирующий GAA, был локализован на хромосоме 17q25.2-q25.3, и был клонирован и секвенирован (см. Peruzzo et al., *Ann. Transl. Med.*, 7:278-287 [2019]; и Martiniuk et al., *DNA Cell. Biol.*, 10:283-292 [1991]). Хотя сообщалось о многочисленных мутациях в этом гене, патологические механизмы, которые приводят к широкому спектру фенотипов, наблюдаемых у пораженных пациентов, остаются неизвестными. Несмотря на доступность ферментозамещающей терапии (ERT) с использованием рекомбинантных GAA, сохраняется потребность в более эффективных вариантах лечения и ведения пораженных пациентов.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение предлагает сконструированные полипептиды кислой альфа-глюкозидазы (GAA) и их композиции. В некоторых вариантах осуществления, сконструированные полипептиды GAA были оптимизированы для обеспечения повышенной экспрессии, стабильности при нейтральном и кислом pH, повышенного поглощения клетками и активности в клеточных лизатах. Изобретение также предлагает способы использования композиций, содержащих сконструированные полипептиды GAA, для терапевтических и других целей.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает сконструированные полипептиды GAA (также называемым здесь «рекомбинантными полипептидами GAA») и их биологически активные фрагменты и аналоги, обладающие улучшенными свойствами по сравнению с ферментом GAA дикого типа и/или эталонным полипептидом GAA в по существу одинаковых условиях. Изобретение дополнительно предлагает способы применения сконструированных полипептидов GAA и их биологически активных фрагментов и аналогов в терапевтических и/или других композициях.

Настоящее изобретение предлагает рекомбинантные кислые альфа-глюкозидазы и/или биологически активные фрагменты рекомбинантных кислых альфа-глюкозидаз, содержащие аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, примерно 70%, по меньшей мере, примерно 75%, по меньшей мере, примерно 80%, по меньшей мере, примерно 85%, по меньшей мере, примерно 90%, по меньшей мере, примерно 91%, по меньшей мере, примерно 92%, по меньшей мере, примерно 93%, по

меньшей мере, примерно 94%, по меньшей мере, примерно 95%, по меньшей мере, примерно 96%, по меньшей мере, примерно 97%, по меньшей мере, примерно 98% или, по меньшей мере, примерно 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 946, 1956, 2496, 2880 и/или 3104. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает рекомбинантные кислые альфа-глюкозидазы и/или биологически активные фрагменты рекомбинантных кислых альфа-глюкозидаз, содержащие аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 93%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с SEQ ID №: 2, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 946, 1956, 2496, 2880 и/или 3104. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение также предлагает рекомбинантные кислые альфа-глюкозидазы и/или биологически активные фрагменты рекомбинантных кислых альфа-глюкозидаз, содержащие аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 2, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 946, 1956, 2496, 2880 и/или 3104. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение дополнительно предлагает рекомбинантные кислые альфа-глюкозидазы и/или биологически активные фрагменты рекомбинантных кислых альфа-глюкозидаз, содержащие аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 2, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 946, 1956, 2496, 2880 и/или 3104. В некоторых вариантах осуществления, последовательности рекомбинантной кислой альфа-глюкозидазы содержат последовательность сигнального пептида (например, SEQ ID NO: 3382 или 3384), кодируемую полинуклеотидами, представленными в SEQ ID NO: 3381 и 3383, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные полинуклеотиды, кодирующие рекомбинантные кислые альфа-глюкозидазы по настоящему изобретению, содержат последовательность из 57 пар оснований, которая кодирует сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды рекомбинантных кислых альфа-глюкозидаз по настоящему изобретению содержат сигнальный пептид из 19 аминокислот. В некоторых альтернативных вариантах осуществления, рекомбинантные полинуклеотиды, кодирующие рекомбинантные кислые альфа-глюкозидазы, не содержат последовательность, кодирующую сигнальный пептид. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, рекомбинантные полипептиды, содержащие рекомбинантные кислые альфа-глюкозидазы, не содержат сигнальный пептид. Не предполагается, что настоящее изобретение ограничивается полинуклеотидными или полипептидными последовательностями рекомбинантной кислой альфа-глюкозидазы, содержащими нуклеотидную или полипептидную последовательность сигнального пептида. Также не предполагается, что настоящее изобретение ограничивается полинуклеотидными или полипептидными последовательностями рекомбинантной кислой альфа-глюкозидазы, которые не содержат нуклеотидную или полипептидную последовательность сигнального пептида.

Настоящее изобретение предлагает рекомбинантные кислые альфа-глюкозидазы и/или биологически активные фрагменты рекомбинантных кислых альфа-глюкозидаз, содержащие аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 93%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из 27, 27/944, 28, 29/478, 30, 88, 107, 109, 109/842, 110, 113, 135, 137, 138, 148, 150, 247, 274, 276, 278, 375, 403, 414, 418, 418/499, 421, 426, 437, 444, 455, 463, 471, 471/478, 476, 489, 527, 547, 581, 610, 642, 668, 670, 692, 725/732, 750, 753, 786, 820, 862, 871, 895, 897, 930, 934 и 944, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из 27P, 27P/944W, 27R, 28P, 28R, 28S, 29T/478T, 30G, 30K, 30T, 88G, 88S, 107G, 107P, 109G/842E, 109P, 110G, 110L, 113S, 135A, 135Q, 137P, 138A, 148G, 148Y, 150G, 247R, 274G, 276F, 276Y, 278A, 278G, 375E, 403W, 414P, 418E/499R, 418R, 421S, 426R, 437S, 444T, 455V, 463A, 471Q/478S, 471S, 476A, 476H, 489R, 527R, 547G, 581G, 581T, 610A, 610G, 610S, 642M, 642Q, 642S, 668H, 670N, 692Q, 725N/732I, 750P, 753T, 786P, 786Y, 820E, 862G, 871E, 895R, 897V, 930R, 934R, 944G и 944R, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из F27P, F27P/C944W, F27R, L28P, L28R, L28S, L29T/A478T, V30G, V30K, V30T, K88G, K88S, Q107G, Q107P, L109G/G842E, L109P, Q110G, Q110L, Q113S, S135A, S135Q, E137P, M138A, T148G, T148Y, T150G, Q247R, D274G, A276F, A276Y, T278A, T278G, I375E, R403W, R414P, A418E/H499R, A418R, Q421S, G426R, A437S, A444T, R455V, E463A, K471Q/A478S, K471S, S476A, S476H, A489R, N527R, A547G, K581G, K581T, W610A, W610G, W610S, L642M, L642Q, L642S, S668H, L670N, T692Q, K725N/V732I, A750P, A753T, R786P, R786Y, G820E, R862G, L871E, K895R, T897V, C930R, L934R, C944G и C944R, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в выбранном положении или ряде положений, выбранных из 29/218/240/668/700/744/869, 29/218/240/700/869, 29/240/596/668/700/744/869, 29/240/596/668/869, 36/106/150/218/527/750/883/894, 106/112/150/218/414/527/793/883, 106/150/169/218/414/486/527/750/894, 106/150/169/218/414/486/527/894, 106/150/169/218/414/486/749/793/883/894, 106/150/169/218/414/486/750/793/883/894, 106/150/169/218/414/486/793/883, 106/150/169/218/414/486/894, 106/150/169/218/414/749/750/793/883, 106/150/169/218/414/749/793, 106/150/169/218/414/749/793/883, 106/150/169/218/486/527/749/793/894,

106/150/169/218/486/749/883, 106/150/169/218/486/883, 106/150/169/218/749/800,  
 106/150/169/414/486/749/750/883, 106/150/169/527/749/793/883,  
 106/150/169/749/793/883/894, 106/150/218/331/414/486/527/733/749/793,  
 106/150/218/414/486/642/750/793/883, 106/150/218/414/486/750/793/894,  
 106/150/218/414/527/749/750/883, 106/150/218/414/527/749/793/883/894,  
 106/150/218/414/749/750/793/883/894, 106/150/218/414/749/793/883,  
 106/150/218/486/527/749/894, 106/150/218/486/793/883, 106/150/218/527/749/750/793,  
 106/150/218/527/793/894, 106/150/218/749/750/793, 106/150/218/793, 106/150/218/793/894,  
 106/150/245/793/883/894, 106/150/414/749/750/793/894, 106/150/414/749/793/894,  
 106/150/486/527/750/793, 106/150/486/749/793/883/894, 106/150/749/793/883,  
 106/169/185/218/414/749/750/793, 106/191/280/402/414/444/727,  
 106/191/414/444/522/928/944, 106/191/414/489/928/944, 106/280/402/414/444/489/727/944,  
 150/169/218/414/527/793, 150/218/414/486/749/750, 150/218/414/486/750/793,  
 150/218/414/486/750/793/883, 150/218/414/749/750/793/894, 150/218/414/749/793,  
 150/218/527/749/793, 150/218/749/750/793, 150/218/749/793, 150/414/486/527/750/894,  
 150/414/486/749/750/793, 150/486/750/883/894, 169/486/750/793/883,  
 180/275/402/518/547/610/638/669/671, 180/402/431/507/547/610/669/671/793,  
 180/402/507/547/610/671, 191/280/402/414/444/465/842/928,  
 191/280/402/414/444/489/500/944, 191/280/414/444/489/500/522/842/928/944,  
 191/280/414/444/489/522/727/944, 191/280/414/489/842/928/944, 191/280/414/944,  
 191/414/522/842/944, 196/402/431/547/610/638, 218/668/700/869,  
 224/402/507/518/547/638/668, 269/275/431/518/547/638/668/669,  
 275/281/402/431/507/518/610/668, 275/281/402/431/518/547/610/669/671,  
 275/281/402/507/518/547/638/669/671, 275/281/402/518/547/610/638/671,  
 275/281/402/518/547/610/668/669/887, 275/281/402/547/610/638/669/671,  
 275/281/431/518/547/638/669/671, 275/281/507/547/669/671, 275/281/610/638/668/669,  
 275/281/671, 275/377/402/507/518/669/671/715, 275/402/431/507/547/671,  
 275/402/431/518/610/638/669/671/922, 275/402/507/547/610/638/668/669,  
 275/402/507/547/610/638/669/671, 275/402/507/547/610/671, 275/402/547/610/638/669/671,  
 275/402/547/638/669/671, 275/402/638/669/671, 275/431/507/518/547/668/669/671,  
 275/431/507/518/610/669/671, 275/431/507/547/610/638/671, 275/431/518/547/638/668,  
 275/431/518/610/638/669/671, 275/431/638, 275/507/518/547/610/638/668/669,  
 275/507/518/547/638/669/671, 275/507/547/610/638/669/671, 275/507/547/668/669/671,  
 275/518/671, 280/402/536/928, 281/402/507/518/547/610/638/669/671,  
 281/402/507/547/638/669/671, 281/402/518/547/610/638/668/669, 281/402/518/547/668,  
 281/431/507/518/547/610/638/668, 402/431/518/547/610/668, 402/431/518/547/671,  
 402/431/518/610, 402/431/547/638/671, 431/507/518/541/547/638/669/671,  
 431/507/518/669/671, 507/547/610, 507/547/638/669/671, 547/610/638/671 и 547/638/668, где  
 положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах  
 осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или

ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из  
 29Q/218S/240I/668D/700F/744V/869L, 29Q/240I/596P/668D/869L,  
 29Q/240I/596S/668D/700F/744V/869T, 29V/218S/240I/700F/869T,  
 36R/106P/150S/218S/527D/750P/883H/894R, 106P/112S/150S/218S/414G/527D/793K/883H,  
 106P/150S/169S/218S/414G/486E/527D/750P/894R,  
 106P/150S/169S/218S/414G/486E/527D/894R,  
 106P/150S/169S/218S/414G/486E/749E/793K/883H/894R,  
 106P/150S/169S/218S/414G/486E/750P/793K/883H/894R,  
 106P/150S/169S/218S/414G/486E/793K/883H, 106P/150S/169S/218S/414G/486E/894R,  
 106P/150S/169S/218S/414G/749E/750P/793K/883H, 106P/150S/169S/218S/414G/749E/793K,  
 106P/150S/169S/218S/414G/749E/793K/883H,  
 106P/150S/169S/218S/486E/527D/749E/793K/894R, 106P/150S/169S/218S/486E/749E/883H,  
 106P/150S/169S/218S/486E/883H, 106P/150S/169S/218S/749E/800A,  
 106P/150S/169S/414G/486E/749E/750P/883H, 106P/150S/169S/527D/749E/793K/883H,  
 106P/150S/169S/749E/793K/883H/894R,  
 106P/150S/218S/331A/414G/486E/527D/733E/749E/793K,  
 106P/150S/218S/414G/486E/642F/750P/793K/883H,  
 106P/150S/218S/414G/486E/750P/793K/894R, 106P/150S/218S/414G/527D/749E/750P/883H,  
 106P/150S/218S/414G/527D/749E/793K/883H/894G,  
 106P/150S/218S/414G/749E/750P/793K/883H/894R, 106P/150S/218S/414G/749E/793K/883H,  
 106P/150S/218S/486E/527D/749E/894R, 106P/150S/218S/486E/793K/883H,  
 106P/150S/218S/527D/749E/750P/793K, 106P/150S/218S/527D/793K/894G,  
 106P/150S/218S/749E/750P/793K, 106P/150S/218S/793K, 106P/150S/218S/793K/894R,  
 106P/150S/245S/793K/883H/894R, 106P/150S/414G/749E/750P/793K/894R,  
 106P/150S/414G/749E/793K/894R, 106P/150S/486E/527D/750P/793K,  
 106P/150S/486E/749E/793K/883H/894G, 106P/150S/749E/793K/883H,  
 106P/169S/185G/218S/414G/749E/750P/793K, 106P/191R/280D/402A/414G/444P/727P,  
 106P/191R/414G/444P/522V/928T/944S, 106P/191R/414G/489D/928T/944S,  
 106P/280D/402A/414G/444P/489D/727P/944S, 150S/169S/218S/414G/527D/793K,  
 150S/218S/414G/486A/750P/793K, 150S/218S/414G/486E/749E/750P,  
 150S/218S/414G/486E/750P/793K/883H, 150S/218S/414G/749E/750P/793K/894R,  
 150S/218S/414G/749E/793K, 150S/218S/527D/749E/793K, 150S/218S/749E/750P/793K,  
 150S/218S/749E/793K, 150S/414G/486E/527D/750P/894R, 150S/414G/486E/749E/750P/793K,  
 150S/486E/750P/883H/894G, 169S/486E/750P/793K/883H,  
 180H/275M/402A/518V/547G/610R/638I/669H/671N,  
 180H/402A/431V/507L/547G/610R/669H/671N/793G, 180H/402A/507L/547G/610R/671N,  
 191R/280D/402A/414G/444P/465E/842S/928T,  
 191R/280D/402A/414G/444P/489D/500A/944S,  
 191R/280D/414G/444P/489D/500A/522V/842S/928T/944S,  
 191R/280D/414G/444P/489D/522V/727P/944S, 191R/280D/414G/489D/842S/928T/944S,

191R/280D/414G/944S, 191R/414G/522V/842S/944S, 196V/402A/431V/547G/610R/638I,  
 218S/668D/700F/869T, 224F/402A/507L/518V/547G/638I/668D,  
 269N/275M/431V/518V/547G/638I/668D/669H,  
 275M/281V/402A/431V/507L/518V/610R/668D,  
 275M/281V/402A/507L/518V/547G/638I/669H/671N,  
 275M/281V/402A/518V/547G/610R/638I/671N,  
 275M/281V/402A/518V/547G/610R/668D/669H/887D,  
 275M/281V/402A/547G/610R/638I/669H/671N, 275M/281V/507L/547G/669H/671N,  
 275M/281V/610R/638I/668D/669H, 275M/402A/431V/507L/547G/671N,  
 275M/402A/507L/547G/610R/671N, 275M/402A/547G/638I/669H/671N,  
 275M/431V/518V/547G/638I/668D, 275M/431V/518V/610R/638I/669H/671N,  
 275M/431V/638I, 275M/507L/547G/668D/669H/671N,  
 275V/281V/402A/431V/518V/547G/610R/669H/671N,  
 275V/281V/431V/518V/547G/638I/669H/671N, 275V/281V/671N,  
 275V/377K/402A/507L/518V/669H/671N/715G,  
 275V/402A/431V/518V/610R/638I/669H/671N/922L,  
 275V/402A/507L/547G/610R/638I/668D/669H,  
 275V/402A/507L/547G/610R/638I/669H/671N, 275V/402A/547G/610R/638I/669H/671N,  
 275V/402A/638I/669H/671N, 275V/431V/507L/518V/547G/668D/669H/671N,  
 275V/431V/507L/518V/610R/669H/671N, 275V/431V/507L/547G/610R/638I/671N,  
 275V/507L/518V/547G/610R/638I/668D/669H, 275V/507L/518V/547G/638I/669H/671N,  
 275V/507L/547G/610R/638I/669H/671N, 275V/518V/671N, 280D/402A/536I/928T,  
 281V/402A/507L/518V/547G/610R/638I/669H/671N,  
 281V/402A/507L/547G/638I/669H/671N, 281V/402A/518V/547G/610R/638I/668D/669H,  
 281V/402A/518V/547G/668D, 281V/431V/507L/518V/547G/610R/638I/668D,  
 402A/431V/518V/547G/610R/668D, 402A/431V/518V/547G/671N, 402A/431V/518V/610R,  
 402A/431V/547G/638I/671N, 431V/507L/518V/541E/547G/638I/669H/671N,  
 431V/507L/518V/669H/671N, 507L/547G/610R, 507L/547G/638I/669H/671N,  
 547G/610R/638I/671N и 547G/638I/668D, где положения пронумерованы со ссылкой на  
 SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза  
 содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких  
 положениях, выбранных из L29Q/L218S/L240I/S668D/H700F/I744V/I869L,  
 L29Q/L240I/A596P/S668D/I869L, L29Q/L240I/A596S/S668D/H700F/I744V/I869T,  
 L29V/L218S/L240I/H700F/I869T, G36R/K106P/T150S/L218S/N527D/A750P/R883H/Q894R,  
 K106P/A112S/T150S/L218S/R414G/N527D/E793K/R883H,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/T486E/N527D/A750P/Q894R,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/T486E/N527D/Q894R,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/T486E/Q749E/E793K/R883H/Q894R,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/T486E/A750P/E793K/R883H/Q894R,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/T486E/E793K/R883H,



K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/T486E/Q894R,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/Q749E/A750P/E793K/R883H,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/Q749E/E793K,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/Q749E/E793K/R883H,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/T486E/N527D/Q749E/E793K/Q894R,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/T486E/Q749E/R883H,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/T486E/R883H,      K106P/T150S/N169S/L218S/Q749E/P800A,  
 K106P/T150S/N169S/R414G/T486E/Q749E/A750P/R883H,  
 K106P/T150S/N169S/N527D/Q749E/E793K/R883H,  
 K106P/T150S/N169S/Q749E/E793K/R883H/Q894R,  
 K106P/T150S/L218S/V331A/R414G/T486E/N527D/D733E/Q749E/E793K,  
 K106P/T150S/L218S/R414G/T486E/L642F/A750P/E793K/R883H,  
 K106P/T150S/L218S/R414G/T486E/A750P/E793K/Q894R,  
 K106P/T150S/L218S/R414G/N527D/Q749E/A750P/R883H,  
 K106P/T150S/L218S/R414G/N527D/Q749E/E793K/R883H/Q894G,  
 K106P/T150S/L218S/R414G/Q749E/A750P/E793K/R883H/Q894R,  
 K106P/T150S/L218S/R414G/Q749E/E793K/R883H,  
 K106P/T150S/L218S/T486E/N527D/Q749E/Q894R,  
 K106P/T150S/L218S/T486E/E793K/R883H,  
 K106P/T150S/L218S/N527D/Q749E/A750P/E793K,  
 K106P/T150S/L218S/N527D/E793K/Q894G,      K106P/T150S/L218S/Q749E/A750P/E793K,  
 K106P/T150S/L218S/E793K,      K106P/T150S/L218S/E793K/Q894R,  
 K106P/T150S/P245S/E793K/R883H/Q894R,  
 K106P/T150S/R414G/Q749E/A750P/E793K/Q894R,  
 K106P/T150S/R414G/Q749E/E793K/Q894R,      K106P/T150S/T486E/N527D/A750P/E793K,  
 K106P/T150S/T486E/Q749E/E793K/R883H/Q894G,      K106P/T150S/Q749E/E793K/R883H,  
 K106P/N169S/V185G/L218S/R414G/Q749E/A750P/E793K,  
 K106P/H191R/G280D/S402A/R414G/A444P/S727P,  
 K106P/H191R/R414G/A444P/E522V/D928T/C944S,  
 K106P/H191R/R414G/A489D/D928T/C944S,  
 K106P/G280D/S402A/R414G/A444P/A489D/S727P/C944S,  
 T150S/N169S/L218S/R414G/N527D/E793K,      T150S/L218S/R414G/T486A/A750P/E793K,  
 T150S/L218S/R414G/T486E/Q749E/A750P,  
 T150S/L218S/R414G/T486E/A750P/E793K/R883H,  
 T150S/L218S/R414G/Q749E/A750P/E793K/Q894R,      T150S/L218S/R414G/Q749E/E793K,  
 T150S/L218S/N527D/Q749E/E793K,      T150S/L218S/Q749E/A750P/E793K,  
 T150S/L218S/Q749E/E793K,      T150S/R414G/T486E/N527D/A750P/Q894R,  
 T150S/R414G/T486E/Q749E/A750P/E793K,      T150S/T486E/A750P/R883H/Q894G,  
 N169S/T486E/A750P/E793K/R883H,  
 N180H/L275M/S402A/I518V/A547G/W610R/V638I/L669H/S671N,

N180H/S402A/M431V/M507L/A547G/W610R/L669H/S671N/E793G,  
 N180H/S402A/M507L/A547G/W610R/S671N,  
 H191R/G280D/S402A/R414G/A444P/G465E/G842S/D928T,  
 H191R/G280D/S402A/R414G/A444P/A489D/D500A/C944S,  
 H191R/G280D/R414G/A444P/A489D/D500A/E522V/G842S/D928T/C944S,  
 H191R/G280D/R414G/A444P/A489D/E522V/S727P/C944S,  
 H191R/G280D/R414G/A489D/G842S/D928T/C944S, H191R/G280D/R414G/C944S,  
 H191R/R414G/E522V/G842S/C944S, A196V/S402A/M431V/A547G/W610R/V638I,  
 L218S/S668D/H700F/I869T, L224F/S402A/M507L/I518V/A547G/V638I/S668D,  
 T269N/L275M/M431V/I518V/A547G/V638I/S668D/L669H,  
 L275M/A281V/S402A/M431V/M507L/I518V/W610R/S668D,  
 L275M/A281V/S402A/M507L/I518V/A547G/V638I/L669H/S671N,  
 L275M/A281V/S402A/I518V/A547G/W610R/V638I/S671N,  
 L275M/A281V/S402A/I518V/A547G/W610R/S668D/L669H/E887D,  
 L275M/A281V/S402A/A547G/W610R/V638I/L669H/S671N,  
 L275M/A281V/M507L/A547G/L669H/S671N, L275M/A281V/W610R/V638I/S668D/L669H,  
 L275M/S402A/M431V/M507L/A547G/S671N, L275M/S402A/M507L/A547G/W610R/S671N,  
 L275M/S402A/A547G/V638I/L669H/S671N, L275M/M431V/I518V/A547G/V638I/S668D,  
 L275M/M431V/I518V/W610R/V638I/L669H/S671N, L275M/M431V/V638I,  
 L275M/M507L/A547G/S668D/L669H/S671N,  
 L275V/A281V/S402A/M431V/I518V/A547G/W610R/L669H/S671N,  
 L275V/A281V/M431V/I518V/A547G/V638I/L669H/S671N, L275V/A281V/S671N,  
 L275V/R377K/S402A/M507L/I518V/L669H/S671N/V715G,  
 L275V/S402A/M431V/I518V/W610R/V638I/L669H/S671N/P922L,  
 L275V/S402A/M507L/A547G/W610R/V638I/S668D/L669H,  
 L275V/S402A/M507L/A547G/W610R/V638I/L669H/S671N,  
 L275V/S402A/A547G/W610R/V638I/L669H/S671N, L275V/S402A/V638I/L669H/S671N,  
 L275V/M431V/M507L/I518V/A547G/S668D/L669H/S671N,  
 L275V/M431V/M507L/I518V/W610R/L669H/S671N,  
 L275V/M431V/M507L/A547G/W610R/V638I/S671N,  
 L275V/M507L/I518V/A547G/W610R/V638I/S668D/L669H,  
 L275V/M507L/I518V/A547G/V638I/L669H/S671N,  
 L275V/M507L/A547G/W610R/V638I/L669H/S671N, L275V/I518V/S671N,  
 G280D/S402A/V536I/D928T,  
 A281V/S402A/M507L/I518V/A547G/W610R/V638I/L669H/S671N,  
 A281V/S402A/M507L/A547G/V638I/L669H/S671N,  
 A281V/S402A/I518V/A547G/W610R/V638I/S668D/L669H,  
 A281V/S402A/I518V/A547G/S668D,  
 A281V/M431V/M507L/I518V/A547G/W610R/V638I/S668D,  
 S402A/M431V/I518V/A547G/W610R/S668D, S402A/M431V/I518V/A547G/S671N,

S402A/M431V/I518V/W610R, S402A/M431V/A547G/V638I/S671N,  
 M431V/M507L/I518V/G541E/A547G/V638I/L669H/S671N,  
 M431V/M507L/I518V/L669H/S671N, M507L/A547G/W610R,  
 M507L/A547G/V638I/L669H/S671N, A547G/W610R/V638I/S671N и A547G/V638I/S668D,  
 где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах  
 осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит по меньшей мере, одну замену или  
 ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из 27, 27/944, 28,  
 29/218/240/668/700/744/869, 29/218/240/700/869, 29/240/596/668/700/744/869,  
 29/240/596/668/869, 29/478, 30, 36/106/150/218/527/750/883/894,  
 106/112/150/218/414/527/793/883, 106/150/169/218/414/486/527/750/894,  
 106/150/169/218/414/486/527/894, 106/150/169/218/414/486/749/793/883/894,  
 106/150/169/218/414/486/750/793/883/894, 106/150/169/218/414/486/793/883,  
 106/150/169/218/414/486/894, 106/150/169/218/414/749/750/793/883,  
 106/150/169/218/414/749/793, 106/150/169/218/414/749/793/883,  
 106/150/169/218/486/749/883, 106/150/169/218/486/883, 106/150/169/414/486/749/750/883,  
 106/150/169/527/749/793/883, 106/150/169/749/793/883/894,  
 106/150/218/331/414/486/527/733/749/793, 106/150/218/414/486/642/750/793/883,  
 106/150/218/414/486/750/793/894, 106/150/218/414/527/749/750/883,  
 106/150/218/414/527/749/793/883/894, 106/150/218/414/749/750/793/883/894,  
 106/150/218/414/749/793/883, 106/150/218/486/527/749/894, 106/150/218/486/793/883,  
 106/150/218/527/793/894, 106/150/245/793/883/894, 106/150/414/749/750/793/894,  
 106/150/414/749/793/894, 106/150/486/527/750/793, 106/150/486/749/793/883/894,  
 106/150/749/793/883, 106/169/185/218/414/749/750/793, 106/191/280/402/414/444/727,  
 106/280/402/414/444/489/727/944, 107, 109, 109/842, 110, 135, 138, 148, 150,  
 150/218/414/486/749/750, 150/218/414/486/750/793, 150/218/414/486/750/793/883,  
 150/218/414/749/750/793/894, 150/218/414/749/793, 150/414/486/527/750/894,  
 150/414/486/749/750/793, 150/486/750/883/894, 169/486/750/793/883,  
 180/275/402/518/547/610/638/669/671, 180/402/431/507/547/610/669/671/793,  
 180/402/507/547/610/671, 191/280/402/414/444/489/500/944,  
 191/280/414/444/489/522/727/944, 191/280/414/944, 191/414/522/842/944,  
 196/402/431/547/610/638, 218/668/700/869, 224/402/507/518/547/638/668,  
 269/275/431/518/547/638/668/669, 274, 275/281/402/431/507/518/610/668,  
 275/281/402/431/518/547/610/669/671, 275/281/402/507/518/547/638/669/671,  
 275/281/402/518/547/610/638/671, 275/281/402/518/547/610/668/669/887,  
 275/281/402/547/610/638/669/671, 275/281/431/518/547/638/669/671,  
 275/281/507/547/669/671, 275/281/610/638/668/669, 275/377/402/507/518/669/671/715,  
 275/402/431/507/547/671, 275/402/431/518/610/638/669/671/922,  
 275/402/507/547/610/638/668/669, 275/402/507/547/610/638/669/671,  
 275/402/507/547/610/671, 275/402/547/610/638/669/671, 275/402/547/638/669/671,  
 275/402/638/669/671, 275/431/507/518/547/668/669/671, 275/431/507/518/610/669/671,

275/431/507/547/610/638/671, 275/431/518/547/638/668, 275/431/518/610/638/669/671,  
 275/431/638, 275/507/518/547/610/638/668/669, 275/507/518/547/638/669/671,  
 275/507/547/610/638/669/671, 275/507/547/668/669/671, 276,  
 281/402/507/518/547/610/638/669/671, 281/402/507/547/638/669/671,  
 281/402/518/547/610/638/668/669, 281/402/518/547/668, 281/431/507/518/547/610/638/668,  
 375, 402/431/518/547/610/668, 402/431/518/547/671, 402/431/518/610, 402/431/547/638/671,  
 403, 414, 418/499, 431/507/518/541/547/638/669/671, 431/507/518/669/671, 437, 471/478,  
 507/547/610, 507/547/638/669/671, 547, 547/610/638/671, 547/638/668, 581, 642, 670, 692,  
 750, 753, 820, 871 и 944, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2. В  
 некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей  
 мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из 27P,  
 27P/944W, 27R, 28P, 28S, 29Q/218S/240I/668D/700F/744V/869L, 29Q/240I/596P/668D/869L,  
 29Q/240I/596S/668D/700F/744V/869T, 29T/478T, 29V/218S/240I/700F/869T, 30G, 30K, 30T,  
 36R/106P/150S/218S/527D/750P/883H/894R, 106P/112S/150S/218S/414G/527D/793K/883H,  
 106P/150S/169S/218S/414G/486E/527D/750P/894R,  
 106P/150S/169S/218S/414G/486E/527D/894R,  
 106P/150S/169S/218S/414G/486E/749E/793K/883H/894R,  
 106P/150S/169S/218S/414G/486E/750P/793K/883H/894R,  
 106P/150S/169S/218S/414G/486E/793K/883H, 106P/150S/169S/218S/414G/486E/894R,  
 106P/150S/169S/218S/414G/749E/750P/793K/883H, 106P/150S/169S/218S/414G/749E/793K,  
 106P/150S/169S/218S/414G/749E/793K/883H, 106P/150S/169S/218S/486E/749E/883H,  
 106P/150S/169S/218S/486E/883H, 106P/150S/169S/414G/486E/749E/750P/883H,  
 106P/150S/169S/527D/749E/793K/883H, 106P/150S/169S/749E/793K/883H/894R,  
 106P/150S/218S/331A/414G/486E/527D/733E/749E/793K,  
 106P/150S/218S/414G/486E/642F/750P/793K/883H,  
 106P/150S/218S/414G/486E/750P/793K/894R, 106P/150S/218S/414G/527D/749E/750P/883H,  
 106P/150S/218S/414G/527D/749E/793K/883H/894G,  
 106P/150S/218S/414G/749E/750P/793K/883H/894R, 106P/150S/218S/414G/749E/793K/883H,  
 106P/150S/218S/486E/527D/749E/894R, 106P/150S/218S/486E/793K/883H,  
 106P/150S/218S/527D/793K/894G, 106P/150S/245S/793K/883H/894R,  
 106P/150S/414G/749E/750P/793K/894R, 106P/150S/414G/749E/793K/894R,  
 106P/150S/486E/527D/750P/793K, 106P/150S/486E/749E/793K/883H/894G,  
 106P/150S/749E/793K/883H, 106P/169S/185G/218S/414G/749E/750P/793K,  
 106P/191R/280D/402A/414G/444P/727P, 106P/280D/402A/414G/444P/489D/727P/944S,  
 107G, 109G/842E, 109P, 110G, 110L, 135Q, 138A, 148G, 148Y, 150G,  
 150S/218S/414G/486A/750P/793K, 150S/218S/414G/486E/749E/750P,  
 150S/218S/414G/486E/750P/793K/883H, 150S/218S/414G/749E/750P/793K/894R,  
 150S/218S/414G/749E/793K, 150S/414G/486E/527D/750P/894R,  
 150S/414G/486E/749E/750P/793K, 150S/486E/750P/883H/894G, 169S/486E/750P/793K/883H,  
 180H/275M/402A/518V/547G/610R/638I/669H/671N,

180H/402A/431V/507L/547G/610R/669H/671N/793G, 180H/402A/507L/547G/610R/671N,  
 191R/280D/402A/414G/444P/489D/500A/944S,  
 191R/280D/414G/444P/489D/522V/727P/944S, 191R/280D/414G/944S,  
 191R/414G/522V/842S/944S, 196V/402A/431V/547G/610R/638I, 218S/668D/700F/869T,  
 224F/402A/507L/518V/547G/638I/668D, 269N/275M/431V/518V/547G/638I/668D/669H,  
 274G, 275M/281V/402A/431V/507L/518V/610R/668D,  
 275M/281V/402A/507L/518V/547G/638I/669H/671N,  
 275M/281V/402A/518V/547G/610R/638I/671N,  
 275M/281V/402A/518V/547G/610R/668D/669H/887D,  
 275M/281V/402A/547G/610R/638I/669H/671N, 275M/281V/507L/547G/669H/671N,  
 275M/281V/610R/638I/668D/669H, 275M/402A/431V/507L/547G/671N,  
 275M/402A/507L/547G/610R/671N, 275M/402A/547G/638I/669H/671N,  
 275M/431V/518V/547G/638I/668D, 275M/431V/518V/610R/638I/669H/671N,  
 275M/431V/638I, 275M/507L/547G/668D/669H/671N,  
 275V/281V/402A/431V/518V/547G/610R/669H/671N,  
 275V/281V/431V/518V/547G/638I/669H/671N,  
 275V/377K/402A/507L/518V/669H/671N/715G,  
 275V/402A/431V/518V/610R/638I/669H/671N/922L,  
 275V/402A/507L/547G/610R/638I/668D/669H,  
 275V/402A/507L/547G/610R/638I/669H/671N, 275V/402A/547G/610R/638I/669H/671N,  
 275V/402A/638I/669H/671N, 275V/431V/507L/518V/547G/668D/669H/671N,  
 275V/431V/507L/518V/610R/669H/671N, 275V/431V/507L/547G/610R/638I/671N,  
 275V/507L/518V/547G/610R/638I/668D/669H, 275V/507L/518V/547G/638I/669H/671N,  
 275V/507L/547G/610R/638I/669H/671N, 276Y,  
 281V/402A/507L/518V/547G/610R/638I/669H/671N,  
 281V/402A/507L/547G/638I/669H/671N, 281V/402A/518V/547G/610R/638I/668D/669H,  
 281V/402A/518V/547G/668D, 281V/431V/507L/518V/547G/610R/638I/668D, 375E,  
 402A/431V/518V/547G/610R/668D, 402A/431V/518V/547G/671N, 402A/431V/518V/610R,  
 402A/431V/547G/638I/671N, 403W, 414P, 418E/499R,  
 431V/507L/518V/541E/547G/638I/669H/671N, 431V/507L/518V/669H/671N, 437S,  
 471Q/478S, 507L/547G/610R, 507L/547G/638I/669H/671N, 547G, 547G/610R/638I/671N,  
 547G/638I/668D, 581G, 581T, 642Q, 642S, 670N, 692Q, 750P, 753T, 820E, 871E и 944G, где  
 положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах  
 осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит по меньшей мере, одну замену или  
 ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из F27P, F27P/C944W, F27R,  
 L28P, L28S, L29Q/L218S/L240I/S668D/H700F/I744V/I869L,  
 L29Q/L240I/A596P/S668D/I869L, L29Q/L240I/A596S/S668D/H700F/I744V/I869T,  
 L29T/A478T, L29V/L218S/L240I/H700F/I869T, V30G, V30K, V30T,  
 G36R/K106P/T150S/L218S/N527D/A750P/R883H/Q894R,  
 K106P/A112S/T150S/L218S/R414G/N527D/E793K/R883H,

K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/T486E/N527D/A750P/Q894R,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/T486E/N527D/Q894R,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/T486E/Q749E/E793K/R883H/Q894R,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/T486E/A750P/E793K/R883H/Q894R,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/T486E/E793K/R883H,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/T486E/Q894R,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/Q749E/A750P/E793K/R883H,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/Q749E/E793K,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/Q749E/E793K/R883H,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/T486E/Q749E/R883H,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/T486E/R883H,  
 K106P/T150S/N169S/R414G/T486E/Q749E/A750P/R883H,  
 K106P/T150S/N169S/N527D/Q749E/E793K/R883H,  
 K106P/T150S/N169S/Q749E/E793K/R883H/Q894R,  
 K106P/T150S/L218S/V331A/R414G/T486E/N527D/D733E/Q749E/E793K,  
 K106P/T150S/L218S/R414G/T486E/L642F/A750P/E793K/R883H,  
 K106P/T150S/L218S/R414G/T486E/A750P/E793K/Q894R,  
 K106P/T150S/L218S/R414G/N527D/Q749E/A750P/R883H,  
 K106P/T150S/L218S/R414G/N527D/Q749E/E793K/R883H/Q894G,  
 K106P/T150S/L218S/R414G/Q749E/A750P/E793K/R883H/Q894R,  
 K106P/T150S/L218S/R414G/Q749E/E793K/R883H,  
 K106P/T150S/L218S/T486E/N527D/Q749E/Q894R,  
 K106P/T150S/L218S/T486E/E793K/R883H,      K106P/T150S/L218S/N527D/E793K/Q894G,  
 K106P/T150S/P245S/E793K/R883H/Q894R,  
 K106P/T150S/R414G/Q749E/A750P/E793K/Q894R,  
 K106P/T150S/R414G/Q749E/E793K/Q894R,      K106P/T150S/T486E/N527D/A750P/E793K,  
 K106P/T150S/T486E/Q749E/E793K/R883H/Q894G,      K106P/T150S/Q749E/E793K/R883H,  
 K106P/N169S/V185G/L218S/R414G/Q749E/A750P/E793K,  
 K106P/H191R/G280D/S402A/R414G/A444P/S727P,  
 K106P/G280D/S402A/R414G/A444P/A489D/S727P/C944S, Q107G, L109G/G842E, L109P,  
 Q110G,      Q110L,      S135Q,      M138A,      T148G,      T148Y,      T150G,  
 T150S/L218S/R414G/T486A/A750P/E793K,      T150S/L218S/R414G/T486E/Q749E/A750P,  
 T150S/L218S/R414G/T486E/A750P/E793K/R883H,  
 T150S/L218S/R414G/Q749E/A750P/E793K/Q894R,      T150S/L218S/R414G/Q749E/E793K,  
 T150S/R414G/T486E/N527D/A750P/Q894R,      T150S/R414G/T486E/Q749E/A750P/E793K,  
 T150S/T486E/A750P/R883H/Q894G,      N169S/T486E/A750P/E793K/R883H,  
 N180H/L275M/S402A/I518V/A547G/W610R/V638I/L669H/S671N,  
 N180H/S402A/M431V/M507L/A547G/W610R/L669H/S671N/E793G,  
 N180H/S402A/M507L/A547G/W610R/S671N,  
 H191R/G280D/S402A/R414G/A444P/A489D/D500A/C944S,

H191R/G280D/R414G/A444P/A489D/E522V/S727P/C944S, H191R/G280D/R414G/C944S,  
 H191R/R414G/E522V/G842S/C944S, A196V/S402A/M431V/A547G/W610R/V638I,  
 L218S/S668D/H700F/I869T, L224F/S402A/M507L/I518V/A547G/V638I/S668D,  
 T269N/L275M/M431V/I518V/A547G/V638I/S668D/L669H, D274G,  
 L275M/A281V/S402A/M431V/M507L/I518V/W610R/S668D,  
 L275M/A281V/S402A/M507L/I518V/A547G/V638I/L669H/S671N,  
 L275M/A281V/S402A/I518V/A547G/W610R/V638I/S671N,  
 L275M/A281V/S402A/I518V/A547G/W610R/S668D/L669H/E887D,  
 L275M/A281V/S402A/A547G/W610R/V638I/L669H/S671N,  
 L275M/A281V/M507L/A547G/L669H/S671N, L275M/A281V/W610R/V638I/S668D/L669H,  
 L275M/S402A/M431V/M507L/A547G/S671N, L275M/S402A/M507L/A547G/W610R/S671N,  
 L275M/S402A/A547G/V638I/L669H/S671N, L275M/M431V/I518V/A547G/V638I/S668D,  
 L275M/M431V/I518V/W610R/V638I/L669H/S671N, L275M/M431V/V638I,  
 L275M/M507L/A547G/S668D/L669H/S671N,  
 L275V/A281V/S402A/M431V/I518V/A547G/W610R/L669H/S671N,  
 L275V/A281V/M431V/I518V/A547G/V638I/L669H/S671N,  
 L275V/R377K/S402A/M507L/I518V/L669H/S671N/V715G,  
 L275V/S402A/M431V/I518V/W610R/V638I/L669H/S671N/P922L,  
 L275V/S402A/M507L/A547G/W610R/V638I/S668D/L669H,  
 L275V/S402A/M507L/A547G/W610R/V638I/L669H/S671N,  
 L275V/S402A/A547G/W610R/V638I/L669H/S671N, L275V/S402A/V638I/L669H/S671N,  
 L275V/M431V/M507L/I518V/A547G/S668D/L669H/S671N,  
 L275V/M431V/M507L/I518V/W610R/L669H/S671N,  
 L275V/M431V/M507L/A547G/W610R/V638I/S671N,  
 L275V/M507L/I518V/A547G/W610R/V638I/S668D/L669H,  
 L275V/M507L/I518V/A547G/V638I/L669H/S671N,  
 L275V/M507L/A547G/W610R/V638I/L669H/S671N, A276Y,  
 A281V/S402A/M507L/I518V/A547G/W610R/V638I/L669H/S671N,  
 A281V/S402A/M507L/A547G/V638I/L669H/S671N,  
 A281V/S402A/I518V/A547G/W610R/V638I/S668D/L669H,  
 A281V/S402A/I518V/A547G/S668D,  
 A281V/M431V/M507L/I518V/A547G/W610R/V638I/S668D, I375E,  
 S402A/M431V/I518V/A547G/W610R/S668D, S402A/M431V/I518V/A547G/S671N,  
 S402A/M431V/I518V/W610R, S402A/M431V/A547G/V638I/S671N, R403W, R414P,  
 A418E/H499R, M431V/M507L/I518V/G541E/A547G/V638I/L669H/S671N,  
 M431V/M507L/I518V/L669H/S671N, A437S, K471Q/A478S, M507L/A547G/W610R,  
 M507L/A547G/V638I/L669H/S671N, A547G, A547G/W610R/V638I/S671N,  
 A547G/V638I/S668D, K581G, K581T, L642Q, L642S, L670N, T692Q, A750P, A753T, G820E,  
 L871E и C944G, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2.

Настоящее изобретение предлагает рекомбинантные кислые альфа-глюкозидазы

и/или биологически активные фрагменты рекомбинантных кислых альфа-глюкозидаз, содержащие аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 93%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из 27, 27/944, 28, 29/218/240/668/700/744/869, 29/218/240/700/869, 29/240/596/668/700/744/869, 29/240/596/668/869, 29/478, 30, 36/106/150/218/527/750/883/894, 88, 106/112/150/218/414/527/793/883, 106/150/169/218/414/486/527/750/894, 106/150/169/218/414/486/527/894, 106/150/169/218/414/486/749/793/883/894, 106/150/169/218/414/486/750/793/883/894, 106/150/169/218/414/486/793/883, 106/150/169/218/414/486/894, 106/150/169/218/414/749/750/793/883, 106/150/169/218/414/749/793, 106/150/169/218/414/749/793/883, 106/150/169/218/486/527/749/793/894, 106/150/169/218/486/749/883, 106/150/169/218/486/883, 106/150/169/218/749/800, 106/150/169/414/486/749/750/883, 106/150/169/527/749/793/883, 106/150/169/749/793/883/894, 106/150/218/331/414/486/527/733/749/793, 106/150/218/414/486/642/750/793/883, 106/150/218/414/486/750/793/894, 106/150/218/414/527/749/750/883, 106/150/218/414/527/749/793/883/894, 106/150/218/414/749/793/883, 106/150/218/486/527/749/894, 106/150/218/486/793/883, 106/150/218/527/749/750/793, 106/150/218/527/793/894, 106/150/218/749/750/793, 106/150/218/793, 106/150/218/793/894, 106/150/245/793/883/894, 106/150/414/749/750/793/894, 106/150/414/749/793/894, 106/150/486/527/750/793, 106/150/486/749/793/883/894, 106/150/749/793/883, 106/169/185/218/414/749/750/793, 106/191/280/402/414/444/727, 106/191/414/444/522/928/944, 106/191/414/489/928/944, 106/280/402/414/444/489/727/944, 107, 109, 109/842, 110, 113, 135, 137, 138, 148, 150, 150/169/218/414/527/793, 150/218/414/486/749/750, 150/218/414/486/750/793, 150/218/414/486/750/793/883, 150/218/414/749/750/793/894, 150/218/414/749/793, 150/218/527/749/793, 150/218/749/750/793, 150/218/749/793, 150/414/486/527/750/894, 150/414/486/749/750/793, 150/486/750/883/894, 169/486/750/793/883, 180/275/402/518/547/610/638/669/671, 180/402/431/507/547/610/669/671/793, 180/402/507/547/610/671, 191/280/402/414/444/465/842/928, 191/280/402/414/444/489/500/944, 191/280/414/444/489/500/522/842/928/944, 191/280/414/444/489/522/727/944, 191/280/414/489/842/928/944, 191/280/414/944, 191/414/522/842/944, 196/402/431/547/610/638, 218/668/700/869, 224/402/507/518/547/638/668, 247, 269/275/431/518/547/638/668/669, 274, 275/281/402/431/507/518/610/668, 275/281/402/431/518/547/610/669/671, 275/281/402/507/518/547/638/669/671, 275/281/402/518/547/610/638/671,



275/281/402/518/547/610/668/669/887, 275/281/402/547/610/638/669/671,  
 275/281/431/518/547/638/669/671, 275/281/507/547/669/671, 275/281/610/638/668/669,  
 275/281/671, 275/377/402/507/518/669/671/715, 275/402/431/507/547/671,  
 275/402/431/518/610/638/669/671/922, 275/402/507/547/610/638/668/669,  
 275/402/507/547/610/638/669/671, 275/402/507/547/610/671, 275/402/547/610/638/669/671,  
 275/402/547/638/669/671, 275/402/638/669/671, 275/431/507/518/547/668/669/671,  
 275/431/507/518/610/669/671, 275/431/507/547/610/638/671, 275/431/518/547/638/668,  
 275/431/518/610/638/669/671, 275/431/638, 275/507/518/547/610/638/668/669,  
 275/507/518/547/638/669/671, 275/507/547/610/638/669/671, 275/507/547/668/669/671,  
 275/518/671, 276, 278, 280/402/536/928, 281/402/507/518/547/610/638/669/671,  
 281/402/507/547/638/669/671, 281/402/518/547/610/638/668/669, 281/402/518/547/668,  
 281/431/507/518/547/610/638/668, 375, 402/431/518/547/610/668, 402/431/518/547/671,  
 402/431/518/610, 402/431/547/638/671, 403, 414, 418, 418/499, 421, 426,  
 431/507/518/541/547/638/669/671, 431/507/518/669/671, 437, 444, 455, 463, 471, 471/478,  
 476, 489, 507/547/610, 507/547/638/669/671, 527, 547, 547/610/638/671, 547/638/668, 581,  
 610, 642, 668, 670, 692, 725/732, 750, 753, 786, 820, 862, 871, 895, 897, 934 и 944, где  
 положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах  
 осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит по меньшей мере, одну замену в  
 положении или ряде положений, выбранных из 27P, 27P/944W, 27R, 28P, 28R, 28S,  
 29Q/218S/240I/668D/700F/744V/869L, 29Q/240I/596P/668D/869L,  
 29Q/240I/596S/668D/700F/744V/869T, 29T/478T, 29V/218S/240I/700F/869T, 30G, 30K, 30T,  
 36R/106P/150S/218S/527D/750P/883H/894R, 88G, 88S,  
 106P/112S/150S/218S/414G/527D/793K/883H,  
 106P/150S/169S/218S/414G/486E/527D/750P/894R,  
 106P/150S/169S/218S/414G/486E/527D/894R,  
 106P/150S/169S/218S/414G/486E/749E/793K/883H/894R,  
 106P/150S/169S/218S/414G/486E/750P/793K/883H/894R,  
 106P/150S/169S/218S/414G/486E/793K/883H, 106P/150S/169S/218S/414G/486E/894R,  
 106P/150S/169S/218S/414G/749E/750P/793K/883H, 106P/150S/169S/218S/414G/749E/793K,  
 106P/150S/169S/218S/414G/749E/793K/883H,  
 106P/150S/169S/218S/486E/527D/749E/793K/894R, 106P/150S/169S/218S/486E/749E/883H,  
 106P/150S/169S/218S/486E/883H, 106P/150S/169S/218S/749E/800A,  
 106P/150S/169S/414G/486E/749E/750P/883H, 106P/150S/169S/527D/749E/793K/883H,  
 106P/150S/169S/749E/793K/883H/894R,  
 106P/150S/218S/331A/414G/486E/527D/733E/749E/793K,  
 106P/150S/218S/414G/486E/642F/750P/793K/883H,  
 106P/150S/218S/414G/486E/750P/793K/894R, 106P/150S/218S/414G/527D/749E/750P/883H,  
 106P/150S/218S/414G/527D/749E/793K/883H/894G,  
 106P/150S/218S/414G/749E/750P/793K/883H/894R, 106P/150S/218S/414G/749E/793K/883H,  
 106P/150S/218S/486E/527D/749E/894R, 106P/150S/218S/486E/793K/883H,

106P/150S/218S/527D/749E/750P/793K, 106P/150S/218S/527D/793K/894G,  
 106P/150S/218S/749E/750P/793K, 106P/150S/218S/793K, 106P/150S/218S/793K/894R,  
 106P/150S/245S/793K/883H/894R, 106P/150S/414G/749E/750P/793K/894R,  
 106P/150S/414G/749E/793K/894R, 106P/150S/486E/527D/750P/793K,  
 106P/150S/486E/749E/793K/883H/894G, 106P/150S/749E/793K/883H,  
 106P/169S/185G/218S/414G/749E/750P/793K, 106P/191R/280D/402A/414G/444P/727P,  
 106P/191R/414G/444P/522V/928T/944S, 106P/191R/414G/489D/928T/944S,  
 106P/280D/402A/414G/444P/489D/727P/944S, 107G, 107P, 109G/842E, 109P, 110G, 110L,  
 113S, 135A, 135Q, 137P, 138A, 148G, 148Y, 150G, 150S/169S/218S/414G/527D/793K,  
 150S/218S/414G/486A/750P/793K, 150S/218S/414G/486E/749E/750P,  
 150S/218S/414G/486E/750P/793K/883H, 150S/218S/414G/749E/750P/793K/894R,  
 150S/218S/414G/749E/793K, 150S/218S/527D/749E/793K, 150S/218S/749E/750P/793K,  
 150S/218S/749E/793K, 150S/414G/486E/527D/750P/894R, 150S/414G/486E/749E/750P/793K,  
 150S/486E/750P/883H/894G, 169S/486E/750P/793K/883H,  
 180H/275M/402A/518V/547G/610R/638I/669H/671N,  
 180H/402A/431V/507L/547G/610R/669H/671N/793G, 180H/402A/507L/547G/610R/671N,  
 191R/280D/402A/414G/444P/465E/842S/928T,  
 191R/280D/402A/414G/444P/489D/500A/944S,  
 191R/280D/414G/444P/489D/500A/522V/842S/928T/944S,  
 191R/280D/414G/444P/489D/522V/727P/944S, 191R/280D/414G/489D/842S/928T/944S,  
 191R/280D/414G/944S, 191R/414G/522V/842S/944S, 196V/402A/431V/547G/610R/638I,  
 218S/668D/700F/869T, 224F/402A/507L/518V/547G/638I/668D, 247R,  
 269N/275M/431V/518V/547G/638I/668D/669H, 274G,  
 275M/281V/402A/431V/507L/518V/610R/668D,  
 275M/281V/402A/507L/518V/547G/638I/669H/671N,  
 275M/281V/402A/518V/547G/610R/638I/671N,  
 275M/281V/402A/518V/547G/610R/668D/669H/887D,  
 275M/281V/402A/547G/610R/638I/669H/671N, 275M/281V/507L/547G/669H/671N,  
 275M/281V/610R/638I/668D/669H, 275M/402A/431V/507L/547G/671N,  
 275M/402A/507L/547G/610R/671N, 275M/402A/547G/638I/669H/671N,  
 275M/431V/518V/547G/638I/668D, 275M/431V/518V/610R/638I/669H/671N,  
 275M/431V/638I, 275M/507L/547G/668D/669H/671N,  
 275V/281V/402A/431V/518V/547G/610R/669H/671N,  
 275V/281V/431V/518V/547G/638I/669H/671N, 275V/281V/671N,  
 275V/377K/402A/507L/518V/669H/671N/715G,  
 275V/402A/431V/518V/610R/638I/669H/671N/922L,  
 275V/402A/507L/547G/610R/638I/668D/669H,  
 275V/402A/507L/547G/610R/638I/669H/671N, 275V/402A/547G/610R/638I/669H/671N,  
 275V/402A/638I/669H/671N, 275V/431V/507L/518V/547G/668D/669H/671N,  
 275V/431V/507L/518V/610R/669H/671N, 275V/431V/507L/547G/610R/638I/671N,

275V/507L/518V/547G/610R/638I/668D/669H, 275V/507L/518V/547G/638I/669H/671N,  
 275V/507L/547G/610R/638I/669H/671N, 275V/518V/671N, 276F, 276Y, 278A, 278G,  
 280D/402A/536I/928T, 281V/402A/507L/518V/547G/610R/638I/669H/671N,  
 281V/402A/507L/547G/638I/669H/671N, 281V/402A/518V/547G/610R/638I/668D/669H,  
 281V/402A/518V/547G/668D, 281V/431V/507L/518V/547G/610R/638I/668D, 375E,  
 402A/431V/518V/547G/610R/668D, 402A/431V/518V/547G/671N, 402A/431V/518V/610R,  
 402A/431V/547G/638I/671N, 403W, 414P, 418E/499R, 418R, 421S, 426R,  
 431V/507L/518V/541E/547G/638I/669H/671N, 431V/507L/518V/669H/671N, 437S, 444T,  
 455V, 463A, 471Q/478S, 471S, 476A, 476H, 489R, 507L/547G/610R,  
 507L/547G/638I/669H/671N, 527R, 547G, 547G/610R/638I/671N, 547G/638I/668D, 581G,  
 581T, 610A, 610G, 610S, 642M, 642Q, 642S, 668H, 670N, 692Q, 725N/732I, 750P, 753T,  
 786P, 786Y, 820E, 862G, 871E, 895R, 897V, 934R, 944G и 944R, где положения  
 пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления,  
 кислая альфа-глюкозидаза содержит по меньшей мере, одну замену в положении или ряде  
 положений, выбранных из F27P, F27P/C944W, F27R, L28P, L28R, L28S,  
 L29Q/L218S/L240I/S668D/H700F/I744V/I869L, L29Q/L240I/A596P/S668D/I869L,  
 L29Q/L240I/A596S/S668D/H700F/I744V/I869T, L29T/A478T,  
 L29V/L218S/L240I/H700F/I869T, V30G, V30K, V30T,  
 G36R/K106P/T150S/L218S/N527D/A750P/R883H/Q894R, K88G, K88S,  
 K106P/A112S/T150S/L218S/R414G/N527D/E793K/R883H,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/T486E/N527D/A750P/Q894R,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/T486E/N527D/Q894R,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/T486E/Q749E/E793K/R883H/Q894R,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/T486E/A750P/E793K/R883H/Q894R,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/T486E/E793K/R883H,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/T486E/Q894R,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/Q749E/A750P/E793K/R883H,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/Q749E/E793K,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/Q749E/E793K/R883H,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/T486E/N527D/Q749E/E793K/Q894R,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/T486E/Q749E/R883H,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/T486E/R883H, K106P/T150S/N169S/L218S/Q749E/P800A,  
 K106P/T150S/N169S/R414G/T486E/Q749E/A750P/R883H,  
 K106P/T150S/N169S/N527D/Q749E/E793K/R883H,  
 K106P/T150S/N169S/Q749E/E793K/R883H/Q894R,  
 K106P/T150S/L218S/V331A/R414G/T486E/N527D/D733E/Q749E/E793K,  
 K106P/T150S/L218S/R414G/T486E/L642F/A750P/E793K/R883H,  
 K106P/T150S/L218S/R414G/T486E/A750P/E793K/Q894R,  
 K106P/T150S/L218S/R414G/N527D/Q749E/A750P/R883H,  
 K106P/T150S/L218S/R414G/N527D/Q749E/E793K/R883H/Q894G,

K106P/T150S/L218S/R414G/Q749E/A750P/E793K/R883H/Q894R,  
 K106P/T150S/L218S/R414G/Q749E/E793K/R883H,  
 K106P/T150S/L218S/T486E/N527D/Q749E/Q894R,  
 K106P/T150S/L218S/T486E/E793K/R883H,  
 K106P/T150S/L218S/N527D/Q749E/A750P/E793K,  
 K106P/T150S/L218S/N527D/E793K/Q894G,      K106P/T150S/L218S/Q749E/A750P/E793K,  
 K106P/T150S/L218S/E793K,      K106P/T150S/L218S/E793K/Q894R,  
 K106P/T150S/P245S/E793K/R883H/Q894R,  
 K106P/T150S/R414G/Q749E/A750P/E793K/Q894R,  
 K106P/T150S/R414G/Q749E/E793K/Q894R,      K106P/T150S/T486E/N527D/A750P/E793K,  
 K106P/T150S/T486E/Q749E/E793K/R883H/Q894G,      K106P/T150S/Q749E/E793K/R883H,  
 K106P/N169S/V185G/L218S/R414G/Q749E/A750P/E793K,  
 K106P/H191R/G280D/S402A/R414G/A444P/S727P,  
 K106P/H191R/R414G/A444P/E522V/D928T/C944S,  
 K106P/H191R/R414G/A489D/D928T/C944S,  
 K106P/G280D/S402A/R414G/A444P/A489D/S727P/C944S, Q107G, Q107P, L109G/G842E,  
 L109P, Q110G, Q110L, Q113S, S135A, S135Q, E137P, M138A, T148G, T148Y, T150G,  
 T150S/N169S/L218S/R414G/N527D/E793K,      T150S/L218S/R414G/T486A/A750P/E793K,  
 T150S/L218S/R414G/T486E/Q749E/A750P,  
 T150S/L218S/R414G/T486E/A750P/E793K/R883H,  
 T150S/L218S/R414G/Q749E/A750P/E793K/Q894R,      T150S/L218S/R414G/Q749E/E793K,  
 T150S/L218S/N527D/Q749E/E793K,      T150S/L218S/Q749E/A750P/E793K,  
 T150S/L218S/Q749E/E793K,      T150S/R414G/T486E/N527D/A750P/Q894R,  
 T150S/R414G/T486E/Q749E/A750P/E793K,      T150S/T486E/A750P/R883H/Q894G,  
 N169S/T486E/A750P/E793K/R883H,  
 N180H/L275M/S402A/I518V/A547G/W610R/V638I/L669H/S671N,  
 N180H/S402A/M431V/M507L/A547G/W610R/L669H/S671N/E793G,  
 N180H/S402A/M507L/A547G/W610R/S671N,  
 H191R/G280D/S402A/R414G/A444P/G465E/G842S/D928T,  
 H191R/G280D/S402A/R414G/A444P/A489D/D500A/C944S,  
 H191R/G280D/R414G/A444P/A489D/D500A/E522V/G842S/D928T/C944S,  
 H191R/G280D/R414G/A444P/A489D/E522V/S727P/C944S,  
 H191R/G280D/R414G/A489D/G842S/D928T/C944S,      H191R/G280D/R414G/C944S,  
 H191R/R414G/E522V/G842S/C944S,      A196V/S402A/M431V/A547G/W610R/V638I,  
 L218S/S668D/H700F/I869T,      L224F/S402A/M507L/I518V/A547G/V638I/S668D,      Q247R,  
 T269N/L275M/M431V/I518V/A547G/V638I/S668D/L669H,      D274G,  
 L275M/A281V/S402A/M431V/M507L/I518V/W610R/S668D,  
 L275M/A281V/S402A/M507L/I518V/A547G/V638I/L669H/S671N,  
 L275M/A281V/S402A/I518V/A547G/W610R/V638I/S671N,  
 L275M/A281V/S402A/I518V/A547G/W610R/S668D/L669H/E887D,

L275M/A281V/S402A/A547G/W610R/V638I/L669H/S671N,  
 L275M/A281V/M507L/A547G/L669H/S671N, L275M/A281V/W610R/V638I/S668D/L669H,  
 L275M/S402A/M431V/M507L/A547G/S671N, L275M/S402A/M507L/A547G/W610R/S671N,  
 L275M/S402A/A547G/V638I/L669H/S671N, L275M/M431V/I518V/A547G/V638I/S668D,  
 L275M/M431V/I518V/W610R/V638I/L669H/S671N, L275M/M431V/V638I,  
 L275M/M507L/A547G/S668D/L669H/S671N,  
 L275V/A281V/S402A/M431V/I518V/A547G/W610R/L669H/S671N,  
 L275V/A281V/M431V/I518V/A547G/V638I/L669H/S671N, L275V/A281V/S671N,  
 L275V/R377K/S402A/M507L/I518V/L669H/S671N/V715G,  
 L275V/S402A/M431V/I518V/W610R/V638I/L669H/S671N/P922L,  
 L275V/S402A/M507L/A547G/W610R/V638I/S668D/L669H,  
 L275V/S402A/M507L/A547G/W610R/V638I/L669H/S671N,  
 L275V/S402A/A547G/W610R/V638I/L669H/S671N, L275V/S402A/V638I/L669H/S671N,  
 L275V/M431V/M507L/I518V/A547G/S668D/L669H/S671N,  
 L275V/M431V/M507L/I518V/W610R/L669H/S671N,  
 L275V/M431V/M507L/A547G/W610R/V638I/S671N,  
 L275V/M507L/I518V/A547G/W610R/V638I/S668D/L669H,  
 L275V/M507L/I518V/A547G/V638I/L669H/S671N,  
 L275V/M507L/A547G/W610R/V638I/L669H/S671N, L275V/I518V/S671N, A276F, A276Y,  
 T278A, T278G, G280D/S402A/V536I/D928T,  
 A281V/S402A/M507L/I518V/A547G/W610R/V638I/L669H/S671N,  
 A281V/S402A/M507L/A547G/V638I/L669H/S671N,  
 A281V/S402A/I518V/A547G/W610R/V638I/S668D/L669H,  
 A281V/S402A/I518V/A547G/S668D,  
 A281V/M431V/M507L/I518V/A547G/W610R/V638I/S668D, I375E,  
 S402A/M431V/I518V/A547G/W610R/S668D, S402A/M431V/I518V/A547G/S671N,  
 S402A/M431V/I518V/W610R, S402A/M431V/A547G/V638I/S671N, R403W, R414P,  
 A418E/H499R, A418R, Q421S, G426R,  
 M431V/M507L/I518V/G541E/A547G/V638I/L669H/S671N,  
 M431V/M507L/I518V/L669H/S671N, A437S, A444T, R455V, E463A, K471Q/A478S, K471S,  
 S476A, S476H, A489R, M507L/A547G/W610R, M507L/A547G/V638I/L669H/S671N, N527R,  
 A547G, A547G/W610R/V638I/S671N, A547G/V638I/S668D, K581G, K581T, W610A,  
 W610G, W610S, L642M, L642Q, L642S, S668H, L670N, T692Q, K725N/V732I, A750P,  
 A753T, R786P, R786Y, G820E, R862G, L871E, K895R, T897V, L934R, C944G и C944R, где  
 положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 6.

Настоящее изобретение предлагает рекомбинантные кислые альфа-глюкозидазы и/или биологически активные фрагменты рекомбинантных кислых альфа-глюкозидаз, содержащие аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 93%, по меньшей

мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из 4, 27, 27/28/489, 27/418/478, 28, 28/29, 28/29/113/135/138, 28/29/113/135/418, 28/29/135, 28/29/418, 29/113/126/135/193, 29/113/135, 29/113/135/455, 29/113/138, 29/148, 29/478, 106, 106/138/218/431/671/749, 106/218/281, 106/218/455, 106/218/455/507/749, 106/489/671, 106/638, 106/671/934, 113, 113/135/418, 113/418/455/478/581, 113/418/478/489/581, 135, 135/148/150/418, 135/478/489/581, 135/489, 135/944, 138/218/668/671, 138/218/749/934, 138/671/749/934, 157, 218, 218/281, 218/281/431, 218/281/671, 218/431, 218/431/489/507/749/934, 218/455, 218/507/749, 218/507/934, 218/638/671, 218/749, 281/431/489/668, 345/934, 418, 418/489, 431/668/671, 489/638/934, 489/671/934, 489/749, 489/934, 507/668, 507/671/934, 671/749, 671/934 и 749/784, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из 4Н, 27P/28S/489R, 27P/418E/478T, 27R, 28S, 28S/29T, 28S/29T/113S/135Q/138A, 28S/29T/113S/135Q/418E, 28S/29T/135Q, 28S/29T/418E, 29T/113S/126Q/135Q/193Q, 29T/113S/135Q, 29T/113S/135Q/455V, 29T/113S/138A, 29T/148G, 29T/478T, 106P, 106P/138A/218S/431V/671N/749E, 106P/218S/281V, 106P/218S/455V, 106P/218S/455V/507L/749E, 106P/489R/671N, 106P/638I, 106P/671N/934R, 113S, 113S/135Q/418E, 113S/418E/455V/478T/581T, 113S/418E/478T/489R/581T, 135P/944Y, 135Q, 135Q/148G/150G/418E, 135Q/478T/489R/581T, 135Q/489R, 138A/218S/668D/671N, 138A/218S/749E/934R, 138A/671N/749E/934R, 157M, 218S, 218S/281V, 218S/281V/431V, 218S/281V/671N, 218S/431V, 218S/431V/489R/507L/749E/934R, 218S/455V, 218S/507L/749E, 218S/507L/934R, 218S/638I/671N, 218S/749E, 281V/431V/489R/668D, 345K/934R, 418E, 418E/489R, 431V/668D/671N, 489R/638I/934R, 489R/671N/934R, 489R/749E, 489R/934R, 507L/668D, 507L/671N/934R, 671N/749E, 671N/934R и 749E/784T, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из P4H, F27P/L28S/A489R, F27P/A418E/A478T, F27R, L28S, L28S/L29T, L28S/L29T/Q113S/S135Q/M138A, L28S/L29T/Q113S/S135Q/A418E, L28S/L29T/S135Q, L28S/L29T/A418E, L29T/Q113S/P126Q/S135Q/H193Q, L29T/Q113S/S135Q, L29T/Q113S/S135Q/R455V, L29T/Q113S/M138A, L29T/T148G, L29T/A478T, K106P, K106P/M138A/L218S/M431V/S671N/Q749E, K106P/L218S/A281V, K106P/L218S/R455V, K106P/L218S/R455V/M507L/Q749E, K106P/A489R/S671N, K106P/V638I, K106P/S671N/L934R, Q113S, Q113S/S135Q/A418E, Q113S/A418E/R455V/A478T/K581T, Q113S/A418E/A478T/A489R/K581T, S135P/C944Y, S135Q, S135Q/T148G/S150G/A418E, S135Q/A478T/A489R/K581T, S135Q/A489R, M138A/L218S/S668D/S671N, M138A/L218S/Q749E/L934R, M138A/S671N/Q749E/L934R,

L157M, L218S, L218S/A281V, L218S/A281V/M431V, L218S/A281V/S671N, L218S/M431V, L218S/M431V/A489R/M507L/Q749E/L934R, L218S/R455V, L218S/M507L/Q749E, L218S/M507L/L934R, L218S/V638I/S671N, L218S/Q749E, A281V/M431V/A489R/S668D, Q345K/L934R, A418E, A418E/A489R, M431V/S668D/S671N, A489R/V638I/L934R, A489R/S671N/L934R, A489R/Q749E, A489R/L934R, M507L/S668D, M507L/S671N/L934R, S671N/Q749E, S671N/L934R и Q749E/A784, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из 27, 27/418/478, 28, 28/29, 28/29/113/135/138, 28/29/113/135/418, 28/29/135, 28/29/418, 29/113/126/135/193, 29/113/135, 29/113/135/455, 29/113/138, 29/148, 29/478, 106, 106/138/218/431/671/749, 106/489/671, 106/638, 113/135/418, 113/418/455/478/581, 113/418/478/489/581, 135, 135/148/150/418, 135/478/489/581, 135/944, 138/218/668/671, 157, 218/638/671, 418, 418/489, 431/668/671, 507/668 и 671/749, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из 27P/418E/478T, 27R, 28S, 28S/29T, 28S/29T/113S/135Q/138A, 28S/29T/113S/135Q/418E, 28S/29T/135Q, 28S/29T/418E, 29T/113S/126Q/135Q/193Q, 29T/113S/135Q, 29T/113S/135Q/455V, 29T/113S/138A, 29T/148G, 29T/478T, 106P, 106P/138A/218S/431V/671N/749E, 106P/489R/671N, 106P/638I, 113S/135Q/418E, 113S/418E/455V/478T/581T, 113S/418E/478T/489R/581T, 135P/944Y, 135Q, 135Q/148G/150G/418E, 135Q/478T/489R/581T, 138A/218S/668D/671N, 157M, 218S/638I/671N, 418E, 418E/489R, 431V/668D/671N, 507L/668D и 671N/749E, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из F27P/A418E/A478T, F27R, L28S, L28S/L29T, L28S/L29T/Q113S/S135Q/M138A, L28S/L29T/Q113S/S135Q/A418E, L28S/L29T/S135Q, L28S/L29T/A418E, L29T/Q113S/P126Q/S135Q/H193Q, L29T/Q113S/S135Q, L29T/Q113S/S135Q/R455V, L29T/Q113S/M138A, L29T/T148G, L29T/A478T, K106P, K106P/M138A/L218S/M431V/S671N/Q749E, K106P/A489R/S671N, K106P/V638I, Q113S/S135Q/A418E, Q113S/A418E/R455V/A478T/K581T, Q113S/A418E/A478T/A489R/K581T, S135P/C944Y, S135Q, S135Q/T148G/S150G/A418E, S135Q/A478T/A489R/K581T, M138A/L218S/S668D/S671N, L157M, L218S/V638I/S671N, A418E, A418E/A489R, M431V/S668D/S671N, M507L/S668D и S671N/Q749E, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 8.

Настоящее изобретение также предлагает рекомбинантные кислые альфа-глюкозидазы и/или биологически активные фрагменты рекомбинантных кислых альфа-глюкозидаз, содержащие аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 93%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей

мере, 97%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из 4, 27, 27/28/489, 27/418/478, 28, 28/29, 28/29/113/135/138, 28/29/113/135/418, 28/29/135, 28/29/418, 29/113/126/135/193, 29/113/135, 29/113/135/455, 29/113/138, 29/148, 29/478, 106, 106/138/218/431/671/749, 106/218/281, 106/218/455, 106/218/455/507/749, 106/489/671, 106/638, 106/671/934, 113, 113/135/418, 113/418/455/478/581, 113/418/478/489/581, 135, 135/148/150/418, 135/478/489/581, 135/489, 135/944, 138/218/668/671, 138/218/749/934, 138/671/749/934, 157, 218, 218/281/431, 218/281/671, 218/431, 218/455, 218/507/749, 218/638/671, 218/749, 281/431/489/668, 345/934, 418, 418/489, 431/668/671, 489/638/934, 489/671/934, 489/749, 489/934, 507/668, 507/671/934, 671/749, 671/934 и 749/784, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из 4H, 27P/28S/489R, 27P/418E/478T, 27R, 28S, 28S/29T, 28S/29T/113S/135Q/138A, 28S/29T/113S/135Q/418E, 28S/29T/135Q, 28S/29T/418E, 29T/113S/126Q/135Q/193Q, 29T/113S/135Q, 29T/113S/135Q/455V, 29T/113S/138A, 29T/148G, 29T/478T, 106P, 106P/138A/218S/431V/671N/749E, 106P/218S/281V, 106P/218S/455V, 106P/218S/455V/507L/749E, 106P/489R/671N, 106P/638I, 106P/671N/934R, 113S, 113S/135Q/418E, 113S/418E/455V/478T/581T, 113S/418E/478T/489R/581T, 135P/944Y, 135Q, 135Q/148G/150G/418E, 135Q/478T/489R/581T, 135Q/489R, 138A/218S/668D/671N, 138A/218S/749E/934R, 138A/671N/749E/934R, 157M, 218S, 218S/281V/431V, 218S/281V/671N, 218S/431V, 218S/455V, 218S/507L/749E, 218S/638I/671N, 218S/749E, 281V/431V/489R/668D, 345K/934R, 418E, 418E/489R, 431V/668D/671N, 489R/638I/934R, 489R/671N/934R, 489R/749E, 489R/934R, 507L/668D, 507L/671N/934R, 671N/749E, 671N/934 и 749E/784T, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из P4H, F27P/L28S/A489R, F27P/A418E/A478T, F27R, L28S, L28S/L29T, L28S/L29T/Q113S/S135Q/M138A, L28S/L29T/Q113S/S135Q/A418E, L28S/L29T/S135Q, L28S/L29T/A418E, L29T/Q113S/P126Q/S135Q/H193Q, L29T/Q113S/S135Q, L29T/Q113S/S135Q/R455V, L29T/Q113S/M138A, L29T/T148G, L29T/A478T, K106P, K106P/M138A/L218S/M431V/S671N/Q749E, K106P/L218S/A281V, K106P/L218S/R455V, K106P/L218S/R455V/M507L/Q749E, K106P/A489R/S671N, K106P/V638I, K106P/S671N/L934R, Q113S, Q113S/S135Q/A418E, Q113S/A418E/R455V/A478T/K581T, Q113S/A418E/A478T/A489R/K581T, S135P/C944Y, S135Q, S135Q/T148G/S150G/A418E, S135Q/A478T/A489R/K581T, S135Q/A489R, M138A/L218S/S668D/S671N, M138A/L218S/Q749E/L934R, M138A/S671N/Q749E/L934R, L157M, L218S, L218S/A281V/M431V, L218S/A281V/S671N, L218S/M431V, L218S/R455V, L218S/M507L/Q749E, L218S/V638I/S671N, L218S/Q749E, A281V/M431V/A489R/S668D,



Q345K/L934R, A418E, A418E/A489R, M431V/S668D/S671N, A489R/V638I/L934R, A489R/S671N/L934R, A489R/Q749E, A489R/L934R, M507L/S668D, M507L/S671N/L934R, S671N/Q749E, S671N/L934R и Q749E/A784T, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 12.

Настоящее изобретение предлагает рекомбинантные кислые альфа-глюкозидазы и/или биологически активные фрагменты рекомбинантных кислых альфа-глюкозидаз, содержащие аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 93%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 14. Настоящее изобретение предлагает рекомбинантные кислые альфа-глюкозидазы и/или биологически активные фрагменты рекомбинантных кислых альфа-глюкозидаз, содержащие аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 93%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из 22, 24, 27, 27/165, 30, 33, 34, 37/62, 37/62/79/196/696/862, 37/62/523, 37/62/523/793, 37/64/66/79/154/523/681/793/862, 37/79/154/793, 37/196, 37/528/696/793, 37/528/790, 37/528/790/793/862, 37/790/793, 39, 39/58/489/725/830/842/930/944, 39/70/109/830/842, 39/70/489/612, 39/70/725, 39/267, 39/267/489/522/612/830/842, 39/267/489/830/944, 39/489/500/612, 39/500/612, 40, 44/157, 47, 49, 50, 55, 60/500/612, 62/79/154/862, 62/79/196/681/862, 62/79/523/528/790, 62/79/790/793, 62/79/862, 62/92, 62/92/790/793, 62/106/523/528/696/793/862, 62/154/696/793/862, 62/793/862, 68, 70, 70/267/725/944, 70/267/930/944, 70/489/930, 70/725/830/860/930/944, 77, 79/154/681, 79/154/793/862, 79/862, 89, 97, 106/154, 107, 109, 109/522/612/725, 109/522/830/944, 109/612, 118, 149, 157, 158, 178, 179, 196/528/681/790/793, 207, 208, 217, 267/489/500/725/830/930, 267/522/725, 352, 385, 424, 448, 463, 489/830/944, 500, 500/612/830/860, 500/860/930, 500/930/944, 522/725, 523, 523/790/793, 528/681, 528/793, 528/862, 672, 673, 725, 734, 740, 753, 774, 778, 793, 830, 844, 862, 875, 880, 892, 902, 922, 925, 930, 932, 934, 938 и 944, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 14 и/или 16. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из 22R, 24E, 24R, 24W, 27A, 27G, 27G/165I, 27K, 27R, 27S, 27V, 27W, 30D, 30L, 33G, 33P, 34D, 34M, 34T, 37F/62E, 37F/62E/79S/196T/696S/862Q, 37F/62E/523N, 37F/62E/523N/793K, 37F/64Q/66G/79S/154R/523N/681Q/793K/862Q, 37F/79S/154R/793K, 37F/196T, 37F/528S/696S/793K, 37F/528S/790V, 37F/528S/790V/793K/862Q,

37F/790V/793K, 39D, 39H, 39Q, 39Q/58L/489D/725E/830K/842S/930P/944S,  
 39Q/70A/109P/830K/842S, 39Q/70A/489D/612D, 39Q/70A/725E, 39Q/267K,  
 39Q/267K/489D/522V/612D/830K/842S, 39Q/267K/489D/830K/944S, 39Q/489D/500A/612D,  
 39Q/500A/612D, 40W, 44I/157V, 47G, 47R, 49A, 49G, 50G, 50L, 50V, 55C, 55L,  
 60V/500A/612D, 62E/79S/154R/862Q, 62E/79S/196T/681Q/862Q, 62E/79S/523N/528S/790V,  
 62E/79S/790V/793K, 62E/79S/862Q, 62E/92R, 62E/92R/790V/793K,  
 62E/106R/523N/528S/696S/793K/862Q, 62E/154R/696S/793K/862Q, 62E/793K/862Q, 68N,  
 68S, 68W, 70A/267K/725E/944S, 70A/267K/930P/944S, 70A/489D/930P,  
 70A/725E/830K/860F/930P/944S, 70Q, 77W, 79S/154R/681Q, 79S/154R/793K/862Q,  
 79S/862Q, 89R, 97D, 97G, 106R/154R, 107G, 109D, 109P/522V/612D/725E,  
 109P/522V/830K/944S, 109P/612D, 118F, 149R, 157Q, 158E, 158F, 178G, 178V, 179L,  
 196T/528S/681Q/790V/793K, 207R, 207Y, 208G, 208I, 217A, 217D,  
 267K/489D/500A/725E/830K/930P, 267K/522V/725E, 352K, 352V, 385G, 424K, 448L, 463A,  
 489D/830K/944S, 500A, 500A/612D/830K/860F, 500A/860F/930P, 500A/930P/944S,  
 522V/725E, 523N, 523N/790V/793K, 528S/681Q, 528S/793K, 528S/862Q, 672E, 672K, 673N,  
 673R, 725F, 725V, 734K, 740G, 740Q, 753S, 774G, 774S, 778Q, 793K, 830V, 844R, 862Q,  
 875D, 880R, 892L, 902L, 922E, 925A, 925W, 930P, 932A, 934F, 938A, 938P, 944R и 944S,  
 где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 14 и/или 16. В некоторых  
 вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну  
 замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из I22R, L24E,  
 L24R, L24W, F27A, F27G, F27G/M165I, F27K, F27R, F27S, F27V, F27W, V30D, V30L,  
 E33G, E33P, L34D, L34M, L34T, S37F/A62E, S37F/A62E/N79S/A196T/A696S/R862Q,  
 S37F/A62E/D523N, S37F/A62E/D523N/E793K,  
 S37F/P64Q/R66G/N79S/K154R/D523N/E681Q/E793K/R862Q, S37F/N79S/K154R/E793K,  
 S37F/A196T, S37F/N528S/A696S/E793K, S37F/N528S/I790V,  
 S37F/N528S/I790V/E793K/R862Q, S37F/I790V/E793K, P39D, P39H, P39Q,  
 P39Q/R58L/A489D/K725E/Q830K/G842S/C930P/C944S, P39Q/V70A/L109P/Q830K/G842S,  
 P39Q/V70A/A489D/S612D, P39Q/V70A/K725E, P39Q/R267K,  
 P39Q/R267K/A489D/E522V/S612D/Q830K/G842S, P39Q/R267K/A489D/Q830K/C944S,  
 P39Q/A489D/D500A/S612D, P39Q/D500A/S612D, V40W, T44I/L157V, A47G, A47R, Q49A,  
 Q49G, Q50G, Q50L, Q50V, P55C, P55L, A60V/D500A/S612D, A62E/N79S/K154R/R862Q,  
 A62E/N79S/A196T/E681Q/R862Q, A62E/N79S/D523N/N528S/I790V,  
 A62E/N79S/I790V/E793K, A62E/N79S/R862Q, A62E/Q92R, A62E/Q92R/I790V/E793K,  
 A62E/K106R/D523N/N528S/A696S/E793K/R862Q, A62E/K154R/A696S/E793K/R862Q,  
 A62E/E793K/R862Q, R68N, R68S, R68W, V70A/R267K/K725E/C944S,  
 V70A/R267K/C930P/C944S, V70A/A489D/C930P,  
 V70A/K725E/Q830K/L860F/C930P/C944S, V70Q, P77W, N79S/K154R/E681Q,  
 N79S/K154R/E793K/R862Q, N79S/R862Q, A89R, A97D, A97G, K106R/K154R, Q107G,  
 L109D, L109P/E522V/S612D/K725E, L109P/E522V/Q830K/C944S, L109P/S612D, W118F,  
 P149R, L157Q, T158E, T158F, P178G, P178V, A179L, A196T/N528S/E681Q/I790V/E793K,

E207R, E207Y, E208G, E208I, Q217A, Q217D, R267K/A489D/D500A/K725E/Q830K/C930P, R267K/E522V/K725E, Y352K, Y352V, R385G, H424K, R448L, E463A, A489D/Q830K/C944S, D500A, D500A/S612D/Q830K/L860F, D500A/L860F/C930P, D500A/C930P/C944S, E522V/K725E, D523N, D523N/I790V/E793K, N528S/E681Q, N528S/E793K, N528S/R862Q, L672E, L672K, P673N, P673R, K725F, K725V, H734K, E740G, E740Q, A753S, A774G, A774S, L778Q, E793K, Q830V, E844R, R862Q, N875D, E880R, Q892L, A902L, P922E, K925A, K925W, C930P, S932A, L934F, Q938A, Q938P, C944R и C944S, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 14 и/или 16.

Настоящее изобретение также предлагает рекомбинантные кислые альфа-глюкозидазы и/или биологически активные фрагменты рекомбинантных кислых альфа-глюкозидаз, содержащие аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 93%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 18, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из 22, 24, 27, 27/165, 30, 33, 34, 37/62, 37/62/79/196/696/862, 37/62/523, 37/196, 37/528/790, 39, 39/70/109/830/842, 39/70/725, 39/267, 39/267/489/522/612/830/842, 39/267/489/830/944, 40, 70/267/725/944, 70/267/930/944, 70/489/930, 107, 109, 109/522/830/944, 217, 267/489/500/725/830/930, 267/522/725, 352, 385, 500/930/944, 673, 734, 774, 778, 875, 930, 932 и 934, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из 22R, 24E, 24R, 24W, 27G, 27G/165I, 27K, 27R, 27W, 30D, 33G, 34D, 34M, 34T, 37F/62E, 37F/62E/79S/196T/696S/862Q, 37F/62E/523N, 37F/196T, 37F/528S/790V, 39D, 39Q, 39Q/70A/109P/830K/842S, 39Q/70A/725E, 39Q/267K, 39Q/267K/489D/522V/612D/830K/842S, 39Q/267K/489D/830K/944S, 40W, 70A/267K/725E/944S, 70A/267K/930P/944S, 70A/489D/930P, 107G, 109D, 109P/522V/830K/944S, 217D, 267K/489D/500A/725E/830K/930P, 267K/522V/725E, 352K, 352V, 385G, 500A/930P/944S, 673N, 734K, 774G, 778Q, 875D, 930P, 932A и 934F, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из I22R, L24E, L24R, L24W, F27G, F27G/M165I, F27K, F27R, F27W, V30D, E33G, L34D, L34M, L34T, S37F/A62E, S37F/A62E/N79S/A196T/A696S/R862Q, S37F/A62E/D523N, S37F/A196T, S37F/N528S/I790V, P39D, P39Q, P39Q/V70A/L109P/Q830K/G842S, P39Q/V70A/K725E, P39Q/R267K, P39Q/R267K/A489D/E522V/S612D/Q830K/G842S, P39Q/R267K/A489D/Q830K/C944S, V40W, V70A/R267K/K725E/C944S,

V70A/R267K/C930P/C944S, V70A/A489D/C930P, Q107G, L109D, L109P/E522V/Q830K/C944S, Q217D, R267K/A489D/D500A/K725E/Q830K/C930P, R267K/E522V/K725E, Y352K, Y352V, R385G, D500A/C930P/C944S, P673N, H734K, A774G, L778Q, N875D, C930P, S932A и L934F, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 18.

Настоящее изобретение также предлагает рекомбинантные кислые альфа-глюкозидазы и/или биологически активные фрагменты рекомбинантных кислых альфа-глюкозидаз, содержащие аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 93%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 20, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из 22/24, 22/24/27/50/107/109/489/612/725, 22/24/27/489, 22/24/27/489/612/774, 22/24/27/612/944, 22/24/50/109/267/489/774/944, 22/24/50/267/612/922/944, 22/24/107/267/489/922, 22/24/489, 22/24/612/725/944, 22/50/107/267/489/612/944, 22/50/109/267/489, 22/267/489/612, 24, 24/27/50/107/267/774/944, 24/27/89/500/842, 24/27/107/267/612/944, 24/27/267/944, 24/27/500/842, 24/27/500/842/932, 24/27/944, 24/39/49/89/97/842/932, 24/39/68/89/107/500/842, 24/39/89/97/842/932, 24/39/842/932, 24/50/489/944, 24/50/612, 24/70/107/109/489/612/725, 24/70/267/774, 24/89/500, 24/107/109/267/489/612/725/774, 24/109/612, 24/109/944, 24/267/725/944, 24/489/944, 24/725, 24/842/932, 24/944, 27/39/49/97/500/842, 27/49/68/500/842, 34/39/500/932, 39/89/97/500, 42, 48, 50/109/489/612, 50/489/774, 50/612/944, 57, 62, 68, 68/89/97/932, 71, 88, 89/97/107, 89/97/500, 89/842, 107/109, 107/500/842, 108, 109/612/774/944, 112, 123, 124, 148, 188, 193, 197, 204, 253, 264, 305, 312, 333, 381, 402, 402/781, 489, 489/944, 500/842, 500/932, 523, 527, 612, 612/725/944, 612/922, 614, 727, 742, 748, 820, 823, 832, 842/932, 858, 862, 911, 913, 914, 916, 923, 937 и 940, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из 22R/24W, 22R/24W/27A/50V/107G/109D/489A/612S/725E, 22R/24W/27A/489A, 22R/24W/27A/489A/612S/774S, 22R/24W/27A/612S/944R, 22R/24W/50V/109D/267R/489A/774S/944R, 22R/24W/50V/267R/612S/922E/944R, 22R/24W/107G/267R/489A/922E, 22R/24W/489A, 22R/24W/612S/725E/944R, 22R/50V/107G/267R/489A/612S/944S, 22R/50V/109D/267R/489A, 22R/267R/489A/612S, 24R, 24R/27G/89R/500A/842G, 24R/27G/500A/842G, 24R/27G/500A/842G/932A, 24R/39D/68S/89R/107G/500A/842G, 24R/39H/49G/89R/97G/842G/932A, 24R/39H/89R/97D/842G/932A, 24R/39H/842G/932A, 24R/89R/500A, 24R/842G/932A, 24W, 24W/27A/50V/107G/267R/774S/944S, 24W/27A/107G/267R/612S/944S,

24W/27A/267R/944R, 24W/27A/944R, 24W/50V/489A/944S, 24W/50V/612S,  
 24W/70A/107G/109D/489A/612S/725E, 24W/70A/267R/774S,  
 24W/107G/109D/267R/489A/612S/725E/774S, 24W/109D/612S, 24W/109D/944S,  
 24W/267R/725E/944S, 24W/489A/944R, 24W/725E, 24W/944S,  
 27G/39H/49G/97G/500A/842G, 27G/49G/68S/500A/842G, 34T/39D/500A/932A,  
 39D/89R/97G/500A, 42G, 48Q, 48V, 48W, 50V/109D/489A/612S, 50V/489A/774S,  
 50V/612S/944S, 57F, 57L, 57M, 62F, 62L, 62W, 68N/89R/97G/932A, 68S, 71G, 71L, 71V,  
 71W, 71Y, 88L, 88R, 89R/97G/107G, 89R/97G/500A, 89R/842G, 107G/109D,  
 107G/500A/842G, 108R, 109D/612S/774S/944S, 112H, 123L, 123V, 124G, 124M, 124V, 148K,  
 148R, 188R, 188W, 193E, 193P, 197G, 204A, 253M, 264M, 305F, 312A, 333L, 381R, 381V,  
 381W, 402N, 402V/781Q, 489A, 489A/944R, 500A/842G, 500A/932A, 523E, 527R, 527V,  
 612S, 612S/725E/944S, 612S/922E, 614Q, 614R, 614W, 727W, 742V, 748V, 820A, 820V,  
 823F, 823V, 832A, 832R, 842G/932A, 858C, 858W, 862I, 862M, 862Q, 862Y, 911G, 911R,  
 913G, 913R, 913W, 914G, 914I, 914K, 914Q, 914R, 914S, 914T, 916G, 916H, 916R, 923L,  
 923V, 923W, 937K и 940Q, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 20.  
 В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей  
 мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из I22R/L24W,  
 I22R/L24W/F27A/Q50V/Q107G/L109D/D489A/D612S/K725E, I22R/L24W/F27A/D489A,  
 I22R/L24W/F27A/D489A/D612S/A774S, I22R/L24W/F27A/D612S/C944R,  
 I22R/L24W/Q50V/L109D/K267R/D489A/A774S/C944R,  
 I22R/L24W/Q50V/K267R/D612S/P922E/C944R, I22R/L24W/Q107G/K267R/D489A/P922E,  
 I22R/L24W/D489A, I22R/L24W/D612S/K725E/C944R,  
 I22R/Q50V/Q107G/K267R/D489A/D612S/C944S, I22R/Q50V/L109D/K267R/D489A,  
 I22R/K267R/D489A/D612S, L24R, L24R/F27G/A89R/D500A/S842G,  
 L24R/F27G/D500A/S842G, L24R/F27G/D500A/S842G/S932A,  
 L24R/Q39D/R68S/A89R/Q107G/D500A/S842G,  
 L24R/Q39H/Q49G/A89R/A97G/S842G/S932A, L24R/Q39H/A89R/A97D/S842G/S932A,  
 L24R/Q39H/S842G/S932A, L24R/A89R/D500A, L24R/S842G/S932A, L24W,  
 L24W/F27A/Q50V/Q107G/K267R/A774S/C944S, L24W/F27A/Q107G/K267R/D612S/C944S,  
 L24W/F27A/K267R/C944R, L24W/F27A/C944R, L24W/Q50V/D489A/C944S,  
 L24W/Q50V/D612S, L24W/V70A/Q107G/L109D/D489A/D612S/K725E,  
 L24W/V70A/K267R/A774S, L24W/Q107G/L109D/K267R/D489A/D612S/K725E/A774S,  
 L24W/L109D/D612S, L24W/L109D/C944S, L24W/K267R/K725E/C944S,  
 L24W/D489A/C944R, L24W/K725E, L24W/C944S, F27G/Q39H/Q49G/A97G/D500A/S842G,  
 F27G/Q49G/R68S/D500A/S842G, L34T/Q39D/D500A/S932A, Q39D/A89R/A97G/D500A,  
 E42G, H48Q, H48V, H48W, Q50V/L109D/D489A/D612S, Q50V/D489A/A774S,  
 Q50V/D612S/C944S, P57F, P57L, P57M, A62F, A62L, A62W, R68N/A89R/A97G/S932A,  
 R68S, P71G, P71L, P71V, P71W, P71Y, K88L, K88R, A89R/A97G/Q107G,  
 A89R/A97G/D500A, A89R/S842G, Q107G/L109D, Q107G/D500A/S842G, G108R,  
 L109D/D612S/A774S/C944S, A112H, P123L, P123V, S124G, S124M, S124V, T148K, T148R,

E188R, E188W, H193E, H193P, P197G, E204A, A253M, S264M, L305F, V312A, I333L, E381R, E381V, E381W, S402N, S402V/P781Q, D489A, D489A/C944R, D500A/S842G, D500A/S932A, D523E, N527R, N527V, D612S, D612S/K725E/C944S, D612S/P922E, E614Q, E614R, E614W, S727W, L742V, L748V, G820A, G820V, L823F, L823V, P832A, P832R, S842G/S932A, E858C, E858W, R862I, R862M, R862Q, R862Y, N911G, N911R, V913G, V913R, V913W, P914G, P914I, P914K, P914Q, P914R, P914S, P914T, S916G, S916H, S916R, D923L, D923V, D923W, E937K и L940Q, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 20. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену ион в положении или ряде положений, выбранных из 22/24, 22/24/27/50/107/109/489/612/725, 22/24/27/489, 22/24/27/489/612/774, 22/24/27/612/944, 22/24/50/109/267/489/774/944, 22/24/50/267/612/922/944, 22/24/107/267/489/922, 22/24/489, 22/24/612/725/944, 22/50/107/267/489/612/944, 22/50/109/267/489, 22/267/489/612, 24, 24/27/50/107/267/774/944, 24/27/89/500/842, 24/27/107/267/612/944, 24/27/267/944, 24/27/500/842, 24/27/500/842/932, 24/27/944, 24/39/49/89/97/842/932, 24/39/68/89/107/500/842, 24/39/89/97/842/932, 24/39/842/932, 24/50/489/944, 24/50/612, 24/70/107/109/489/612/725, 24/70/267/774, 24/89/500, 24/107/109/267/489/612/725/774, 24/109/612, 24/109/944, 24/267/725/944, 24/489/944, 24/725, 24/842/932, 24/944, 27/39/49/97/500/842, 27/49/68/500/842, 34/39/500/932, 50/109/489/612, 50/612/944, 68/89/97/932, 89/97/107, 89/842, 106, 107/109, 107/500/842, 108, 109/612/774/944, 112, 148, 148/772, 188/377, 238, 240, 240/374, 243, 244, 246, 248, 249/777, 252, 253, 259, 260, 261, 262, 264, 279, 305, 309, 312, 319, 320, 329, 333, 387, 402, 421, 432, 500/842, 500/932, 556, 612, 612/725/944, 612/922, 727, 736, 737, 741, 742, 748, 815, 816, 818, 823, 832, 842/932, 911, 913, 914, 916, 923, 937 и 940, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из 22R/24W, 22R/24W/27A/50V/107G/109D/489A/612S/725E, 22R/24W/27A/489A, 22R/24W/27A/489A/612S/774S, 22R/24W/27A/612S/944R, 22R/24W/50V/109D/267R/489A/774S/944R, 22R/24W/50V/267R/612S/922E/944R, 22R/24W/107G/267R/489A/922E, 22R/24W/489A, 22R/24W/612S/725E/944R, 22R/50V/107G/267R/489A/612S/944S, 22R/50V/109D/267R/489A, 22R/267R/489A/612S, 24R, 24R/27G/89R/500A/842G, 24R/27G/500A/842G, 24R/27G/500A/842G/932A, 24R/39D/68S/89R/107G/500A/842G, 24R/39H/49G/89R/97G/842G/932A, 24R/39H/89R/97D/842G/932A, 24R/39H/842G/932A, 24R/89R/500A, 24R/842G/932A, 24W, 24W/27A/50V/107G/267R/774S/944S, 24W/27A/107G/267R/612S/944S, 24W/27A/267R/944R, 24W/27A/944R, 24W/50V/489A/944S, 24W/50V/612S, 24W/70A/107G/109D/489A/612S/725E, 24W/70A/267R/774S, 24W/107G/109D/267R/489A/612S/725E/774S, 24W/109D/612S, 24W/109D/944S, 24W/267R/725E/944S, 24W/489A/944R, 24W/725E, 24W/944S, 27G/39H/49G/97G/500A/842G, 27G/49G/68S/500A/842G, 34T/39D/500A/932A,

50V/109D/489A/612S, 50V/612S/944S, 68N/89R/97G/932A, 89R/97G/107G, 89R/842G, 106A, 106G, 106N, 106T, 107G/109D, 107G/500A/842G, 108H, 108N, 108R, 108S, 108V, 109D/612S/774S/944S, 112H, 112P, 148E, 148G, 148H, 148K, 148R/772I, 188Q/377Q, 238Q, 240I, 240W/374T, 240Y, 243E, 243G, 243R, 243V, 244I, 244V, 246A, 246G, 248A, 248R, 248V, 249V/777N, 252V, 253G, 253P, 259G, 259N, 259S, 260W, 261E, 262P, 264C, 279E, 305F, 305G, 305R, 305V, 305Y, 309C, 309G, 312A, 319F, 320M, 329F, 333L, 333V, 387L, 402G, 402N, 421P, 432C, 500A/842G, 500A/932A, 556H, 556R, 556S, 556Y, 612S, 612S/725E/944S, 612S/922E, 727G, 727Q, 727T, 727W, 736M, 736V, 736W, 737M, 741C, 741D, 741E, 741G, 741T, 742V, 748I, 748T, 748V, 815A, 815M, 816V, 818T, 818V, 823A, 823F, 823G, 823R, 832E, 832G, 842G/932A, 911G, 913A, 913E, 913G, 913H, 913L, 913Q, 913R, 913W, 914E, 914G, 914H, 914K, 914Q, 914R, 914S, 914T, 916A, 916G, 916H, 916I, 916R, 916V, 923W, 937Q, 940G, 940Q, 940T и 940W, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из I22R/L24W, I22R/L24W/F27A/Q50V/Q107G/L109D/D489A/D612S/K725E, I22R/L24W/F27A/D489A, I22R/L24W/F27A/D489A/D612S/A774S, I22R/L24W/F27A/D612S/C944R, I22R/L24W/Q50V/L109D/K267R/D489A/A774S/C944R, I22R/L24W/Q50V/K267R/D612S/P922E/C944R, I22R/L24W/Q107G/K267R/D489A/P922E, I22R/L24W/D489A, I22R/L24W/D612S/K725E/C944R, I22R/Q50V/Q107G/K267R/D489A/D612S/C944S, I22R/Q50V/L109D/K267R/D489A, I22R/K267R/D489A/D612S, L24R, L24R/F27G/A89R/D500A/S842G, L24R/F27G/D500A/S842G, L24R/F27G/D500A/S842G/S932A, L24R/Q39D/R68S/A89R/Q107G/D500A/S842G, L24R/Q39H/Q49G/A89R/A97G/S842G/S932A, L24R/Q39H/A89R/A97D/S842G/S932A, L24R/Q39H/S842G/S932A, L24R/A89R/D500A, L24R/S842G/S932A, L24W, L24W/F27A/Q50V/Q107G/K267R/A774S/C944S, L24W/F27A/Q107G/K267R/D612S/C944S, L24W/F27A/K267R/C944R, L24W/F27A/C944R, L24W/Q50V/D489A/C944S, L24W/Q50V/D612S, L24W/V70A/Q107G/L109D/D489A/D612S/K725E, L24W/V70A/K267R/A774S, L24W/Q107G/L109D/K267R/D489A/D612S/K725E/A774S, L24W/L109D/D612S, L24W/L109D/C944S, L24W/K267R/K725E/C944S, L24W/D489A/C944R, L24W/K725E, L24W/C944S, F27G/Q39H/Q49G/A97G/D500A/S842G, F27G/Q49G/R68S/D500A/S842G, L34T/Q39D/D500A/S932A, Q50V/L109D/D489A/D612S, Q50V/D612S/C944S, R68N/A89R/A97G/S932A, A89R/A97G/Q107G, A89R/S842G, K106A, K106G, K106N, K106T, Q107G/L109D, Q107G/D500A/S842G, G108H, G108N, G108R, G108S, G108V, L109D/D612S/A774S/C944S, A112H, A112P, T148E, T148G, T148H, T148K, T148R/V772I, E188Q/R377Q, L238Q, L240I, L240W/A374T, L240Y, S243E, S243G, S243R, S243V, L244I, L244V, S246A, S246G, Y248A, Y248R, Y248V, I249V/S777N, L252V, A253G, A253P, L259G, L259N, L259S, M260W, L261E, S262P, S264C, P279E, L305F, L305G, L305R, L305V, L305Y, A309C, A309G, V312A, A319F, L320M, L329F, I333L, I333V, H387L, S402G, S402N, Q421P, M432C, D500A/S842G, D500A/S932A, F556H,

F556R, F556S, F556Y, D612S, D612S/K725E/C944S, D612S/P922E, S727G, S727Q, S727T, S727W, L736M, L736V, L736W, L737M, A741C, A741D, A741E, A741G, A741T, L742V, L748I, L748T, L748V, I815A, I815M, I816V, L818T, L818V, L823A, L823F, L823G, L823R, P832E, P832G, S842G/S932A, N911G, V913A, V913E, V913G, V913H, V913L, V913Q, V913R, V913W, P914E, P914G, P914H, P914K, P914Q, P914R, P914S, P914T, S916A, S916G, S916H, S916I, S916R, S916V, D923W, E937Q, L940G, L940Q, L940T и L940W, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 20.

Настоящее изобретение дополнительно предлагает рекомбинантные кислые альфа-глюкозидазы и/или биологически активные фрагменты рекомбинантных кислых альфа-глюкозидаз, содержащие аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 93%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 946, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 946. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из 19/124/149/381/727, 24/39/489/862, 24/57/62/89/489/823/862, 24/57/823/862, 24/62/89/188/823/842/862, 24/89/489, 24/89/489/727/862, 24/489/500/842, 39/57/62/188/500/842, 39/57/500/862, 57, 57/62/120/527/913/916, 57/62/305/437/500/614/727/916, 57/62/305/437/500/727/913/916, 57/62/305/437/614/683/913/916/932, 57/62/305/489/907/913/916, 57/62/305/489/913/916, 57/62/305/500/913/916, 57/62/305/913, 57/62/305/916, 57/62/437/500/761/914/916, 57/62/437/527/727, 57/62/437/913/916, 57/62/913/916/932, 57/62/916, 57/188/489/823/862, 57/305, 57/305/437/916, 57/437/500/527/727/916, 57/437/500/614/727/914, 57/437/913/914, 57/489/527/914/916, 57/614/916/932, 62/89, 62/89/124/148/381/858, 62/89/124/381/858, 62/89/148/381/614/858, 62/89/148/923, 62/89/149/381, 62/89/149/381/832, 62/89/188/489/500/727/823, 62/89/381, 62/89/381/858, 62/89/381/923, 62/89/858, 62/96/614, 62/124/148/149/381/614, 62/124/149/381/832/858/937, 62/124/188/823/842/862, 62/124/381/832, 62/148/149/381/858/937, 62/148/381/614/937, 62/148/381/727, 62/148/381/858, 62/149/381/614/937, 62/149/381/858/937, 62/149/727, 62/305/437/500/727/913, 62/305/727, 62/381, 62/437/489/527/727/913/932, 62/437/489/614/727/913, 62/437/527/727, 62/437/527/916/932, 62/437/913/916, 62/489/500/932, 62/489/527/916/932, 62/489/614/916, 62/500, 62/527, 62/527/727/916, 62/614, 62/727, 62/916, 89/148/149, 89/148/149/381, 89/381, 124/148/381/727/858/937, 124/381/614, 124/500/842/862, 124/832/937, 148/832/858/937, 381, 381/614/832, 381/858/937, 437, 437/489/914/916, 437/727/914, 437/914/916, 489/500, 489/614/916, 500/727/913/916, 500/914/916 и 923, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 946. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из



19T/124V/149R/381V/727W, 24R/39H/489A/862Q, 24R/57L/62W/89R/489A/823F/862Q,  
 24R/57L/823F/862Q, 24R/62W/89R/188W/823V/842G/862Q, 24R/89R/489A,  
 24R/89R/489A/727W/862Q, 24R/489A/500A/842G, 39H/57L/62W/188W/500A/842G,  
 39H/57L/500A/862Q, 57F/62L/305F/437G/500A/614Q/727W/916R,  
 57F/62L/305F/437G/614Q/683S/913R/916R/932A, 57F/62L/305F/500A/913R/916G,  
 57F/62L/305F/913R, 57F/62L/437G/500A/761F/914K/916R, 57F/62L/437G/527R/727W,  
 57F/62L/913R/916R/932A, 57F/62L/916G, 57F/62W/120I/527R/913R/916R,  
 57F/62W/305F/437G/500A/727W/913R/916R, 57F/62W/305F/489A/907K/913R/916G,  
 57F/62W/305F/489A/913R/916G, 57F/62W/305F/916R, 57F/62W/437G/913R/916G, 57F/305F,  
 57F/305F/437G/916G, 57F/437G/500A/527R/727W/916R, 57F/437G/500A/614Q/727W/914R,  
 57F/437G/913R/914R, 57F/489A/527R/914R/916G, 57F/614Q/916G/932A, 57L,  
 57L/188W/489A/823F/862Q, 62F/89R, 62F/89R/124V/148R/381W/858W,  
 62F/89R/148R/381V/614R/858W, 62F/89R/148R/923W, 62F/89R/149R/381W/832R,  
 62F/89R/381V/923W, 62F/89R/858C, 62F/96K/614R, 62F/124V/381W/832R,  
 62F/149R/381V/858W/937K, 62F/149R/727W, 62F/381V, 62F/614R,  
 62L/305F/437G/500A/727W/913R, 62L/305F/727W, 62L/437G/489A/527R/727W/913R/932A,  
 62L/437G/527R/727W, 62L/437G/527R/916G/932A, 62L/437G/913R/916R,  
 62L/489A/500A/932A, 62L/489A/614Q/916R, 62L/527R, 62L/527R/727W/916G,  
 62W/89R/124V/381W/858C, 62W/89R/149R/381W, 62W/89R/188W/489A/500A/727W/823F,  
 62W/89R/381V, 62W/89R/381W/858C, 62W/124V/148R/149R/381W/614R,  
 62W/124V/149R/381V/832R/858C/937K, 62W/124V/188W/823F/842G/862Q,  
 62W/148R/149R/381V/858C/937K, 62W/148R/381W/614R/937K, 62W/148R/381W/727W,  
 62W/148R/381W/858C, 62W/149R/381W/614R/937K, 62W/381V,  
 62W/437G/489A/614Q/727W/913R, 62W/489A/527R/916R/932A, 62W/500A, 62W/727W,  
 62W/916G, 89R/148R/149R, 89R/148R/149R/381W, 89R/381W,  
 124V/148R/381W/727W/858W/937K, 124V/381W/614R, 124V/500A/842G/862Q,  
 124V/832R/937K, 148R/832R/858W/937K, 381V, 381V/614R/832R, 381W/858C/937K, 437G,  
 437G/489A/914R/916R, 437G/727W/914K, 437G/914R/916G, 489A/500A, 489A/614Q/916G,  
 500A/727W/913R/916R, 500A/914R/916G и 923W, где положения пронумерованы со  
 ссылкой на SEQ ID NO: 946. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-  
 глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений,  
 выбранных из S19T/S124V/P149R/E381V/S727W, W24R/Q39H/D489A/R862Q,  
 W24R/P57L/A62W/A89R/D489A/L823F/R862Q, W24R/P57L/L823F/R862Q,  
 W24R/A62W/A89R/E188W/L823V/S842G/R862Q, W24R/A89R/D489A,  
 W24R/A89R/D489A/S727W/R862Q, W24R/D489A/D500A/S842G,  
 Q39H/P57L/A62W/E188W/D500A/S842G, Q39H/P57L/D500A/R862Q,  
 P57F/A62L/L305F/A437G/D500A/E614Q/S727W/S916R,  
 P57F/A62L/L305F/A437G/E614Q/A683S/V913R/S916R/S932A,  
 P57F/A62L/L305F/D500A/V913R/S916G, P57F/A62L/L305F/V913R,  
 P57F/A62L/A437G/D500A/L761F/P914K/S916R, P57F/A62L/A437G/N527R/S727W,

P57F/A62L/V913R/S916R/S932A, P57F/A62L/S916G,  
 P57F/A62W/F120I/N527R/V913R/S916R,  
 P57F/A62W/L305F/A437G/D500A/S727W/V913R/S916R,  
 P57F/A62W/L305F/D489A/Q907K/V913R/S916G, P57F/A62W/L305F/D489A/V913R/S916G,  
 P57F/A62W/L305F/S916R, P57F/A62W/A437G/V913R/S916G, P57F/L305F,  
 P57F/L305F/A437G/S916G, P57F/A437G/D500A/N527R/S727W/S916R,  
 P57F/A437G/D500A/E614Q/S727W/P914R, P57F/A437G/V913R/P914R,  
 P57F/D489A/N527R/P914R/S916G, P57F/E614Q/S916G/S932A, P57L,  
 P57L/E188W/D489A/L823F/R862Q, A62F/A89R, A62F/A89R/S124V/T148R/E381W/E858W,  
 A62F/A89R/T148R/E381V/E614R/E858W, A62F/A89R/T148R/D923W,  
 A62F/A89R/P149R/E381W/P832R, A62F/A89R/E381V/D923W, A62F/A89R/E858C,  
 A62F/E96K/E614R, A62F/S124V/E381W/P832R, A62F/P149R/E381V/E858W/E937K,  
 A62F/P149R/S727W, A62F/E381V, A62F/E614R,  
 A62L/L305F/A437G/D500A/S727W/V913R, A62L/L305F/S727W,  
 A62L/A437G/D489A/N527R/S727W/V913R/S932A, A62L/A437G/N527R/S727W,  
 A62L/A437G/N527R/S916G/S932A, A62L/A437G/V913R/S916R,  
 A62L/D489A/D500A/S932A, A62L/D489A/E614Q/S916R, A62L/N527R,  
 A62L/N527R/S727W/S916G, A62W/A89R/S124V/E381W/E858C,  
 A62W/A89R/P149R/E381W, A62W/A89R/E188W/D489A/D500A/S727W/L823F,  
 A62W/A89R/E381V, A62W/A89R/E381W/E858C,  
 A62W/S124V/T148R/P149R/E381W/E614R,  
 A62W/S124V/P149R/E381V/P832R/E858C/E937K,  
 A62W/S124V/E188W/L823F/S842G/R862Q, A62W/T148R/P149R/E381V/E858C/E937K,  
 A62W/T148R/E381W/E614R/E937K, A62W/T148R/E381W/S727W,  
 A62W/T148R/E381W/E858C, A62W/P149R/E381W/E614R/E937K, A62W/E381V,  
 A62W/A437G/D489A/E614Q/S727W/V913R, A62W/D489A/N527R/S916R/S932A,  
 A62W/D500A, A62W/S727W, A62W/S916G, A89R/T148R/P149R,  
 A89R/T148R/P149R/E381W, A89R/E381W, S124V/T148R/E381W/S727W/E858W/E937K,  
 S124V/E381W/E614R, S124V/D500A/S842G/R862Q, S124V/P832R/E937K,  
 T148R/P832R/E858W/E937K, E381V, E381V/E614R/P832R, E381W/E858C/E937K, A437G,  
 A437G/D489A/P914R/S916R, A437G/S727W/P914R, A437G/P914R/S916G, D489A/D500A,  
 D489A/E614Q/S916G, D500A/S727W/V913R/S916R, D500A/P914R/S916G и D923W, где  
 положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 946. В некоторых вариантах  
 осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в  
 положении или ряде положений, выбранных из 57/62/120/527/913/916,  
 57/62/305/437/500/614/727/916, 57/62/305/437/500/727/913/916,  
 57/62/305/437/614/683/913/916/932, 57/62/305/489/907/913/916, 57/62/305/489/913/916,  
 57/62/305/500/913/916, 57/62/305/913, 57/62/305/916, 57/62/437/500/761/914/916,  
 57/62/437/527/727, 57/62/437/913/916, 57/62/913/916/932, 57/62/916, 57/188/489/823/862,  
 57/305, 57/305/437/916, 57/437/500/527/727/916, 57/437/500/614/727/914, 57/437/913/914,

57/489/527/914/916, 57/614/916/932, 62/89/188/489/500/727/823, 62/124/188/823/842/862, 62/305/437/500/727/913, 62/305/727, 62/437/489/527/727/913/932, 62/437/489/614/727/913, 62/437/527/727, 62/437/527/916/932, 62/437/913/916, 62/489/500/932, 62/489/527/916/932, 62/527/727/916, 62/727, 62/916, 124/500/842/862, 437, 437/489/914/916, 437/727/914, 437/914/916, 489/614/916, 500/727/913/916, 500/914/916 и 923, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 946. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из 57F/62L/305F/437G/500A/614Q/727W/916R, 57F/62L/305F/437G/614Q/683S/913R/916R/932A, 57F/62L/305F/500A/913R/916G, 57F/62L/305F/913R, 57F/62L/437G/500A/761F/914K/916R, 57F/62L/437G/527R/727W, 57F/62L/913R/916R/932A, 57F/62L/916G, 57F/62W/120I/527R/913R/916R, 57F/62W/305F/437G/500A/727W/913R/916R, 57F/62W/305F/489A/907K/913R/916G, 57F/62W/305F/489A/913R/916G, 57F/62W/305F/916R, 57F/62W/437G/913R/916G, 57F/305F, 57F/305F/437G/916G, 57F/437G/500A/527R/727W/916R, 57F/437G/500A/614Q/727W/914R, 57F/437G/913R/914R, 57F/489A/527R/914R/916G, 57F/614Q/916G/932A, 57L/188W/489A/823F/862Q, 62L/305F/437G/500A/727W/913R, 62L/305F/727W, 62L/437G/489A/527R/727W/913R/932A, 62L/437G/527R/727W, 62L/437G/527R/916G/932A, 62L/437G/913R/916R, 62L/489A/500A/932A, 62L/527R/727W/916G, 62W/89R/188W/489A/500A/727W/823F, 62W/124V/188W/823F/842G/862Q, 62W/437G/489A/614Q/727W/913R, 62W/489A/527R/916R/932A, 62W/727W, 62W/916G, 124V/500A/842G/862Q, 437G, 437G/489A/914R/916R, 437G/727W/914K, 437G/914R/916G, 489A/614Q/916G, 500A/727W/913R/916R, 500A/914R/916G и 923W, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 946. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из P57F/A62L/L305F/A437G/D500A/E614Q/S727W/S916R, P57F/A62L/L305F/A437G/E614Q/A683S/V913R/S916R/S932A, P57F/A62L/L305F/D500A/V913R/S916G, P57F/A62L/L305F/V913R, P57F/A62L/A437G/D500A/L761F/P914K/S916R, P57F/A62L/A437G/N527R/S727W, P57F/A62L/V913R/S916R/S932A, P57F/A62L/S916G, P57F/A62W/F120I/N527R/V913R/S916R, P57F/A62W/L305F/A437G/D500A/S727W/V913R/S916R, P57F/A62W/L305F/D489A/Q907K/V913R/S916G, P57F/A62W/L305F/D489A/V913R/S916G, P57F/A62W/L305F/S916R, P57F/A62W/A437G/V913R/S916G, P57F/L305F, P57F/L305F/A437G/S916G, P57F/A437G/D500A/N527R/S727W/S916R, P57F/A437G/D500A/E614Q/S727W/P914R, P57F/A437G/V913R/P914R, P57F/D489A/N527R/P914R/S916G, P57F/E614Q/S916G/S932A, P57L/E188W/D489A/L823F/R862Q, A62L/L305F/A437G/D500A/S727W/V913R, A62L/L305F/S727W, A62L/A437G/D489A/N527R/S727W/V913R/S932A, A62L/A437G/N527R/S727W, A62L/A437G/N527R/S916G/S932A, A62L/A437G/V913R/S916R, A62L/D489A/D500A/S932A, A62L/N527R/S727W/S916G,

A62W/A89R/E188W/D489A/D500A/S727W/L823F,  
 A62W/S124V/E188W/L823F/S842G/R862Q, A62W/A437G/D489A/E614Q/S727W/V913R,  
 A62W/D489A/N527R/S916R/S932A, A62W/S727W, A62W/S916G,  
 S124V/D500A/S842G/R862Q, A437G, A437G/D489A/P914R/S916R, A437G/S727W/P914K,  
 A437G/P914R/S916G, D489A/E614Q/S916G, D500A/S727W/V913R/S916R,  
 D500A/P914R/S916G и D923W, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO:  
 946.

Настоящее изобретение предлагает рекомбинантные кислые альфа-глюкозидазы и/или биологически активные фрагменты рекомбинантных кислых альфа-глюкозидаз, содержащие аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 93%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1956, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 1956. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из 3/569, 41/53, 44, 44/347, 56, 65, 78, 78/87/176/266/536/615, 78/87/266, 78/87/266/372/386/777, 78/87/266/372/536, 78/87/266/483/924, 78/87/483/777, 78/87/536, 78/266/483/536/615, 78/266/483/795, 78/266/763, 78/372/390, 78/390, 78/536/615, 87, 87/266, 87/266/372/483, 87/266/483, 87/266/924, 87/372/777, 87/536/777, 87/615, 87/795, 105, 136, 141, 145, 154/588, 156, 157, 199, 202, 222, 225, 227, 229, 266, 266/372/536/615/763/777, 266/372/924, 266/536/615/795, 344, 348, 390/615, 412, 423, 425/678/894, 430, 446, 484, 488, 496, 499/711, 503, 530, 543, 569, 572, 573, 574, 577, 578, 579, 580, 581, 583, 585, 588, 589/663, 615, 628, 629, 631, 633, 656, 663, 669, 670, 671, 678, 679, 687, 690, 691, 692, 693, 705, 706, 708, 709, 710, 711, 726, 768, 773, 777, 779, 795, 797, 816, 826, 834, 857, 859, 868, 869, 871, 873, 877, 878 и 909, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 1956. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из 3L/569F, 41I/53M, 44E, 44G, 44L, 44P/347I, 44R, 56A, 56L, 56R, 65L, 65V, 78E, 78E/87E/176T/266N/536T/615D, 78E/87E/266N, 78E/87E/266N/372T/386Y/777G, 78E/87E/266N/372T/536T, 78E/87E/266N/483S/924N, 78E/87E/483S/777G, 78E/87E/536T, 78E/266N/483S/536T/615D, 78E/266N/483S/795E, 78E/266N/763L, 78E/372T/390Q, 78E/390Q, 78E/536T/615D, 87E, 87E/266N, 87E/266N/372T/483S, 87E/266N/483S, 87E/266N/924N, 87E/372T/777G, 87E/536T/777G, 87E/615D, 87E/795E, 105T, 136G, 141S, 141W, 145I, 145R, 154R/588L, 156L, 157S, 199V, 202K, 202L, 202N, 202R, 202T, 222C, 222P, 225D, 227A, 229C, 266N, 266N/372T/536T/615D/763L/777G, 266N/372T/924N, 266N/536T/615D/795E, 344G, 344M, 348G, 390Q/615D, 412Y, 423V, 425R/678I/894C, 430F, 446T, 484L, 488G, 488K, 488M, 496G, 499Y/711F, 503S, 503T, 530V, 543C, 543Q, 543S, 543V, 569H, 569I, 569Q, 569S, 569T, 569V, 569Y, 572G, 572S, 573C, 573D, 573H, 573M, 573Q, 574S, 577A, 577D, 577E,

577M, 577T, 577V, 578S, 579V, 580E, 580G, 580I, 580L, 580W, 580Y, 581F, 581G, 581H, 581L, 581S, 581T, 581V, 581Y, 583C, 583G, 583K, 583L, 585F, 585L, 585M, 585Q, 585V, 588L, 588V, 589I/663F, 615G, 628I, 628M, 628V, 629A, 629C, 629G, 629I, 631I, 631L, 631M, 633V, 656M, 656V, 663A, 663F, 669R, 670E, 670F, 670I, 670Q, 670R, 670S, 670T, 670V, 670W, 671A, 671G, 671M, 671T, 678H, 678L, 678T, 678Y, 679W, 687L, 690V, 691F, 691V, 692C, 692F, 692G, 692I, 692L, 692R, 692S, 692V, 692Y, 693F, 693I, 693Y, 705M, 706F, 706M, 706V, 708C, 709S, 710K, 710L, 710M, 710N, 710S, 711C, 711F, 711G, 711H, 711L, 711R, 711W, 726E, 768S, 773V, 777G, 777I, 777R, 779E, 779H, 779R, 795E, 797L, 797M, 816L, 826G, 834H, 857T, 859T, 859Y, 868I, 868L, 869L, 869S, 871E, 871K, 871R, 873A, 873F, 873Y, 877L, 877V, 878A, 878F, 878G, 878K, 878L, 878Q, 878R, 878S, 878W и 909F, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 1956. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из W3L/L569F, L41I/S53M, T44E, T44G, T44L, T44P/L347I, T44R, G56A, G56L, G56R, G65L, G65V, P78E, P78E/D87E/K176T/T266N/V536T/Q615D, P78E/D87E/T266N, P78E/D87E/T266N/S372T/A386Y/S777G, P78E/D87E/T266N/S372T/V536T, P78E/D87E/T266N/T483S/T924N, P78E/D87E/T483S/S777G, P78E/D87E/V536T, P78E/T266N/T483S/V536T/Q615D, P78E/T266N/T483S/Q795E, P78E/T266N/T763L, P78E/S372T/L390Q, P78E/L390Q, P78E/V536T/Q615D, D87E, D87E/T266N, D87E/T266N/S372T/T483S, D87E/T266N/T483S, D87E/T266N/T924N, D87E/S372T/S777G, D87E/V536T/S777G, D87E/Q615D, D87E/Q795E, A105T, S136G, T141S, T141W, T145I, T145R, K154R/F588L, I156L, L157S, P199V, S202K, S202L, S202N, S202R, S202T, V222C, V222P, N225D, T227A, A229C, T266N, T266N/S372T/V536T/Q615D/T763L/S777G, T266N/S372T/T924N, T266N/V536T/Q615D/Q795E, Q344G, Q344M, D348G, L390Q/Q615D, G412Y, L423V, Q425R/S678I/G894C, Y430F, S446T, N484L, L488G, L488K, L488M, A496G, H499Y/A711F, P503S, P503T, L530V, T543C, T543Q, T543S, T543V, L569H, L569I, L569Q, L569S, L569T, L569V, L569Y, A572G, A572S, I573C, I573D, I573H, I573M, I573Q, A574S, R577A, R577D, R577E, R577M, R577T, R577V, A578S, L579V, V580E, V580G, V580I, V580L, V580W, V580Y, K581F, K581G, K581H, K581L, K581S, K581T, K581V, K581Y, R583C, R583G, R583K, R583L, T585F, T585L, T585M, T585Q, T585V, F588L, F588V, V589I/M663F, Q615G, L628I, L628M, L628V, L629A, L629C, L629G, L629I, V631I, V631L, V631M, L633V, L656M, L656V, M663A, M663F, L669R, L670E, L670F, L670I, L670Q, L670R, L670S, L670T, L670V, L670W, S671A, S671G, S671M, S671T, S678H, S678L, S678T, S678Y, F679W, M687L, A690V, L691F, L691V, T692C, T692F, T692G, T692I, T692L, T692R, T692S, T692V, T692Y, L693F, L693I, L693Y, F705M, H706F, H706M, H706V, A708C, H709S, V710K, V710L, V710M, V710N, V710S, A711C, A711F, A711G, A711H, A711L, A711R, A711W, D726E, Q768S, E773V, S777G, S777I, S777R, P779E, P779H, P779R, Q795E, V797L, V797M, I816L, T826G, A834H, L857T, V859T, V859Y, V868I, V868L, I869L, I869S, L871E, L871K, L871R, R873A, R873F, R873Y, I877L, I877V, V878A, V878F, V878G, V878K, V878L, V878Q, V878R, V878S, V878W и L909F, где

положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 1956. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении, выбранном из 44, 53, 56, 63, 65, 105, 125, 129, 136, 139, 141, 142, 145, 152, 156, 162, 176, 177, 185, 186, 187, 199, 199/775, 202, 265, 267, 337, 344, 348, 350, 354, 372, 373, 401, 412, 446, 469, 484, 488, 493, 496, 499, 503, 526, 543, 612, 615, 649, 677, 678, 679, 730, 752, 765, 768, 773, 777, 779, 788, 797, 822, 826, 834, 855, 856, 857, 859, 860, 924, 926, 931 и 936, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 1956. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении, выбранном из 44A, 44F, 44V, 44W, 44Y, 53I, 56S, 56W, 63N, 65A, 65F, 65R, 65Y, 105V, 105W, 125H, 125W, 129E, 129I, 129S, 129T, 129V, 129W, 136K, 136R, 136V, 139E, 141K, 141R, 142G, 145A, 145L, 152L, 152S, 152W, 156C, 156K, 156R, 156S, 162T, 176R, 177Q, 185L, 186H, 187I, 199A, 199G, 199I, 199R, 199T, 199V/775I, 199W, 202A, 202D, 202G, 202H, 202Q, 202Y, 265D, 265F, 265H, 267E, 267G, 267R, 337H, 344C, 348E, 348W, 350F, 350I, 354L, 354S, 372D, 373A, 373S, 401G, 401S, 412R, 412S, 412W, 446C, 446D, 446G, 446I, 446K, 469M, 469T, 469V, 484A, 484K, 484R, 488C, 488E, 488S, 493L, 496M, 496W, 499A, 499E, 499I, 499M, 499Q, 499V, 503C, 503H, 503N, 526L, 526V, 543G, 543H, 543K, 543L, 543R, 612G, 612L, 612R, 612T, 615M, 615S, 649M, 677T, 678Q, 678R, 678V, 678W, 679Y, 730K, 730L, 730R, 752F, 752G, 752L, 752N, 752S, 752W, 765W, 768I, 768K, 768V, 773P, 777M, 777W, 779I, 779M, 779S, 788A, 788H, 788I, 788L, 788N, 788Q, 788S, 788T, 788Y, 797E, 797F, 797I, 797R, 797W, 822R, 826I, 826M, 834G, 834S, 834V, 834W, 855G, 855L, 856A, 856G, 857A, 857E, 857R, 857S, 857V, 859A, 859G, 860S, 924A, 926M, 926T, 931L, 936N, 936R и 936S, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 1956. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении, выбранном из T44A, T44F, T44V, T44W, T44Y, S53I, G56S, G56W, H63N, G65A, G65F, G65R, G65Y, A105V, A105W, Y125H, Y125W, K129E, K129I, K129S, K129T, K129V, K129W, S136K, S136R, S136V, G139E, T141K, T141R, A142G, T145A, T145L, F152L, F152S, F152W, I156C, I156K, I156R, I156S, D162T, K176R, D177Q, V185L, P186H, L187I, P199A, P199G, P199I, P199R, P199T, P199V/L775I, P199W, S202A, S202D, S202G, S202H, S202Q, S202Y, W265D, W265F, W265H, K267E, K267G, K267R, P337H, Q344C, D348E, D348W, V350F, V350I, F354L, F354S, S372D, T373A, T373S, D401G, D401S, G412R, G412S, G412W, S446C, S446D, S446G, S446I, S446K, I469M, I469T, I469V, N484A, N484K, N484R, L488C, L488E, L488S, D493L, A496M, A496W, H499A, H499E, H499I, H499M, H499Q, H499V, P503C, P503H, P503N, P526L, P526V, T543G, T543H, T543K, T543L, T543R, S612G, S612L, S612R, S612T, Q615M, Q615S, L649M, Y677T, S678Q, S678R, S678V, S678W, F679Y, W730K, W730L, W730R, K752F, K752G, K752L, K752N, K752S, K752W, Y765W, Q768I, Q768K, Q768V, E773P, S777M, S777W, P779I, P779M, P779S, P788A, P788H, P788I, P788L, P788N, P788Q, P788S, P788T, P788Y, V797E, V797F, V797I, V797R, V797W, G822R, T826I, T826M, A834G, A834S, A834V, A834W, E855G, E855L, S856A, S856G, L857A, L857E, L857R, L857S, L857V, V859A, V859G, L860S, T924A, V926M, V926T, V931L, G936N, G936R и

G936S, где положения перенумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 1956. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из 78/87/176/266/536/615, 78/87/266/372/386/777, 78/87/266/372/536, 78/266/763, 78/372/390, 87/266/372/483, 87/372/777, 105, 125, 129, 136, 139, 141, 142, 152, 154/588, 156, 222, 225, 227, 229, 266/372/536/615/763/777, 266/372/924, 267, 372, 401, 493, 496, 499, 569, 572, 573, 574, 577, 579, 580, 581, 583, 585, 588, 589/663, 628, 629, 631, 663, 669, 670, 671, 691, 692, 693, 706, 708, 710, 711, 765, 768, 779, 797, 826, 834, 855, 856, 857, 869, 871, 873, 878, 909, 924 и 926, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 1956. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из 78E/87E/176T/266N/536T/615D, 78E/87E/266N/372T/386Y/777G, 78E/87E/266N/372T/536T, 78E/266N/763L, 78E/372T/390Q, 87E/266N/372T/483S, 87E/372T/777G, 105T, 105W, 125W, 129E, 129S, 136G, 136K, 136V, 139E, 141S, 142G, 152S, 152W, 154R/588L, 156C, 156L, 222C, 222P, 225D, 227A, 229C, 266N/372T/536T/615D/763L/777G, 266N/372T/924N, 267E, 372D, 401G, 493L, 496G, 499E, 499I, 499M, 499Q, 569H, 569Q, 569S, 569T, 569V, 569Y, 572G, 572S, 573C, 573D, 573H, 573M, 573Q, 574S, 577A, 577D, 577E, 577T, 579V, 580E, 580G, 580W, 581G, 581H, 581T, 583C, 583G, 585Q, 588L, 588V, 589I/663F, 628V, 629A, 629C, 629G, 629I, 631I, 631L, 631M, 663A, 663F, 669R, 670E, 670F, 670I, 670Q, 670R, 670S, 670T, 670V, 670W, 671A, 671G, 671T, 691V, 692C, 692F, 692G, 692I, 692L, 692Y, 693F, 693I, 693Y, 706F, 708C, 710K, 710L, 710M, 710N, 710S, 711C, 711G, 711H, 711W, 765W, 768I, 779E, 797E, 797F, 797I, 797L, 797M, 797W, 826G, 834G, 834H, 834S, 834W, 855G, 856G, 857A, 857E, 857S, 857T, 857V, 869L, 869S, 871E, 871K, 873A, 873F, 873Y, 878A, 878G, 878K, 878Q, 878S, 878W, 909F, 924A, 926M и 926T, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 1956. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из P78E/D87E/K176T/T266N/V536T/Q615D, P78E/D87E/T266N/S372T/A386Y/S777G, P78E/D87E/T266N/S372T/V536T, P78E/T266N/T763L, P78E/S372T/L390Q, D87E/T266N/S372T/T483S, D87E/S372T/S777G, A105T, A105W, Y125W, K129E, K129S, S136G, S136K, S136V, G139E, T141S, A142G, F152S, F152W, K154R/F588L, I156C, I156L, V222C, V222P, N225D, T227A, A229C, T266N/S372T/V536T/Q615D/T763L/S777G, T266N/S372T/T924N, K267E, S372D, D401G, D493L, A496G, H499E, H499I, H499M, H499Q, L569H, L569Q, L569S, L569T, L569V, L569Y, A572G, A572S, I573C, I573D, I573H, I573M, I573Q, A574S, R577A, R577D, R577E, R577T, L579V, V580E, V580G, V580W, K581G, K581H, K581T, R583C, R583G, T585Q, F588L, F588V, V589I/M663F, L628V, L629A, L629C, L629G, L629I, V631I, V631L, V631M, M663A, M663F, L669R, L670E, L670F, L670I, L670Q, L670R, L670S, L670T, L670V, L670W, S671A, S671G, S671T, L691V, T692C, T692F, T692G, T692I, T692L, T692Y, L693F, L693I, L693Y, H706F, A708C, V710K, V710L, V710M, V710N, V710S, A711C, A711G, A711H, A711W, Y765W, Q768I, P779E, V797E, V797F, V797I, V797L, V797M, V797W, T826G, A834G, A834H, A834S, A834W,

E855G, S856G, L857A, L857E, L857S, L857T, L857V, I869L, I869S, L871E, L871K, R873A, R873F, R873Y, V878A, V878G, V878K, V878Q, V878S, V878W, L909F, T924A, V926M и V926T, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 1956.

Настоящее изобретение предлагает рекомбинантные кислые альфа-глюкозидазы и/или биологически активные фрагменты рекомбинантных кислых альфа-глюкозидаз, содержащие аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 93%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2496, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2496. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из 246, 304, 313, 569, 569/588, 569/588/589/628/629/692/711, 569/588/678/692, 569/588/711/869/871/878, 569/588/878, 569/589/628/670/678/692/711/795/871, 569/589/628/670/692/711, 569/589/628/692/711/795, 569/589/670, 569/589/670/678/692/711/795, 569/589/670/871, 569/589/678/871/878, 569/589/692/795/871/878, 569/589/711/871, 569/589/871, 569/628, 569/628/670, 569/628/670/678, 569/628/670/692/711/871, 569/628/670/711, 569/628/678/711, 569/628/692, 569/670, 569/670/678, 569/670/678/692/871, 569/670/692, 569/670/711, 569/670/711/871, 569/678/692/795, 569/678/869/878, 569/678/878, 569/692, 569/692/711, 569/692/711/869/871/878, 569/711, 569/711/795/871/878, 569/711/869/878, 569/711/871, 569/795, 569/871, 572/588/678/692/869/878, 572/588/795, 572/692/869/878, 572/692/878, 582, 584, 585, 588/589/628/678, 589, 589/670/692/795/871, 589/670/795/871, 589/871, 628/629/692/871/878, 628/670, 628/670/692/711/795, 628/711/795, 628/871, 628/878, 629/869/878, 670/678, 670/678/692/871, 670/692/871, 678/692/711/869, 678/692/795/869, 678/692/869, 678/795/871/878, 692, 692/711, 692/711/795/869, 692/711/795/869/871/878, 692/711/869/878, 692/711/871/878, 692/869, 692/869/871/878/916, 692/871, 711, 711/795/869/878, 711/869/878, 711/871, 795/878, 812, 871 и 878, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2496. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из 246Т, 304М, 313I, 313L, 569Н/589I/628М/670Т/678Т/692G/711Н/795E/871S, 569Н/628М, 569Н/628М/670F/678Т, 569Н/628М/670Т, 569Н/628М/670Т/692Y/711Н/871K, 569Н/670F/678Т/692G/871S, 569Н/670Т/692G, 569Н/678Т/692G/795E, 569Н/692G, 569Н/692Y, 569Н/711Н/795E/871S/878S, 569Н/711Н/869S/878S, 569Н/711Н/871K, 569Т, 569Т/588L, 569Т/588L/589I/628М/629I/692Y/711Н, 569Т/588L/678Т/692Y, 569Т/588L/711Н/869L/871K/878S, 569Т/588L/878S, 569Т/589I/628М/670F/692G/711Н, 569Т/589I/678Т/871K/878S, 569Т/589I/692G/795E/871K/878S, 569Т/589I/871S, 569Т/628М/678Т/711Н, 569Т/628М/692Y, 569Т/670Т/678Т/692G/871K, 569Т/670Т/711Н/871E, 569Т/678Т/869S/878S, 569Т/678Т/878S, 569Т/692Y,



569T/692Y/711H/869L/871K/878A, 569T/711H, 569T/795E, 569T/871K, 569T/871S, 569Y/589I/628M/670T/692Y/711H, 569Y/589I/628M/692G/711H/795E, 569Y/589I/670F, 569Y/589I/670T/678T/692G/711H/795E, 569Y/589I/670T/871K, 569Y/589I/711H/871K, 569Y/628M/670T/692Y/711H/871S, 569Y/628M/670T/711H, 569Y/670F/678T, 569Y/670T, 569Y/670T/711H, 569Y/692Y/711H, 569Y/711H, 569Y/871E, 572S/588L/678T/692G/869L/878A, 572S/588L/795E, 572S/692G/869S/878S, 572S/692G/878S, 572S/692L/869S/878S, 582T, 584E, 585K, 588L/589I/628M/678T, 589I, 589I/670T/692G/795E/871K, 589I/670T/795E/871S, 589I/871E, 628M/629I/692Y/871S/878S, 628M/670F, 628M/670T/692G/711H/795E, 628M/711H/795E, 628M/871S, 628M/878S, 629I/869L/878S, 670T/678T, 670T/678T/692Y/871S, 670T/692G/871K, 678T/692G/711H/869S, 678T/692G/795E/869S, 678T/692G/869S, 678T/795E/871K/878A, 692G/711H, 692G/711H/795E/869L/871K/878A, 692G/711H/795E/869S, 692G/711H/869L/878S, 692G/711H/869S/878A, 692G/711H/871S/878A, 692G/869L/871K/878S/916R, 692G/869S, 692G/871K, 692Y, 711H, 711H/795E/869S/878S, 711H/869S/878S, 711H/871K, 795E/878S, 812E, 871K, 871S и 878S, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2496. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из S246T, L304M, V313I, V313L, L569H/V589I/L628M/L670T/S678T/T692G/A711H/Q795E/L871S, L569H/L628M, L569H/L628M/L670F/S678T, L569H/L628M/L670T, L569H/L628M/L670T/T692Y/A711H/L871K, L569H/L670F/S678T/T692G/L871S, L569H/L670T/T692G, L569H/S678T/T692G/Q795E, L569H/T692G, L569H/T692Y, L569H/A711H/Q795E/L871S/V878S, L569H/A711H/I869S/V878S, L569H/A711H/L871K, L569T, L569T/F588L, L569T/F588L/V589I/L628M/L629I/T692Y/A711H, L569T/F588L/S678T/T692Y, L569T/F588L/A711H/I869L/L871K/V878S, L569T/F588L/V878S, L569T/V589I/L628M/L670F/T692G/A711H, L569T/V589I/S678T/L871K/V878S, L569T/V589I/T692G/Q795E/L871K/V878S, L569T/V589I/L871S, L569T/L628M/S678T/A711H, L569T/L628M/T692Y, L569T/L670T/S678T/T692G/L871K, L569T/L670T/A711H/L871E, L569T/S678T/I869S/V878S, L569T/S678T/V878S, L569T/T692Y, L569T/T692Y/A711H/I869L/L871K/V878A, L569T/A711H, L569T/Q795E, L569T/L871K, L569T/L871S, L569Y/V589I/L628M/L670T/T692Y/A711H, L569Y/V589I/L628M/T692G/A711H/Q795E, L569Y/V589I/L670F, L569Y/V589I/L670T/S678T/T692G/A711H/Q795E, L569Y/V589I/L670T/L871K, L569Y/V589I/A711H/L871K, L569Y/L628M/L670T/T692Y/A711H/L871S, L569Y/L628M/L670T/A711H, L569Y/L670F/S678T, L569Y/L670T, L569Y/L670T/A711H, L569Y/T692Y/A711H, L569Y/A711H, L569Y/L871E, A572S/F588L/S678T/T692G/I869L/V878A, A572S/F588L/Q795E, A572S/T692G/I869S/V878S, A572S/T692G/V878S, A572S/T692L/I869S/V878S, A582T, G584E, T585K, F588L/V589I/L628M/S678T, V589I, V589I/L670T/T692G/Q795E/L871K,

V589I/L670T/Q795E/L871S, V589I/L871E, L628M/L629I/T692Y/L871S/V878S, L628M/L670F, L628M/L670T/T692G/A711H/Q795E, L628M/A711H/Q795E, L628M/L871S, L628M/V878S, L629I/I869L/V878S, L670T/S678T, L670T/S678T/T692Y/L871S, L670T/T692G/L871K, S678T/T692G/A711H/I869S, S678T/T692G/Q795E/I869S, S678T/T692G/I869S, S678T/Q795E/L871K/V878A, T692G/A711H, T692G/A711H/Q795E/I869L/L871K/V878A, T692G/A711H/Q795E/I869S, T692G/A711H/I869L/V878S, T692G/A711H/I869S/V878A, T692G/A711H/L871S/V878A, T692G/I869L/L871K/V878S/S916R, T692G/I869S, T692G/L871K, T692Y, A711H, A711H/Q795E/I869S/V878S, A711H/I869S/V878S, A711H/L871K, Q795E/V878S, A812E, L871K, L871S и V878S, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2496. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из 60/589, 307, 313, 584 и 810, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2496. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из 60V/589A, 307T, 313T, 584C и 810V, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2496. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из A60V/V589A, S307T, V313T, G584C и L810V, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2496. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в одном или ряде положений, выбранных из 60/589, 246, 304, 307, 313, 569, 569/588, 569/588/589/628/629/692/711, 569/588/678/692, 569/588/711/869/871/878, 569/588/878, 569/589/628/670/678/692/711/795/871, 569/589/628/670/692/711, 569/589/628/692/711/795, 569/589/670, 569/589/670/678/692/711/795, 569/589/670/871, 569/589/678/871/878, 569/589/692/795/871/878, 569/589/711/871, 569/589/871, 569/628, 569/628/670, 569/628/670/678, 569/628/670/692/711/871, 569/628/670/711, 569/628/678/711, 569/628/692, 569/670, 569/670/678, 569/670/678/692/871, 569/670/692, 569/670/711, 569/670/711/871, 569/678/692/795, 569/678/869/878, 569/678/878, 569/692, 569/692/711, 569/692/711/869/871/878, 569/711, 569/711/795/871/878, 569/711/869/878, 569/711/871, 569/795, 569/871, 572/588/678/692/869/878, 572/588/795, 572/692/869/878, 572/692/878, 582, 584, 585, 588/589/628/678, 589, 589/670/692/795/871, 589/670/795/871, 589/871, 628/629/692/871/878, 628/670, 628/670/692/711/795, 628/711/795, 628/871, 628/878, 629/869/878, 670/678, 670/678/692/871, 670/692/871, 678/692/711/869, 678/692/795/869, 678/692/869, 678/795/871/878, 692, 692/711, 692/711/795/869, 692/711/795/869/871/878, 692/711/869/878, 692/711/871/878, 692/869, 692/869/871/878/916, 692/871, 711, 711/795/869/878, 711/869/878, 711/871, 795/878, 810, 812, 871 и 878, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2496. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из 60V/589A, 246T, 304M, 307T, 313I, 313L, 313T, 569H/589I/628M/670T/678T/692G/711H/795E/871S, 569H/628M, 569H/628M/670F/678T,

569H/628M/670T, 569H/628M/670T/692Y/711H/871K, 569H/670F/678T/692G/871S,  
 569H/670T/692G, 569H/678T/692G/795E, 569H/692G, 569H/692Y,  
 569H/711H/795E/871S/878S, 569H/711H/869S/878S, 569H/711H/871K, 569T, 569T/588L,  
 569T/588L/589I/628M/629I/692Y/711H, 569T/588L/678T/692Y,  
 569T/588L/711H/869L/871K/878S, 569T/588L/878S, 569T/589I/628M/670F/692G/711H,  
 569T/589I/678T/871K/878S, 569T/589I/692G/795E/871K/878S, 569T/589I/871S,  
 569T/628M/678T/711H, 569T/628M/692Y, 569T/670T/678T/692G/871K,  
 569T/670T/711H/871E, 569T/678T/869S/878S, 569T/678T/878S, 569T/692Y,  
 569T/692Y/711H/869L/871K/878A, 569T/711H, 569T/795E, 569T/871K, 569T/871S,  
 569Y/589I/628M/670T/692Y/711H, 569Y/589I/628M/692G/711H/795E, 569Y/589I/670F,  
 569Y/589I/670T/678T/692G/711H/795E, 569Y/589I/670T/871K, 569Y/589I/711H/871K,  
 569Y/628M/670T/692Y/711H/871S, 569Y/628M/670T/711H, 569Y/670F/678T, 569Y/670T,  
 569Y/670T/711H, 569Y/692Y/711H, 569Y/711H, 569Y/871E,  
 572S/588L/678T/692G/869L/878A, 572S/588L/795E, 572S/692G/869S/878S, 572S/692G/878S,  
 572S/692L/869S/878S, 582T, 584C, 584E, 585K, 588L/589I/628M/678T, 589I,  
 589I/670T/692G/795E/871K, 589I/670T/795E/871S, 589I/871E, 628M/629I/692Y/871S/878S,  
 628M/670F, 628M/670T/692G/711H/795E, 628M/711H/795E, 628M/871S, 628M/878S,  
 629I/869L/878S, 670T/678T, 670T/678T/692Y/871S, 670T/692G/871K,  
 678T/692G/711H/869S, 678T/692G/795E/869S, 678T/692G/869S, 678T/795E/871K/878A,  
 692G/711H, 692G/711H/795E/869L/871K/878A, 692G/711H/795E/869S,  
 692G/711H/869L/878S, 692G/711H/869S/878A, 692G/711H/871S/878A,  
 692G/869L/871K/878S/916R, 692G/869S, 692G/871K, 692Y, 711H, 711H/795E/869S/878S,  
 711H/869S/878S, 711H/871K, 795E/878S, 810V, 812E, 871K, 871S и 878S, где положения  
 пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2496. В некоторых вариантах осуществления,  
 кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде  
 положений, выбранных из A60V/V589A, S246T, L304M, S307T, V313I, V313L, V313T,  
 L569H/V589I/L628M/L670T/S678T/T692G/A711H/Q795E/L871S, L569H/L628M,  
 L569H/L628M/L670F/S678T, L569H/L628M/L670T,  
 L569H/L628M/L670T/T692Y/A711H/L871K, L569H/L670F/S678T/T692G/L871S,  
 L569H/L670T/T692G, L569H/S678T/T692G/Q795E, L569H/T692G, L569H/T692Y,  
 L569H/A711H/Q795E/L871S/V878S, L569H/A711H/I869S/V878S, L569H/A711H/L871K,  
 L569T, L569T/F588L, L569T/F588L/V589I/L628M/L629I/T692Y/A711H,  
 L569T/F588L/S678T/T692Y, L569T/F588L/A711H/I869L/L871K/V878S,  
 L569T/F588L/V878S, L569T/V589I/L628M/L670F/T692G/A711H,  
 L569T/V589I/S678T/L871K/V878S, L569T/V589I/T692G/Q795E/L871K/V878S,  
 L569T/V589I/L871S, L569T/L628M/S678T/A711H, L569T/L628M/T692Y,  
 L569T/L670T/S678T/T692G/L871K, L569T/L670T/A711H/L871E,  
 L569T/S678T/I869S/V878S, L569T/S678T/V878S, L569T/T692Y,  
 L569T/T692Y/A711H/I869L/L871K/V878A, L569T/A711H, L569T/Q795E, L569T/L871K,  
 L569T/L871S, L569Y/V589I/L628M/L670T/T692Y/A711H,

L569Y/V589I/L628M/T692G/A711H/Q795E, L569Y/V589I/L670F,  
L569Y/V589I/L670T/S678T/T692G/A711H/Q795E, L569Y/V589I/L670T/L871K,  
L569Y/V589I/A711H/L871K, L569Y/L628M/L670T/T692Y/A711H/L871S,  
L569Y/L628M/L670T/A711H, L569Y/L670F/S678T, L569Y/L670T, L569Y/L670T/A711H,  
L569Y/T692Y/A711H, L569Y/A711H, L569Y/L871E,  
A572S/F588L/S678T/T692G/I869L/V878A, A572S/F588L/Q795E,  
A572S/T692G/I869S/V878S, A572S/T692G/V878S, A572S/T692L/I869S/V878S, A582T,  
G584C, G584E, T585K, F588L/V589I/L628M/S678T, V589I,  
V589I/L670T/T692G/Q795E/L871K, V589I/L670T/Q795E/L871S, V589I/L871E,  
L628M/L629I/T692Y/L871S/V878S, L628M/L670F, L628M/L670T/T692G/A711H/Q795E,  
L628M/A711H/Q795E, L628M/L871S, L628M/V878S, L629I/I869L/V878S, L670T/S678T,  
L670T/S678T/T692Y/L871S, L670T/T692G/L871K, S678T/T692G/A711H/I869S,  
S678T/T692G/Q795E/I869S, S678T/T692G/I869S, S678T/Q795E/L871K/V878A,  
T692G/A711H, T692G/A711H/Q795E/I869L/L871K/V878A, T692G/A711H/Q795E/I869S,  
T692G/A711H/I869L/V878S, T692G/A711H/I869S/V878A, T692G/A711H/L871S/V878A,  
T692G/I869L/L871K/V878S/S916R, T692G/I869S, T692G/L871K, T692Y, A711H,  
A711H/Q795E/I869S/V878S, A711H/I869S/V878S, A711H/L871K, Q795E/V878S, L810V,  
A812E, L871K, L871S и V878S, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO:  
2496.

Настоящее изобретение предлагает рекомбинантные кислые альфа-глюкозидазы и/или биологически активные фрагменты рекомбинантных кислых альфа-глюкозидаз, содержащие аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 93%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2880, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2880. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из 24/28/29/39/50/62/78/87/135/150/266/267/522/527/551/670/727/750/830/842/871/883/894/932, 24/28/39/50/62/78/87/135/150/266/267/522/527/551/569/727/830/842/871/883/894/913, 24/28/50/135/150/437/522/527/871/883/894/932, 24/28/62/522/569/932, 24/28/437/486/527, 24/29/39/50/62/78/87/135/150/267/437/486/522/527/551/711/727/750/830/842/871/883/894/913 /932, 24/50/78/87/135/150/267/486/522/527/551/670/727/750/830/842/871/883/894/913/932, 24/50/486/527/711/727, 24/62/87/486/727, 24/62/727/830/932, 24/87/135/522/670/711/830/842/913, 24/150/522/527/727/883/894, 24/527/727/842/871/883/913/932, 24/670/727/750/842/871, 28, 28/50/78/87/135/266/267/437/486/527/551/670/727/750/830/842/871/883/894/913/932, 28/50/522/527/711/727/871, 28/62, 28/62/267/932, 28/437/527/871, 28/522/527/569/711/830/894, 28/727, 28/727/871,

29/39/50/62/65/78/87/135/150/437/551/569/670/727/750/830/842/883/894/932, 29/62/437/527, 29/78/87/150/527/727, 29/78/135/727/830, 29/87, 29/135/150/527/670/727/883, 29/150/267/727/750/871/883/932, 29/150/437/727, 29/522/670/711/871, 29/670/932, 39/50, 39/727/750/932, 50/135/150/932, 50/437/522/527, 50/711, 50/727/750/883/894, 62, 62/87/150, 62/87/150/727, 62/135/522/711/727/750/842/871/894, 62/437, 62/437/727, 78/87/486/527/670/727/750/830/842/871/913/932, 87/750, 89/109/527/678/727/842, 89/109/678/727/736/812/878, 89/109/727/932, 89/109/932, 89/527, 89/527/678/692/736/842/878/932, 89/527/678/932, 89/527/727/812/860, 89/678/692/736/932, 89/678/812/878, 89/842/878, 109/527/678/812, 109/678/692/842/860/878/932, 109/678/727/860, 109/678/736/812/878, 109/678/812, 109/678/842/878, 109/692/727/736/812, 109/692/727/812/842/860, 109/727/860/878, 109/736/932, 109/812, 109/842, 109/932, 135/670/727, 135/711/750/932, 150/527/842/871/913, 150/871/932, 150/883/932, 267/527/727, 403/527/678/692/736/812/842/860, 437/522/527/670/871, 437/750/830/932, 522, 522/527/569/727, 522/830, 527, 527/678/692/727/736/878, 527/678/692/812/932, 527/692/727/736/812, 527/692/727/736/842/860/878, 527/727/736, 527/736/932, 527/812, 670/711/871, 670/830/871, 678/692/727/812/842, 678/692/812, 678/812, 678/860/878, 678/913, 678/932, 692/727/736/842/913, 692/812, 727, 727/932, 871 и 878/932, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2880. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из

24L/28L/29L/39P/50Q/62A/78P/87D/135S/150T/266T/267R/522E/527N/551V/670L/727S/750A/830Q/842G/871L/883R/894Q/932S,

24L/28L/39P/50Q/62A/78P/87D/135S/150T/266T/267R/522E/527N/551V/569L/727S/830Q/842G/871L/883R/894Q/913V,

24L/28L/50Q/135S/150T/437A/522E/527N/871L/883R/894Q/932S,

24L/28L/62A/522E/569L/932S, 24L/28L/437A/486T/527N,

24L/29L/39P/50Q/62A/78P/87D/135S/150T/267R/437A/486T/522E/527N/551V/711A/727S/750A/830Q/842G/871L/883R/894Q/913V/932S,

24L/50Q/78P/87D/135S/150T/267R/486T/522E/527N/551V/670L/727S/750A/830Q/842G/871L/883R/894Q/913V/932S, 24L/50Q/486T/527N/711A/727S, 24L/62A/87D/486T/727S,

24L/62A/727S/830Q/932S, 24L/87D/135S/522E/670L/711A/830Q/842G/913V,

24L/150T/522E/527N/727S/883R/894Q, 24L/527N/727S/842G/871L/883R/913V/932S,

24L/670L/727S/750A/842G/871L, 28L,

28L/50Q/78P/87D/135S/266T/267R/437A/486T/527N/551V/670L/727S/750A/830Q/842G/871L/883R/894Q/913V/932S, 28L/50Q/522E/527N/711A/727S/871L, 28L/62A,

28L/62A/267R/932S, 28L/437A/527N/871L, 28L/522E/527N/569L/711A/830Q/894Q,

28L/727S, 28L/727S/871L,

29L/39P/50Q/62A/65R/78P/87D/135S/150T/437A/551V/569L/670L/727S/750A/830Q/842G/883R/894Q/932S, 29L/62A/437A/527N, 29L/78P/87D/150T/527N/727S,

29L/78P/135S/727S/830Q, 29L/87D, 29L/135S/150T/527N/670L/727S/883R,

29L/150T/267R/727S/750A/871L/883R/932S, 29L/150T/437A/727S,  
 29L/522E/670L/711A/871L, 29L/670L/932S, 39P/50Q, 39P/727S/750A/932S,  
 50Q/135S/150T/932S, 50Q/437A/522E/527N, 50Q/711A, 50Q/727S/750A/883R/894Q, 62A,  
 62A/87D/150T, 62A/87D/150T/727S, 62A/135S/522E/711A/727S/750A/842G/871L/894Q,  
 62A/437A, 62A/437A/727S,  
 78P/87D/486T/527N/670L/727S/750A/830Q/842G/871L/913V/932S, 87D/750A,  
 89R/109D/527N/678T/727S/842G, 89R/109D/678T/727S/736M/812E/878S,  
 89R/109D/727S/932S, 89R/109D/932S, 89R/527N,  
 89R/527N/678T/692G/736M/842G/878S/932S, 89R/527N/678T/932S,  
 89R/527N/727S/812E/860F, 89R/678T/692G/736M/932S, 89R/678T/812E/878S,  
 89R/842G/878S, 109D/527N/678T/812E, 109D/678T/692G/842G/860F/878S/932S,  
 109D/678T/727S/860F, 109D/678T/736M/812E/878S, 109D/678T/812E,  
 109D/678T/842G/878S, 109D/692G/727S/736M/812E, 109D/692G/727S/812E/842G/860F,  
 109D/727S/860F/878S, 109D/736M/932S, 109D/812E, 109D/842G, 109D/932S,  
 135S/670L/727S, 135S/711A/750A/932S, 150T/527N/842G/871L/913V, 150T/871L/932S,  
 150T/883R/932S, 267R/527N/727S, 403H/527N/678T/692G/736M/812E/842G/860F,  
 437A/522E/527N/670L/871L, 437A/750A/830Q/932S, 522E, 522E/527N/569L/727S,  
 522E/830Q, 527N, 527N/678T/692G/727S/736M/878S, 527N/678T/692G/812E/932S,  
 527N/692G/727S/736M/812E, 527N/692G/727S/736M/842G/860F/878S, 527N/727S/736M,  
 527N/736M/932S, 527N/812E, 670L/711A/871L, 670L/830Q/871L,  
 678T/692G/727S/812E/842G, 678T/692G/812E, 678T/812E, 678T/860F/878S, 678T/913V,  
 678T/932S, 692G/727S/736M/842G/913V, 692G/812E, 727S, 727S/932S, 871L и 878S/932S,  
 где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2880. В некоторых вариантах  
 осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в  
 положении или ряде положений, выбранных из  
 W24L/S28L/T29L/Q39P/V50Q/L62A/E78P/E87D/Q135S/S150T/N266T/K267R/V522E/R527  
 N/A551V/T670L/W727S/P750A/K830Q/S842G/E871L/H883R/G894Q/A932S,  
 W24L/S28L/Q39P/V50Q/L62A/E78P/E87D/Q135S/S150T/N266T/K267R/V522E/R527N/A55  
 1V/T569L/W727S/K830Q/S842G/E871L/H883R/G894Q/R913V,  
 W24L/S28L/V50Q/Q135S/S150T/G437A/V522E/R527N/E871L/H883R/G894Q/A932S,  
 W24L/S28L/L62A/V522E/T569L/A932S, W24L/S28L/G437A/E486T/R527N,  
 W24L/T29L/Q39P/V50Q/L62A/E78P/E87D/Q135S/S150T/K267R/G437A/E486T/V522E/R527  
 N/A551V/H711A/W727S/P750A/K830Q/S842G/E871L/H883R/G894Q/R913V/A932S,  
 W24L/V50Q/E78P/E87D/Q135S/S150T/K267R/E486T/V522E/R527N/A551V/T670L/W727S/  
 P750A/K830Q/S842G/E871L/H883R/G894Q/R913V/A932S,  
 W24L/V50Q/E486T/R527N/H711A/W727S, W24L/L62A/E87D/E486T/W727S,  
 W24L/L62A/W727S/K830Q/A932S,  
 W24L/E87D/Q135S/V522E/T670L/H711A/K830Q/S842G/R913V,  
 W24L/S150T/V522E/R527N/W727S/H883R/G894Q,  
 W24L/R527N/W727S/S842G/E871L/H883R/R913V/A932S,

W24L/T670L/W727S/P750A/S842G/E871L, S28L,  
 S28L/V50Q/E78P/E87D/Q135S/N266T/K267R/G437A/E486T/R527N/A551V/T670L/W727S/  
 P750A/K830Q/S842G/E871L/H883R/G894Q/R913V/A932S,  
 S28L/V50Q/V522E/R527N/H711A/W727S/E871L, S28L/L62A, S28L/L62A/K267R/A932S,  
 S28L/G437A/R527N/E871L, S28L/V522E/R527N/T569L/H711A/K830Q/G894Q,  
 S28L/W727S, S28L/W727S/E871L,  
 T29L/Q39P/V50Q/L62A/G65R/E78P/E87D/Q135S/S150T/G437A/A551V/T569L/T670L/W72  
 7S/P750A/K830Q/S842G/H883R/G894Q/A932S, T29L/L62A/G437A/R527N,  
 T29L/E78P/E87D/S150T/R527N/W727S, T29L/E78P/Q135S/W727S/K830Q, T29L/E87D,  
 T29L/Q135S/S150T/R527N/T670L/W727S/H883R,  
 T29L/S150T/K267R/W727S/P750A/E871L/H883R/A932S, T29L/S150T/G437A/W727S,  
 T29L/V522E/T670L/H711A/E871L, T29L/T670L/A932S, Q39P/V50Q,  
 Q39P/W727S/P750A/A932S, V50Q/Q135S/S150T/A932S, V50Q/G437A/V522E/R527N,  
 V50Q/H711A, V50Q/W727S/P750A/H883R/G894Q, L62A, L62A/E87D/S150T,  
 L62A/E87D/S150T/W727S,  
 L62A/Q135S/V522E/H711A/W727S/P750A/S842G/E871L/G894Q, L62A/G437A,  
 L62A/G437A/W727S,  
 E78P/E87D/E486T/R527N/T670L/W727S/P750A/K830Q/S842G/E871L/R913V/A932S,  
 E87D/P750A, A89R/L109D/R527N/S678T/W727S/S842G,  
 A89R/L109D/S678T/W727S/L736M/A812E/V878S, A89R/L109D/W727S/A932S,  
 A89R/L109D/A932S, A89R/R527N,  
 A89R/R527N/S678T/T692G/L736M/S842G/V878S/A932S, A89R/R527N/S678T/A932S,  
 A89R/R527N/W727S/A812E/L860F, A89R/S678T/T692G/L736M/A932S,  
 A89R/S678T/A812E/V878S, A89R/S842G/V878S, L109D/R527N/S678T/A812E,  
 L109D/S678T/T692G/S842G/L860F/V878S/A932S, L109D/S678T/W727S/L860F,  
 L109D/S678T/L736M/A812E/V878S, L109D/S678T/A812E, L109D/S678T/S842G/V878S,  
 L109D/T692G/W727S/L736M/A812E, L109D/T692G/W727S/A812E/S842G/L860F,  
 L109D/W727S/L860F/V878S, L109D/L736M/A932S, L109D/A812E, L109D/S842G,  
 L109D/A932S, Q135S/T670L/W727S, Q135S/H711A/P750A/A932S,  
 S150T/R527N/S842G/E871L/R913V, S150T/E871L/A932S, S150T/H883R/A932S,  
 K267R/R527N/W727S, R403H/R527N/S678T/T692G/L736M/A812E/S842G/L860F,  
 G437A/V522E/R527N/T670L/E871L, G437A/P750A/K830Q/A932S, V522E,  
 V522E/R527N/T569L/W727S, V522E/K830Q, R527N,  
 R527N/S678T/T692G/W727S/L736M/V878S, R527N/S678T/T692G/A812E/A932S,  
 R527N/T692G/W727S/L736M/A812E, R527N/T692G/W727S/L736M/S842G/L860F/V878S,  
 R527N/W727S/L736M, R527N/L736M/A932S, R527N/A812E, T670L/H711A/E871L,  
 T670L/K830Q/E871L, S678T/T692G/W727S/A812E/S842G, S678T/T692G/A812E,  
 S678T/A812E, S678T/L860F/V878S, S678T/R913V, S678T/A932S,  
 T692G/W727S/L736M/S842G/R913V, T692G/A812E, W727S, W727S/A932S, E871L и  
 V878S/A932S, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2880. В

некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из 62/87/150, 89/109/527/678/727/842, 89/109/678/727/736/812/878, 89/109/932, 89/527/678/692/736/842/878/932, 89/527/727/812/860, 89/678/692/736/932, 89/678/812/878, 109/527/678/812, 109/678/692/842/860/878/932, 109/678/736/812/878, 109/678/812, 109/692/727/736/812, 109/692/727/812/842/860, 109/736/932, 109/812, 109/842, 109/932, 403/527/678/692/736/812/842/860, 522/830, 527/678/692/727/736/878, 527/678/692/812/932, 527/692/727/736/812, 527/692/727/736/842/860/878, 527/727/736, 527/736/932, 527/812, 678/692/727/812/842, 678/692/812, 678/812, 692/727/736/842/913 и 692/812, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2880. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из 62A/87D/150T, 89R/109D/527N/678T/727S/842G, 89R/109D/678T/727S/736M/812E/878S, 89R/109D/932S, 89R/527N/678T/692G/736M/842G/878S/932S, 89R/527N/727S/812E/860F, 89R/678T/692G/736M/932S, 89R/678T/812E/878S, 109D/527N/678T/812E, 109D/678T/692G/842G/860F/878S/932S, 109D/678T/736M/812E/878S, 109D/678T/812E, 109D/692G/727S/736M/812E, 109D/692G/727S/812E/842G/860F, 109D/736M/932S, 109D/812E, 109D/842G, 109D/932S, 403H/527N/678T/692G/736M/812E/842G/860F, 522E/830Q, 527N/678T/692G/727S/736M/878S, 527N/678T/692G/812E/932S, 527N/692G/727S/736M/812E, 527N/692G/727S/736M/842G/860F/878S, 527N/727S/736M, 527N/736M/932S, 527N/812E, 678T/692G/727S/812E/842G, 678T/692G/812E, 678T/812E, 692G/727S/736M/842G/913V и 692G/812E, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2880. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из L62A/E87D/S150T, A89R/L109D/R527N/S678T/W727S/S842G, A89R/L109D/S678T/W727S/L736M/A812E/V878S, A89R/L109D/A932S, A89R/R527N/S678T/T692G/L736M/S842G/V878S/A932S, A89R/R527N/W727S/A812E/L860F, A89R/S678T/T692G/L736M/A932S, A89R/S678T/A812E/V878S, L109D/R527N/S678T/A812E, L109D/S678T/T692G/S842G/L860F/V878S/A932S, L109D/S678T/L736M/A812E/V878S, L109D/S678T/A812E, L109D/T692G/W727S/L736M/A812E, L109D/T692G/W727S/A812E/S842G/L860F, L109D/L736M/A932S, L109D/A812E, L109D/S842G, L109D/A932S, R403H/R527N/S678T/T692G/L736M/A812E/S842G/L860F, V522E/K830Q, R527N/S678T/T692G/W727S/L736M/V878S, R527N/S678T/T692G/A812E/A932S, R527N/T692G/W727S/L736M/A812E, R527N/T692G/W727S/L736M/S842G/L860F/V878S, R527N/W727S/L736M, R527N/L736M/A932S, R527N/A812E, S678T/T692G/W727S/A812E/S842G, S678T/T692G/A812E, S678T/A812E, T692G/W727S/L736M/S842G/R913V и T692G/A812E, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2880.

Настоящее изобретение предлагает рекомбинантные кислые альфа-глюкозидазы



и/или биологически активные фрагменты рекомбинантных кислых альфа-глюкозидаз, содержащие аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 93%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 3104, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 3104. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из 62, 62/89/830, 62/248/678/830/878/932, 62/678, 62/678/785, 62/678/830, 62/678/830/860, 62/678/830/860/871/878/932, 62/678/830/860/878, 62/678/830/860/878/932, 62/678/830/860/932, 62/678/830/871, 62/678/830/871/932, 62/678/830/878/932, 62/678/830/932, 62/678/860, 62/678/860/878, 62/678/860/932, 62/678/871, 62/678/871/932, 62/678/878/932, 62/678/932, 62/830, 62/830/860, 62/830/860/871/873, 62/830/860/878/932, 62/830/860/932, 62/830/871/932, 62/830/878, 62/830/932, 62/833/860/932, 62/860, 62/860/871, 62/860/871/878, 62/860/871/932, 62/860/878/932, 62/860/932, 62/871/878/932, 62/871/932, 62/878, 62/878/932, 62/932, 678, 678/830/932, 678/932 и 860/932, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 3104. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из 62A, 62A/89D/830Q, 62A/248H/678T/830Q/878S/932S, 62A/678T, 62A/678T/785Q, 62A/678T/830Q, 62A/678T/830Q/860F, 62A/678T/830Q/860F/871L/878S/932S, 62A/678T/830Q/860F/878S, 62A/678T/830Q/860F/878S/932S, 62A/678T/830Q/860F/932S, 62A/678T/830Q/871L, 62A/678T/830Q/871L/932S, 62A/678T/830Q/878S/932S, 62A/678T/830Q/932S, 62A/678T/860F, 62A/678T/860F/878S, 62A/678T/860F/932S, 62A/678T/871L, 62A/678T/871L/932S, 62A/678T/878S/932S, 62A/678T/878S/932T, 62A/678T/932S, 62A/830Q, 62A/830Q/860F, 62A/830Q/860F/871L/873H, 62A/830Q/860F/878S/932S, 62A/830Q/860F/932S, 62A/830Q/871L/932S, 62A/830Q/878S, 62A/830Q/932S, 62A/833I/860F/932S, 62A/860F, 62A/860F/871L, 62A/860F/871L/878S, 62A/860F/871L/932S, 62A/860F/878S/932S, 62A/860F/932S, 62A/871L/878S/932S, 62A/871L/932S, 62A/878S, 62A/878S/932S, 62A/932S, 678T, 678T/830Q/932S, 678T/932S и 860F/932S, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 3104. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из L62A, L62A/A89D/K830Q, L62A/Y248H/S678T/K830Q/V878S/A932S, L62A/S678T, L62A/S678T/P785Q, L62A/S678T/K830Q, L62A/S678T/K830Q/L860F, L62A/S678T/K830Q/L860F/E871L/V878S/A932S, L62A/S678T/K830Q/L860F/V878S, L62A/S678T/K830Q/L860F/V878S/A932S, L62A/S678T/K830Q/L860F/A932S, L62A/S678T/K830Q/E871L, L62A/S678T/K830Q/E871L/A932S, L62A/S678T/K830Q/V878S/A932S, L62A/S678T/K830Q/A932S, L62A/S678T/L860F,

L62A/S678T/L860F/V878S, L62A/S678T/L860F/A932S, L62A/S678T/E871L,  
 L62A/S678T/E871L/A932S, L62A/S678T/V878S/A932S, L62A/S678T/V878S/A932T,  
 L62A/S678T/A932S, L62A/K830Q, L62A/K830Q/L860F, L62A/K830Q/L860F/E871L/R873H,  
 L62A/K830Q/L860F/V878S/A932S, L62A/K830Q/L860F/A932S,  
 L62A/K830Q/E871L/A932S, L62A/K830Q/V878S, L62A/K830Q/A932S,  
 L62A/M833I/L860F/A932S, L62A/L860F, L62A/L860F/E871L, L62A/L860F/E871L/V878S,  
 L62A/L860F/E871L/A932S, L62A/L860F/V878S/A932S, L62A/L860F/A932S,  
 L62A/E871L/V878S/A932S, L62A/E871L/A932S, L62A/V878S, L62A/V878S/A932S,  
 L62A/A932S, S678T, S678T/K830Q/A932S, S678T/A932S и L860F/A932S, где положения  
 пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 3104.

В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из 62/89/830, 62/830, 62/830/860, 62/830/860/932 и 62/830. /932, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 3104. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из 62A/89D/830Q, 62A/830Q, 62A/830Q/860F, 62A/830Q/860F/932S и 62A/830Q/932S, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 3104. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из L62A/A89D/K830Q, L62A/K830Q, L62A/K830Q/L860F, L62A/K830Q/L860F/A932S и L62A/K830Q/A932S, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 3104.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну мутацию, по меньшей мере, в одном положении, как указано в таблицах 3-1, 3-2, 4-1, 6-1, 10-1, 10-2, 12-1, 13-1, 13-2, 14-1, 14-2, 15-1, 16-1, 17-1, 17-2, 17-3, 17-4, 17-5, 17-6, 17-7, 17-8 и/или 17-9. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза получена из кислой альфа-глюкозидазы человека. В еще некоторых дополнительных вариантах осуществления, рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 946, 1956, 2496, 2880 и/или 3104.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления, предложенная здесь рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза является термостабильной. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза устойчива к протеолизу. В еще некоторых дополнительных вариантах осуществления, рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза устойчива, по меньшей мере, к одной протеазе пищеварительного тракта. В некоторых вариантах осуществления, протеаза пищеварительного тракта выбрана из химотрипсина, трипсина, карбоксипептидаз и эластаз. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза является кислотоустойчивой. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза устойчива к кислому pH и нейтральному pH. В еще некоторых дополнительных вариантах осуществления,

рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза очищена. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза демонстрирует, по меньшей мере, одно улучшенное свойство, выбранное из: i) повышенной каталитической активности; ii) повышенной экспрессии; iii) повышенной стабильности при нейтральном уровне pH; iv) повышенной стабильности при кислых уровнях pH; iv) повышенной активности в клеточных лизатах; и vi) снижения иммуногенности; или комбинации любого из i), ii), iii), iv), v) и/или vi) по сравнению с эталонной последовательностью. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза демонстрирует, по меньшей мере, одно улучшенное свойство, выбранное из: i) повышенной каталитической активности; ii) повышенной толерантности к pH 7; iii) повышенной толерантности к pH 4; iv) повышенной экспрессии; v) повышенного поглощения клетками; vi) повышенной ферментативной активности в клеточных лизатах; vii) сниженной иммуногенности или комбинации любого из i), ii), iii), iv), v), vi) и/или vii) по сравнению с эталонной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления, эталонная последовательность выбрана из SEQ ID NO: 2, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 946, 1956, 2496, 2880 и/или 3104. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза более стабильна при pH 7, чем кислая альфа-глюкозидаза SEQ ID NO: 2, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 946, 1956, 2496, 2880 и/или 3104. В некоторых других вариантах осуществления, рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза более стабильна при pH 4, чем кислая альфа-глюкозидаза SEQ ID NO: 2, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 946, 1956, 2496, 2880 и/или 3104. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза демонстрирует более высокую экспрессию, чем кислая альфа-глюкозидаза SEQ ID NO: 2, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 946, 1956, 2496, 2880 и/или 3104. В еще некоторых дополнительных вариантах осуществления, рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза является более лизосомально стабильной, чем кислая альфа-глюкозидаза SEQ ID NO: 2, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 946, 1956, 2496, 2880 и/или 3104. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза легче поглощается клетками, чем кислая альфа-глюкозидаза SEQ ID NO: 2, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 946, 1956, 2496, 2880 и/или 3104. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза проявляет более высокую ферментативную активность в клеточных лизатах, чем кислая альфа-глюкозидаза SEQ ID NO: 2, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 946, 1956, 2496, 2880 и/или 3104. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза проявляет пониженную или уменьшенную иммуногенность, чем кислая альфа-глюкозидаза SEQ ID NO: 2, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 946, 1956, 2496, 2880 и/или 3104. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза является очищенной.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления, рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит полипептидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, примерно 85%, примерно 86%, примерно 87%, примерно 88%, примерно 89%,

примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98% или примерно 99% идентичность последовательности, по меньшей мере, одной из четных последовательностей SEQ ID NO: 8-3378. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит полипептидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности, по меньшей мере, одной из четных последовательностей SEQ ID NO: 8-3378. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит полипептидную последовательность, по меньшей мере, на 90% идентичную, по меньшей мере, одной из четных последовательностей SEQ ID NO: 8-3378. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит полипептидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, одну из четных последовательностей SEQ ID NO: 2-3378. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза состоит из полипептидной последовательности, включающей, по меньшей мере, одну из четных последовательностей SEQ ID NO: 8-3378.

Настоящее изобретение также предлагает композиции, содержащие, по меньшей мере, одну рекомбинантную кислую альфа-глюкозидазу, предложенную в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, композиции содержат одну рекомбинантную кислую альфа-глюкозидазу, предложенную в настоящем документе.

Настоящее изобретение также предлагает рекомбинантные полинуклеотидные последовательности, кодирующие, по меньшей мере, одну рекомбинантную кислую альфа-глюкозидазу, предложенную в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная полинуклеотидная последовательность кодирует одну рекомбинантную кислую альфа-глюкозидазу. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная полинуклеотидная последовательность выбрана из ДНК, РНК и мРНК. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотидная последовательность является кодон-оптимизированной. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, рекомбинантная полинуклеотидная последовательность кодирует рекомбинантную кислую альфа-глюкозидазу, содержащую полипептидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, примерно 85%, примерно 86%, примерно 87%, примерно 88%, примерно 89%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98% или примерно 99% идентичность последовательности, по меньшей мере, одной из четных последовательностей SEQ ID NO: 8-3378. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза, кодируемая полинуклеотидной последовательностью, содержит полипептидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности, по меньшей мере, одной из

четных последовательностей SEQ ID NO: 8-3378.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления, рекомбинантная полинуклеотидная последовательность имеет, по меньшей мере, примерно 85%, примерно 86%, примерно 87%, примерно 88%, примерно 89%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98% или примерно 99% идентичность последовательности, по меньшей мере, одной из нечетных последовательностей SEQ ID NO: 7-3377. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, рекомбинантная полинуклеотидная последовательность имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичность, по меньшей мере, одной из нечетных последовательностей SEQ ID NO: 7-3377. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, рекомбинантная полинуклеотидная последовательность содержит последовательность, по меньшей мере, на 90% идентичную последовательности, по меньшей мере, одной из нечетных последовательностей SEQ ID NO: 7-3377. В еще некоторых дополнительных вариантах осуществления, рекомбинантная полинуклеотидная последовательность содержит нечетную последовательность SEQ ID NO: 7-3377.

Настоящее изобретение также предлагает векторы экспрессии, содержащие рекомбинантную полинуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантную кислоту альфа-глюкозидазу. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная полинуклеотидная последовательность функционально связана с контрольной последовательностью. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, контрольная последовательность представляет собой промотор. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, промотор представляет собой гетерологичный промотор. Настоящее изобретение также относится к вектору экспрессии, называемому в настоящем документе рДН. В некоторых вариантах осуществления, вектор рДН содержит, по меньшей мере, одну полинуклеотидную последовательность, кодирующую кислоту альфа-глюкозидазу. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, вектор рДН содержит, по меньшей мере, одну полинуклеотидную последовательность, кодирующую кислоту альфа-глюкозидазу, предложенную в настоящем документе. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, вектор рДН содержит, по меньшей мере, одну полинуклеотидную последовательность, выбранную из нечетных последовательностей SEQ ID NO: 1-3377. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, вектор рДН содержит, по меньшей мере, одну полинуклеотидную последовательность, кодирующую кислоту альфа-глюкозидазу, выбранную из четных последовательностей SEQ ID NO: 2-3378. В некоторых вариантах осуществления, вектор рДН содержит SEQ ID NO: 3379, тогда как в некоторых других вариантах осуществления, вектор рДН содержит SEQ ID NO: 3380. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, SEQ ID NO: 1, которая включена в SEQ ID NO: 3379, заменена другой полинуклеотидной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления, SEQ ID NO: 1 в SEQ ID NO: 3379 заменена, по меньшей мере, одной полинуклеотидной последовательностью, выбранной из нечетных

последовательностей SEQ ID NO: 1-3377. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, вектор рДН содержит плазмиду, представленную на карте на Фигуре 9, в то время как в некоторых других вариантах осуществления, вектор рДН содержит плазмиду, представленную на карте на Фигуре 10. А некоторых вариантах осуществления, «штатная последовательность» (т.е. bla последовательность) в плазмиде, показанной на фиг. 10, заменена представляющим интерес геном. В некоторых вариантах осуществления, от «штатный ген» стартового кодона ATG до последнего кодона гена пронумерован от пары оснований 724 до 1581 (всего 858 пар оснований). Используемые в настоящем документе термины «штатный ген» и «штатная последовательность» относятся к последовательности внутри плазмидного вектора, которая заменена представляющим интерес геном. Используемый в настоящем документе термин «представляющий интерес ген» относится к гену, который кодирует желаемый полипептид (например, «представляющий интерес полипептид»). В некоторых дополнительных вариантах осуществления, штатная последовательность заменена представляющим интерес геном (т.е. геном, экспрессия которого желательна, так как продуцируется представляющий интерес полипептид, такой как вариант кислой альфа-глюкозидазы).

Настоящее изобретение также предлагает клетки-хозяева, содержащие, по меньшей мере, один вектор экспрессии, предложенный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, вектор экспрессии, представленный в клетках-хозяевах, представляет собой рДН. В некоторых вариантах осуществления, клетка-хозяин выбрана из эукариота и прокариота. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего.

Настоящее изобретение также предлагает способы получения варианта рекомбинантной кислой альфа-глюкозидазы, включающие культивирование, по меньшей мере, одной клетки-хозяина, представленной в настоящем документе, в условиях, при которых продуцируется кислая альфа-глюкозидаза, кодируемая рекомбинантным полинуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления, способы дополнительно включают стадию выделения кислой альфа-глюкозидазы. В еще некоторых дополнительных вариантах осуществления, способы дополнительно включают стадию очистки кислой альфа-глюкозидазы. Настоящее изобретение также предлагает рекомбинантные варианты кислой альфа-глюкозидазы, полученные в соответствии со способом, предложенным в настоящем документе.

Настоящее изобретение также предлагает композиции, содержащие, по меньшей мере, одну рекомбинантную кислую альфа-глюкозидазу, предложенную в настоящем документе. Настоящее изобретение также предлагает применение предложенных в настоящем документе композиций. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям для лечения болезни Помпе, включающим, по меньшей мере, одну композицию, предложенную в настоящем документе. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, фармацевтическая композиция дополнительно содержит, по меньшей мере, один фармацевтически

приемлемый носитель и/или эксципиент. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, фармацевтическая композиция пригодна для парентеральной инъекции или инфузии человеку. В еще некоторых дополнительных вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает фармацевтические композиции, содержащие, по меньшей мере, один рекомбинантный полинуклеотид, предложенный в настоящем документе. В еще некоторых дополнительных вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает фармацевтические композиции, содержащие, по меньшей мере, один рекомбинантный полипептид, предложенный в настоящем документе. В еще некоторых дополнительных вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает композиции, содержащие, по меньшей мере, один рекомбинантный полинуклеотид и, по меньшей мере, один рекомбинантный полипептид, предложенные в настоящем документе.

Настоящее изобретение также предлагает способы лечения и/или профилактики симптомов болезни Помпе у субъекта, включающие предоставление субъекту, страдающему болезнью Помпе, по меньшей мере, одной фармацевтической композиции, предложенной в настоящем документе, и введение фармацевтической композиции субъекту. В некоторых вариантах осуществления, симптомы болезни Помпе облегчаются. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, субъектом является младенец или ребенок. В еще некоторых дополнительных вариантах осуществления, субъект является взрослым или молодым человеком.

#### **ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

На Фигуре 1 представлен график, показывающий результаты кинетического анализа для трех вариантов GAA, как описано в примере 9.

На Фигуре 2 представлен график, показывающий активность гидролиза гликогена до глюкозы четырех вариантов GAA, как описано в примере 9.

На Фигуре 3 представлен график, показывающий уровни гидролиза 4-MuGlu четырех вариантов GAA, как описано в примере 9.

На Фигуре 4 представлен график, показывающий поглощение клетками различных очищенных вариантов GAA, выраженное как активность RFU, после 5 часов инкубации при 37°C с культивируемыми фибробластами пациентов с Помпе с последующей 24-часовой инкубацией.

На фигуре 5 представлен график, показывающий поглощение клетками различных очищенных вариантов GAA, выраженное как активность RFU, после 24 часов инкубации при 37°C с культивируемыми фибробластами пациента с Помпе.

На фигуре 6 представлен график, показывающий поглощение клетками различных очищенных вариантов GAA, выраженное как активность RFU, после 5 часов инкубации при 37°C с культивируемыми миобластами C2C12 GAA-/- с последующей 24-часовой инкубацией.

На Фигуре 7 представлен график, показывающий поглощение клетками различных очищенных вариантов GAA, выраженное как активность RFU, после 24 часов инкубации при 37°C с культивируемыми миобластами C2C12 GAA-/-.

На Фигуре 8 представлен график, показывающий клеточное поглощение различных очищенных вариантов GAA, выраженное в виде относительной активности, после 1-7 дней инкубации при 37°C с культивируемыми фибробластами пациента с Помпе.

На фигуре 9 представлена карта плазмиды вектора pDH, содержащего WT GAA.

На фигуре 10 представлена карта плазмиды, показывающая вектор pDH, содержащий штатную последовательность bla (т.е. бета-лактамазу).

На фигуре 11 представлен график, показывающий стабильность восьми вариантов GAA при нейтральном pH и 37°C, выраженную в виде нормализованной остаточной RFU активности.

На фигуре 12 представлен график, показывающий поглощение клетками различных очищенных вариантов GAA, выраженное в виде RFU активности, после 24 часов инкубации при 37°C с культивируемыми фибробластами пациента с Помпе.

На фигуре 13 представлен график, показывающий поглощение клетками различных очищенных вариантов GAA, выраженное как активность RFU, после 72 часов инкубации при 37°C с культивируемыми фибробластами пациента с Помпе.

На фигуре 14 представлен график, показывающий поглощение клетками различных очищенных вариантов GAA, выраженное как активность RFU, после 24 часов инкубации при 37°C с культивируемыми миобластами C2C12 GAA-/-.

На фигуре 15 представлен график, показывающий поглощение клетками различных очищенных вариантов GAA, выраженное как активность RFU, после 72 часов инкубации при 37°C с культивируемыми миобластами C2C12 GAA-/-.

На фигуре 16 представлен график, показывающий поглощение клетками различных очищенных вариантов GAA, выраженное как активность RFU, после 4 часов инкубации при 37°C с культивируемыми фибробластами пациента с Помпе с последующим промыванием клеток и дополнительной 20-часовой инкубацией.

На фигуре 17 представлен график, показывающий поглощение клетками различных очищенных вариантов GAA, выраженное в виде RFU активности, после 24 часов инкубации при 37°C с культивируемыми фибробластами пациента с Помпе.

На фигуре 18 представлен график, показывающий поглощение клетками различных очищенных вариантов GAA, выраженное как активность RFU, после 72 часов инкубации при 37°C с культивируемыми фибробластами пациента с Помпе.

На фигуре 19 представлен график, показывающий поглощение клетками различных очищенных вариантов GAA, выраженное как активность RFU, после 4 часов инкубации при 37°C с культивируемыми миобластами C2C12 GAA/-/ с последующим промыванием клеток и дополнительной 20-часовой инкубацией.

На фигуре 20 представлен график, показывающий поглощение клетками различных очищенных вариантов GAA, выраженное как активность RFU, после 24 часов инкубации при 37°C с культивируемыми миобластами C2C12 GAA-/-.

На фигуре 21 представлен график, показывающий поглощение клетками



различных очищенных вариантов GAA, выраженное как активность RFU, после 72 часов инкубации при 37°C с культивируемыми миобластами C2C12 GAA-/-.

На фигуре 22 представлен график, показывающий поглощение клетками различных очищенных вариантов GAA, выраженное как активность RFU, после 96 часов инкубации при 37°C с культивируемыми фибробластами пациента с Помпе.

На фигуре 23 представлен график, показывающий поглощение клетками различных очищенных вариантов GAA, выраженное как активность RFU, после 96 часов инкубации при 37°C с культивируемыми миобластами C2C12 GAA-/-.

На фигуре 24 представлен график, показывающий поглощение клетками различных очищенных вариантов GAA, выраженное как активность RFU, после 48 часов инкубации при 37°C с культивируемыми фибробластами пациента с Помпе.

На фигуре 25 представлен график, показывающий поглощение клетками различных очищенных вариантов GAA, выраженное как активность RFU, после 48 часов инкубации при 37°C с культивируемыми миобластами C2C12 GAA-/-.

На фигуре 26 представлен график, показывающий поглощение клетками различных очищенных вариантов GAA, выраженное как активность RFU, после 1 часа инкубации при 37°C с культивируемыми фибробластами пациента с Помпе с последующим промыванием клеток и дополнительной инкубацией в течение 71 часа.

На фигуре 27 представлен график, показывающий поглощение клетками различных очищенных вариантов GAA, выраженное как активность RFU, после 1 часа инкубации при 37°C с культивируемыми миобластами C2C12 GAA-/- с последующим промыванием клеток и дополнительной инкубацией в течение 71 часа.

## **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящее изобретение предлагает сконструированные полипептиды кислой альфа-глюкозидазы (GAA) и их композиции. В некоторых вариантах осуществления, сконструированные полипептиды GAA были оптимизированы для обеспечения повышенной каталитической активности и повышенной кислотной стабильности при одновременном снижении чувствительности к протеолизу. Изобретение также предлагает способы использования композиций, содержащих сконструированные полипептиды GAA, для терапевтических и других целей.

### **Сокращения и определения:**

Если не указано иное, все используемые в настоящем документе технические и научные термины обычно имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится данное изобретение. Как правило, используемая в настоящем документе номенклатура и описанные ниже лабораторные процедуры клеточных культур, молекулярной генетики, микробиологии, органической химии, аналитической химии и химии нуклеиновых кислот, хорошо известны и обычно используются в данной области техники. Такие методики хорошо известны и описаны в многочисленных текстах и справочных работах, хорошо известных специалистам в данной области техники. Стандартные методики или их модификации используются для

химического синтеза и химического анализа. Все патенты, патентные заявки, статьи и публикации, упомянутые в настоящем документе, *выше* и *ниже*, настоящим непосредственно включены в настоящий документ посредством ссылки.

Хотя любые подходящие способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем документе, находят применение в практике настоящего изобретения, в настоящем документе описаны некоторые способы и материалы. Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается описанными конкретными методологиями, протоколами и реагентами, поскольку они могут варьироваться в зависимости от контекста, в котором они используются специалистами в данной области техники. Соответственно, термины, определенные непосредственно ниже, более полно описаны со ссылкой на заявку в целом. Все патенты, патентные заявки, статьи и публикации, упомянутые в настоящем документе, *выше* и *ниже*, настоящим непосредственно включены в настоящий документ посредством ссылки.

Кроме того, как используется в настоящем документе, единственное число «а», «an» и «the» включает ссылки во множественном числе, если в контексте явно не указано иное.

Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Таким образом, каждый числовой диапазон, описанный в настоящем документе, предназначен для охвата каждого более узкого числового диапазона, который попадает в такой более широкий числовой диапазон, как если бы все такие более узкие числовые диапазоны были явно указаны в настоящем документе. Также предполагается, что каждое максимальное (или минимальное) числовое ограничение, описанное в настоящем документе, включает каждое более низкое (или более высокое) числовое ограничение, как если бы такое более низкое (или более высокое) числовое ограничение было прямо указано в настоящем документе.

Термин «примерно» означает допустимую ошибку для конкретного значения. В некоторых случаях, «приблизительно» означает в пределах 0,05%, 0,5%, 1,0% или 2,0% заданного диапазона значений. В некоторых случаях, «примерно» означает в пределах 1, 2, 3 или 4 стандартных отклонений от заданного значения. В некоторых случаях, «примерно» включает значения, которые находятся в пределах 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5%, 5%, 5,5%, 6%, 6,5%, 7%, 7,5%, 8%, 8,5%, 9%, 9,5% или 10% от заданного значения.

Кроме того, приведенные в настоящем документе заголовки не являются ограничениями различных аспектов или вариантов осуществления изобретения, которые могут иметь место со ссылкой на заявку в целом. Соответственно, термины, определенные непосредственно ниже, более полно определены применительно к заявке в целом, тем не менее, чтобы облегчить понимание изобретения, ниже определен ряд терминов.

Если не указано иное, нуклеиновые кислоты записываются слева направо в ориентации от 5' к 3'; аминокислотные последовательности записываются слева направо в ориентации от amino к карбокси, соответственно.

Используемый в настоящем документе термин «содержащий» и родственные ему

термины используются в их включительном смысле (т.е. эквивалентны термину «включая» и соответствующим родственным ему терминам).

Номер «ЕС» относится к Номенклатуре ферментов Номенклатурного комитета Международного союза биохимии и молекулярной биологии (NC-IUBMB). Биохимическая классификация IUBMB представляет собой числовую систему классификации ферментов, основанную на катализируемых ими химических реакциях.

«АТСС» относится к Американской коллекции типовых культур, коллекция биорепозитория которой включает гены и штаммы.

«NCBI» относится к Национальному центру биологической информации и представленным в нем базам данных последовательностей.

Используемые в настоящем документе термины «кислая альфа-глюкозидаза», «кислая  $\alpha$ -глюкозидаза», «полипептид кислой альфа-глюкозидазы», «лизосомальная альфа-глюкозидаза» и «GAA» относятся к ферментам в пределах семейства (ЕС 3.2.1.20) ферментов, расщепляющих гликоген, содержащийся в лизосомах. Фермент также иногда называют «альфа-1,4-глюкозидаза»,  $\alpha$ -1,4-глюкозидаза, «кислая мальтаза», «глюкоинвертаза», «глюкозидосахараза», «лизосомальная альфа-глюкозидаза», «лизосомальная  $\alpha$ -глюкозидаза». «мальтаза» или «мальтаза-глюкоамилаза». Одной реакцией, катализируемой ферментом, является гидролиз концевых невосстанавливающих (1-4) связанных остатков альфа-D-глюкозы с высвобождением альфа-D-глюкозы.

Используемый в настоящем документе термин «болезнь Помпе» относится к болезни накопления гликогена типа II, которая представляет собой аутосомно-рецессивное генетическое нарушение, которое приводит к нарушению обмена веществ, характеризующемуся лизосомным накоплением гликогена в скелетных мышцах и других тканях. Она характеризуется возрастом начала, поражением органов, тяжестью и скоростью прогрессирования. Более тяжелой формой является болезнь Помпе с началом в младенчестве (IOPD), которая возникает у младенцев. Другая форма, называемая «болезнью Помпе с поздним началом» (LOPD), возникает у лиц с началом заболевания в возрасте до 12 месяцев, но без кардиомиопатии, связанной с IOPD, и у всех лиц с началом заболевания после 12-месячного возраста. Синонимы болезни Помпе включают «дефицит кислой альфа-глюкозидазы», «дефицит кислой мальтазы», «дефицит GAA», «болезнь накопления гликогена II типа», «GSD II», «GSD2» и «гликогеноз II типа».

«Белок», «полипептид» и «пептид» используются в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения полимера, состоящего, по меньшей мере, из двух аминокислот, ковалентно связанных амидной связью, независимо от длины или посттрансляционной модификации (например, гликозилирования или фосфорилирования).

«Аминокислоты» обозначаются в настоящем документе либо их общеизвестными трехбуквенными обозначениями, либо однобуквенными обозначениями, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB. Нуклеотиды также могут обозначаться их общепринятыми однобуквенными кодами.

Термины «сконструированный», «рекомбинантный», «неприродного происхождения» и «вариант», когда они используются в отношении клетки, полинуклеотида или полипептида, относятся к материалу или материалу, соответствующему природной или нативной форме материала, который был модифицирован таким образом, что не мог бы существовать в природе, или идентичен ему, но произведен или получен из синтетических материалов и/или путем манипуляции с использованием рекомбинантных технологий.

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

«Кодирующая последовательность» относится к той части нуклеиновой кислоты (например, гену), которая кодирует аминокислотную последовательность белка.

Термин «доля (%) идентичности последовательности» используется в настоящем документе для обозначения сравнения между полинуклеотидами и полипептидами и определяется путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, где часть полинуклеотидной или полипептидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (т.е. гэпы) по сравнению с эталонной последовательностью для оптимального выравнивания двух последовательностей. Долю можно рассчитать, определив количество положений, в которых идентичное основание нуклеиновой кислоты или аминокислотный остаток встречается в обеих последовательностях, чтобы получить количество совпадающих позиций, разделив количество совпадающих позиций на общее количество позиций в окне сравнения и умножив результат на 100, чтобы получить долю идентичности последовательности. Альтернативно, доля может быть рассчитана путем определения количества положений, в которых либо идентичное основание нуклеиновой кислоты, либо аминокислотный остаток встречаются в обеих последовательностях, либо основание нуклеиновой кислоты или аминокислотный остаток выровнены с гэпом, чтобы получить количество совпадающих положений, разделив количество совпадающих положений на общее количество положений в окне сравнения и умножив результат на 100, чтобы получить долю идентичности последовательности. Специалисты в данной области техники понимают, что существует множество установленных алгоритмов, доступных для выравнивания двух последовательностей. Можно провести оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения, например, с помощью алгоритма локальной гомологии Смита и Уотермана (Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482 [1981]), с помощью алгоритма выравнивания гомологии Нидлмана и Вунша (Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443 [1970]), методом поиска подобия Пирсона и Липмана (Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 [1988]), компьютерными

реализациями этих алгоритмов (например, GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в программном пакете GCG Wisconsin) или путем визуального осмотра, как это известно в данной области техники. Примеры алгоритмов, подходящих для определения доли идентичности последовательностей и сходства последовательностей, включают, но не ограничены ими, алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны Altschul et al. (See, Altschul et al., J. Mol. Biol., 215: 403-410 [1990]; и Altschul et al., 1977, Nucleic Acids Res., 3389-3402 [1977], соответственно). Программное обеспечение для проведения анализов BLAST находится в открытом доступе на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации. Этот алгоритм включает в себя сначала идентификацию пар последовательностей с высокой оценкой (HSP) путем определения коротких слов длины  $W$  в последовательности запроса, которые либо соответствуют, либо удовлетворяют некоторому положительному пороговому показателю  $T$  при сопоставлении со словом той же длины в последовательности базы данных.  $T$  упоминается как порог оценки соседнего слова (см. Altschul et al., выше). Эти начальные совпадения соседних слов действуют как исходные данные для инициирования поиска, чтобы найти более длинные HSP, содержащие их. Затем совпадения слов расширяются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности настолько, насколько может быть увеличена совокупная оценка выравнивания. Суммарные баллы рассчитываются с использованием, для нуклеотидных последовательностей, параметров  $M$  (поощрительный балл за пару совпадающих остатков; всегда  $>0$ ) и  $N$  (штрафной балл за ошибочно спаренные остатки; всегда  $<0$ ). Для аминокислотных последовательностей используется матрица оценок для расчета суммарной оценки. Расширение совпадений слов в каждом направлении останавливается, когда: суммарный показатель выравнивания падает на величину  $X$  от максимально достигнутого значения; суммарная оценка становится равной нулю или ниже из-за накопления одного или нескольких выравниваний остатков с отрицательной оценкой; или достигнут конец любой последовательности. Параметры алгоритма BLAST  $W$ ,  $T$  и  $X$  определяют чувствительность и скорость выравнивания. Программа BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) использует по умолчанию длину слова ( $W$ ), равную 11, ожидание ( $E$ ), равное 10,  $M=5$ ,  $N=-4$  и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей, программа BLASTP использует по умолчанию длину слова ( $W$ ), равную 3, ожидание ( $E$ ), равное 10, и оценочную матрицу BLOSUM62 (см. Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 [1989]). Типовое определение выравнивания последовательностей и % идентичности последовательностей может использовать программы BESTFIT или GAP в программном пакете GCG Wisconsin Software (Accelrys, Madison WI) с использованием предоставленных параметров по умолчанию.

Используемый в настоящем документе термин «эталонная последовательность» относится к определенной последовательности, используемой в качестве основы для сравнения последовательностей. Эталонная последовательность может быть частью более крупной последовательности, например, сегментом полноразмерного гена или

полипептидной последовательности. Как правило, эталонная последовательность имеет длину, по меньшей мере, 20 нуклеотидных или аминокислотных остатков, по меньшей мере, 25 остатков, по меньшей мере, 50 остатков, по меньшей мере, 100 остатков или полную длину нуклеиновой кислоты или полипептида. Поскольку каждый из двух полинуклеотидов или полипептидов (1) может содержать последовательность (т.е. часть полной последовательности), сходную между двумя последовательностями, и (2) может дополнительно содержать последовательность, отличающуюся между двумя последовательностями, сравнение последовательностей между двумя (или несколькими) полинуклеотидами или полипептидами обычно проводят путем сравнения последовательностей двух полинуклеотидов или полипептидов в «окне сравнения» для идентификации и сравнения локальных областей сходства последовательностей. В некоторых вариантах осуществления, «эталонная последовательность» может быть основана на первичной аминокислотной последовательности, где эталонная последовательность представляет собой последовательность, которая может иметь одно или несколько изменений в первичной последовательности. «Окно сравнения» относится к концептуальному сегменту, состоящему, по меньшей мере, примерно из 20 непрерывных положений нуклеотидов или аминокислотных остатков, в котором последовательность может быть сравнена с эталонной последовательностью, состоящей, по меньшей мере, из 20 непрерывных нуклеотидов или аминокислот, и где часть последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (т.е. гэпы) на 20 процентов или менее по сравнению с эталонной последовательностью (которая не содержит добавления или делеции) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Окно сравнения может быть длиннее, чем 20 непрерывных остатков, и может включать, необязательно, 30, 40, 50, 100 или более длинные окна.

«Соответствует», «ссылка на» или «относительно» при использовании в контексте нумерации данной аминокислотной или полинуклеотидной последовательности относится к нумерации остатков указанной эталонной последовательности, когда данная аминокислотная или полинуклеотидная последовательность сравнивается с эталонной последовательностью. Другими словами, номер остатка или положение остатка данного полимера обозначается по отношению к эталонной последовательности, а не по фактическому числовому положению остатка в данной аминокислотной или полинуклеотидной последовательности. Например, данная аминокислотная последовательность, такая как последовательность сконструированной GAA, может быть выровнена с эталонной последовательностью путем введения гэпов для оптимизации соответствия остатков между двумя последовательностями. В этих случаях, несмотря на наличие гэпов, нумерация остатка в данной аминокислотной или полинуклеотидной последовательности производится относительно эталонной последовательности, с которой он был выровнен.

«Различие аминокислот» или «различие остатков» относится к различию аминокислотного остатка в положении полипептидной последовательности относительно

аминокислотного остатка в соответствующем положении в эталонной последовательности. Положения различных аминокислот обычно обозначаются в настоящем документе как «X<sub>n</sub>», где n относится к соответствующему положению в эталонной последовательности, на которой основано различие остатков. Например, «различие остатков в положении X27 по сравнению с SEQ ID NO: 2» относится к различию аминокислотного остатка в положении полипептида, соответствующем положению 27 SEQ ID NO: 2. Таким образом, если эталонный полипептид из SEQ ID NO: 2 содержит фенилаланин в положении 2, то «различие остатков в положении X27 по сравнению с SEQ ID NO: 2» аминокислотная замена любого остатка, отличного от фенилаланина, в положении полипептида, соответствующем положению 27 SEQ ID NO: 2. В большинстве случаев в настоящем документе, различие остатков конкретных аминокислотных в положении указано как «X<sub>n</sub>Y», где «X<sub>n</sub>» указывает соответствующее положение, как описано выше, и «Y» представляет собой однобуквенный идентификатор аминокислоты, обнаруженной в сконструированном полипептиде (т.е. другой остаток, чем в эталонном полипептиде). В некоторых случаях (например, как показано в таблицах 3-1, 3-2, 4-1, 6-1, 10-1, 10-2, 12-1, 13-1, 13-2, 14-1, 14-2, 15-1, 16-1, 17-1, 17-2, 17-3, 17-4, 17-5, 17-6, 17-7, 17-8 и/или 17-9), в настоящем описании также представлены специфические различия аминокислот, обозначаемые общепринятым обозначением «A<sub>n</sub>B», где A означает однобуквенный идентификатор остатка в эталонной последовательности, «n» означает номер положения остатка в эталонной последовательности, и B означает однобуквенный идентификатор замены остатка в последовательности сконструированного полипептида. В некоторых случаях, полипептид по настоящему изобретению может включать одно или несколько различных аминокислотных остатков по сравнению с эталонной последовательностью, на что указывает список определенных положений, в которых присутствуют различия остатков по сравнению с эталонной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления, где в конкретном положении остатка полипептида может использоваться более одной аминокислоты, различные аминокислотные остатки, которые можно использовать, разделены символом «/» (например, X27P/X27R или X27P/R). В некоторых вариантах осуществления, варианты фермента содержат более одной замены. Эти замены разделены косой чертой для удобства чтения (например, F27P/C944W). В некоторых случаях «X» не предшествует номеру положения в настоящей заявке. Настоящая заявка включает сконструированные полипептидные последовательности, содержащие одно или несколько различных аминокислот, которые включают как консервативные, так и неконсервативные аминокислотные замены.

«Консервативная аминокислотная замена» относится к замене остатка другим остатком, имеющим аналогичную боковую цепь, и, таким образом, обычно включает замену аминокислоты в полипептиде аминокислотами из того же или подобного определенного класса аминокислот. В качестве примера, но не ограничения, аминокислота с алифатической боковой цепью может быть заменена другой

алифатической аминокислотой (например, аланином, валином, лейцином и изолейцином); аминокислота с гидроксильной боковой цепью замещена другой аминокислотой с гидроксильной боковой цепью (например, серином и треонином); аминокислота, имеющая ароматические боковые цепи, замещена другой аминокислотой, имеющей ароматическую боковую цепь (например, фенилаланином, тирозином, триптофаном и гистидином); аминокислота с основной боковой цепью замещена другой аминокислотой с основной боковой цепью (например, лизином и аргинином); аминокислота с кислой боковой цепью замещена другой аминокислотой с кислой боковой цепью (например, аспарагиновой кислотой или глутаминовой кислотой); и/или гидрофобная или гидрофильная аминокислота заменена другой гидрофобной или гидрофильной аминокислотой, соответственно.

«Неконсервативная замена» относится к замене аминокислоты в полипептиде аминокислотой со значительно отличающимися свойствами боковой цепи. Неконсервативные замены могут использовать аминокислоты между определенными группами, а не внутри них, и влияют на (а) структуру пептидного остова в области замены (например, пролин вместо глицина) (b) заряд или гидрофобность, или (с) основную часть боковой цепи. В качестве примера, но не ограничения, типовая неконсервативная замена может представлять собой кислую аминокислоту, замещенную основной или алифатической аминокислотой; ароматическую аминокислоту, замещенную малой аминокислотой; и гидрофильную аминокислоту, замещенную гидрофобной аминокислотой.

«Делеция» относится к модификации полипептида путем удаления одной или нескольких аминокислот из эталонного полипептида. Делеции могут включать удаление 1 или более аминокислот, 2 или более аминокислот, 5 или более аминокислот, 10 или более аминокислот, 15 или более аминокислот или 20 или более аминокислот, до 10% от общего количества аминокислот, или до 20% от общего количества аминокислот, составляющих эталонный фермент, при сохранении ферментативной активности и/или сохранении улучшенных свойств сконструированного фермента. Делеции могут быть направлены на внутренние участки и/или концевые участки полипептида. В различных вариантах осуществления, делеция может включать непрерывный сегмент или может быть прерывистой.

«Вставка» относится к модификации полипептида путем добавления одной или нескольких аминокислот из эталонного полипептида. Вставки могут быть во внутренних частях полипептида или на карбокси или амино конце. Вставки, используемые в настоящем документе, включают слитые белки, как известно в данной области техники. Вставка может быть непрерывным сегментом аминокислот или разделена одной или несколькими аминокислотами в природном полипептиде.

«Функциональный фрагмент» или «биологически активный фрагмент», используемые в настоящем документе взаимозаменяемо, относятся к полипептиду, который имеет аминоконцевую(ые) и/или карбоксиконцевую(ые) делецию(и) и/или



внутренние делеции, но где остальная аминокислотная последовательность идентична в соответствующих положениях в последовательности, с которой он сравнивается (например, полноразмерная сконструированная GAA по настоящему изобретению), и который сохраняет по существу всю активность полноразмерного полипептида.

«Выделенный полипептид» относится к полипептиду, который в значительной степени отделен от других примесей, которые естественным образом сопровождают его (например, белок, липиды и полинуклеотиды). Этот термин охватывает полипептиды, которые были удалены или очищены от их природного окружения или системы экспрессии (например, клетки-хозяина или синтеза *in vitro*). Рекombинантные полипептиды GAA могут находиться внутри клетки, присутствовать в клеточной среде или могут быть получены в различных формах, таких как лизаты или выделенные препараты. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, рекombинантные полипептиды GAA могут представлять собой выделенный полипептид.

«По существу чистый полипептид» относится к композиции, в которой виды полипептидов являются преобладающими видами (т.е. в молярном или весовом отношении они преобладают над любыми другими отдельными видами макромолекул в композиции) и, как правило, представляют собой по существу очищенную композицию, когда рассматриваемые виды включают, по меньшей мере, примерно 50 процентов макромолекулярных видов, присутствующих в молях или % массовых. Как правило, по существу чистая композиция GAA включает примерно 60% или более, примерно 70% или более, примерно 80% или более, примерно 90% или более, примерно 95% или более и примерно 98% или более всех макромолекулярных частиц в молях или % массовых, присутствующих в композиции. В некоторых вариантах осуществления, рассматриваемые виды очищают до по существу гомогенности (т.е. загрязняющие виды не могут быть обнаружены в композиции с помощью обычных методов обнаружения), где композиция состоит по существу из одного вида макромолекул. Растворители, малые молекулы (<500 дальтон) и элементарные ионы не считаются макромолекулярными соединениями. В некоторых вариантах осуществления, выделенные рекombинантные полипептиды GAA представляют собой по существу чистые полипептидные композиции.

«Улучшенное ферментативное свойство» относится к сконструированному полипептиду GAA, который демонстрирует улучшение любого ферментативного свойства по сравнению с эталонным полипептидом GAA и/или полипептидом GAA дикого типа или другим сконструированным полипептидом GAA. Улучшенные свойства включают, но не ограничены ими, такие свойства, как повышенная экспрессия белка, повышенная термоактивность, повышенная термостабильность, повышенная рН-активность, повышенная стабильность, повышенная ферментативная активность, повышенная специфичность или аффинность к субстрату, повышенная специфическая активность, повышенная резистентность к ингибированию субстрата или конечного продукта, повышенная химическая стабильность, улучшенная хемоселективность, улучшенная стабильность в растворителях, повышенная толерантность к кислому, нейтральному или

щелочному рН, повышенная толерантность к протеолитической активности (т.е. сниженная чувствительность к протеолизу), сниженная агрегация, повышенная растворимость, сниженная иммуногенность, улучшенная пост-трансляционная модификация (например, гликозилирование), измененный профиль температуры, повышенная стабильность лизосом и т. д.

«Повышенная ферментативная активность» или «повышенная каталитическая активность» относится к улучшенному свойству сконструированных полипептидов GAA, которое может быть представлено увеличением удельной активности (например, продуцирования продукта/времени/массы белка) или увеличением доли превращения субстрата в продукт (например, доли превращения исходного количества субстрата в продукт за определенный период времени с использованием определенного количества GAA) по сравнению с эталонным ферментом GAA. Примеры способов определения ферментативной активности приведены в примерах. Любое свойство, относящееся к ферментативной активности, может быть затронуто, включая классические ферментативные свойства  $K_m$ ,  $V_{max}$  или  $k_{cat}$ , изменение которых может привести к повышению ферментативной активности. Улучшение ферментативной активности может быть от примерно 1,1-кратного ферментативной активности соответствующего фермента дикого типа, до 2-кратного, 5-кратного, 10-кратного, 20-кратного, 25-кратного, 50-кратного, 75-кратного, 100-кратного, 150-кратного, 200-кратного или более ферментативной активности, чем у встречающейся в природе GAA или другой генетически сконструированной GAA, из которой были получены полипептиды GAA.

В некоторых вариантах осуществления, сконструированные полипептиды GAA имеют  $k_{cat}$ , по меньшей мере, 0,1/с, по меньшей мере, 0,5/с, по меньшей мере, 1,0/с, по меньшей мере, 5,0/с, по меньшей мере, 10,0/с и в некоторых предпочтительных вариантах, более 10,0/с. В некоторых вариантах осуществления,  $K_m$  находится в диапазоне от примерно 1 мкМ до примерно 5 мМ; в диапазоне от примерно 5 мкМ до примерно 10 мМ; в диапазоне от примерно 30 мкМ до примерно 30 мМ; или в диапазоне от примерно 50 мкМ до примерно 50 мМ. В некоторых конкретных вариантах осуществления, сконструированный фермент GAA демонстрирует улучшенную ферментативную активность после воздействия определенных условий в диапазоне от 1,5 до 10 раз, от 1,5 до 25 раз, от 1,5 до 50 раз, от 1,5 до 100 раз или больше, чем у эталонного фермента GAA. (например, GAA дикого типа или любой другой эталонной GAA, такой как SEQ ID NO: 2, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 946, 1956, 2496, 2880 и/или 3104).

Активность GAA можно измерить любым подходящим способом, известным в данной области техники (например, стандартными анализами, такими как мониторинг изменений спектрофотометрических свойств реагентов или продуктов). В некоторых вариантах осуществления, количество полученных продуктов можно измерить с помощью разделения высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в сочетании с УФ-поглощением или флуоресцентным определением. В некоторых вариантах осуществления, количество полученного продукта можно измерить путем мониторинга

флуоресценции (Возб. 355 нм, исп. 460 нм) после гидролиза молекулы 4-метилумбеллиферил-альфа-D-глюкопиранозид (4-MUGlu). Сравнения ферментативной активности проводят с использованием определенного препарата фермента, определенного анализа в заданных условиях и одного или нескольких определенных субстратов, как подробно описано далее в настоящем документе. Как правило, при сравнении лизатов определяют количество клеток и количество анализируемого белка, а также использование идентичных систем экспрессии и идентичных клеток-хозяев для минимизации различий в количестве фермента, продуцируемого клетками-хозяевами и присутствующего в лизатах.

Термин «улучшенная толерантность к кислому pH» означает, что рекомбинантная GAA по изобретению будет иметь повышенную стабильность (более высокую сохраняемую активность примерно при pH 4,8 после воздействия кислого pH в течение определенного периода времени (например, 1 часа, до 24 часов)) по сравнению с эталонной GAA или другим ферментом.

Термин «улучшенная толерантность к нейтральному pH» означает, что рекомбинантная GAA по изобретению будет иметь повышенную стабильность (более высокую сохраняемую активность примерно при pH 7 после воздействия нейтрального pH в течение определенного периода времени (например, 1 часа, до 24 часов)) по сравнению с эталонной GAA или другим ферментом.

Термин «улучшенное клеточное поглощение» означает, что рекомбинантная GAA, представленная в настоящем документе, демонстрирует повышенный эндоцитоз в клетках по сравнению с эталонной GAA (включая GAA дикого типа) или другим ферментом. В некоторых вариантах осуществления, клетки представляют собой культивируемые клетки пациента с Помпе (более высокая сохраняющаяся внутриклеточная активность после инкубации с культивируемыми клетками в течение определенного периода времени по сравнению с эталонной GAA или другим ферментом). В некоторых дополнительных вариантах осуществления, рекомбинантная GAA, представленная в настоящем документе, проявляет более высокую внутриклеточную активность в отношении культивируемых клеток в течение определенного периода времени по сравнению с эталонной GAA (включая GAA дикого типа) или другим ферментом. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, период времени составляет примерно 4 часов, в то время как в некоторых других вариантах осуществления, период времени составляет менее 4 часов (например, 1, 2 или 3 часа), и в некоторых альтернативных вариантах осуществления, период времени составляет более 4 часов (например, 5, 6, 7, 8 или более часов).

Термины «сниженная иммуногенность» и «уменьшенная иммуногенность» означают, что представленная в настоящем документе рекомбинантная GAA индуцирует сниженный иммунный ответ по сравнению с GAA дикого типа или другой эталонной GAA.

Используемый в настоящем документе термин «физиологический pH» означает диапазон pH, обычно обнаруживаемый в крови субъекта (например, человека).

Термин «базовый рН» (например, используемый в отношении улучшенной стабильности в основных условиях рН или повышенной стабильности при базовом рН) означает диапазон рН примерно от 7 до 11.

Термин «кислый рН» (например, используемый в отношении улучшенной стабильности в условиях кислого рН или повышенной стабильности при кислом рН) означает диапазон рН примерно от 1,5 до 4,5.

«Превращение» относится к ферментативному превращению (или биотрансформации) субстрата(ов) в соответствующий(ие) продукт(ы). «Доля превращения» относится к доле субстрата, который превращается в продукт в течение периода времени при определенных условиях. Таким образом, «ферментативная активность» или «активность» полипептида GAA может быть выражена как «доля превращения» субстрата в продукт за определенный период времени.

«Жесткость гибридизации» относится к условиям гибридизации, таким как условия промывки, при гибридизации нуклеиновых кислот. Как правило, реакции гибридизации проводят в условиях более низкой жесткости с последующими промывками различной, но более строгой жесткости. Термин «умеренно жесткая гибридизация» относится к условиям, которые позволяют ДНК-мишени связываться с комплементарной нуклеиновой кислотой, которая имеет примерно 60% идентичности, предпочтительно, примерно 75% идентичности, примерно 85% идентичности с ДНК-мишенью, с идентичностью более чем примерно 90% к полинуклеотиду-мишени. Примерами умеренно жестких условий являются условия, эквивалентные гибридизации в 50% формамиде, 5x растворе Денхарта, 5xSSPE, 0,2% SDS при 42°C с последующей промывкой в 0,2xSSPE, 0,2% SDS, при 42°C. «Жесткая гибридизация» обычно относится к условиям, которые примерно на 10°C или меньше отличаются от температуры термического плавления  $T_m$ , определенной в условиях раствора для определенной полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления, условия высокой жесткости относятся к условиям, которые позволяют гибридизовать только те последовательности нуклеиновых кислот, которые образуют стабильные гибриды в 0,018 М NaCl при 65°C (т.е. если гибрид нестабилен в 0,018 М NaCl при 65°C, он не будет стабильным в условиях высокой жесткости, как рассматривается в настоящем документе). Условия высокой жесткости могут быть обеспечены, например, путем гибридизации в условиях, эквивалентных 50% формамиду, 5x раствору Денхарта, 5xSSPE, 0,2% SDS при 42°C с последующей промывкой в 0,1xSSPE и 0,1% SDS при 65°C. Другим условием высокой жесткости является гибридизация в условиях, эквивалентных гибридизации в 5X SSC, содержащем 0,1% (масс.:об.) SDS, при 65°C и промывке в 0,1x SSC, содержащем 0,1% SDS, при 65°C. Другие условия гибридизации высокой жесткости, а также условия умеренной жесткости описаны в цитированных выше ссылках.

«Оптимизация по кодону» относится к изменениям кодонов полинуклеотида, кодирующего белок, тех, которые предпочтительно используются в конкретном организме, так что кодируемый белок более эффективно экспрессируется в

представляющем интересе организме. Хотя генетический код вырожден в том смысле, что большинство аминокислот представлены несколькими кодонами, называемыми «синонимами» или «синонимичными» кодонами, хорошо известно, что использование кодонов конкретными организмами неслучайно и смещено в сторону определенных триплетов кодонов. Это смещение использования кодонов может быть выше по отношению к данному гену, генам с общей функцией или наследственным происхождением, белкам с высокой экспрессией по сравнению с белками с низким числом копий и агрегатам кодирующих белок областей генома организма. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотиды, кодирующие ферменты GAA, могут быть оптимизированы по кодонам для оптимального продуцирования из организма-хозяина, выбранного для экспрессии.

«Контрольная последовательность» относится в настоящем документе к включению всех компонентов, которые необходимы или выгодны для экспрессии полинуклеотида и/или полипептида по настоящей заявке. Каждая контрольная последовательность может быть нативной или чужеродной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. Такие контрольные последовательности включают, но не ограничены ими, лидерную последовательность, последовательность полиаденилирования, последовательность пропептида, последовательность промотора, последовательность сигнального пептида, последовательность инициации и терминатор транскрипции. Как минимум, контрольные последовательности включают промотор и стоп-сигналы транскрипции и трансляции. Контрольные последовательности могут быть обеспечены линкерами с целью введения специфических сайтов рестрикции, облегчающих лигирование контрольных последовательностей с кодирующим участком последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид.

«Функционально связанный» определяется в настоящем документе как конфигурация, в которой надлежащим образом размещена контрольная последовательность (т.е. в функциональной взаимосвязи) в положении относительно представляющего интереса полинуклеотида, так что контрольная последовательность направляет или регулирует экспрессию полинуклеотида и /или представляющего интереса полипептида.

«Промоторная последовательность» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая распознается клеткой-хозяином для экспрессии представляющего интереса полинуклеотида, такой как кодирующая последовательность. Промоторная последовательность содержит последовательности контроля транскрипции, которые опосредуют экспрессию представляющего интереса полинуклеотида. Промотор может представлять собой любую последовательность нуклеиновой кислоты, которая проявляет транскрипционную активность в выбранной клетке-хозяине, включая мутантные, усеченные и гибридные промоторы, и может быть получена из генов, кодирующих внеклеточные или внутриклеточные полипептиды, гомологичные или гетерологичные клетке-хозяину.

«Подходящие условия реакции» относятся к таким условиям в реакционном растворе для ферментативного превращения (например, диапазоны загрузки фермента, загрузки субстрата, температуры, pH, буферов, соразтворителей и т. д.), при которых полипептид GAA по настоящей заявке способен превращать субстрат в желаемый продукт. Типовые «подходящие условия реакции» представлены в настоящей заявке и проиллюстрированы примерами. «Загрузка», такая как «загрузка соединения» или «загрузка фермента», относится к концентрации или количеству компонента в реакционной смеси в начале реакции. «Субстрат» в контексте процесса ферментативной реакции превращения относится к соединению или молекуле, на которую действует полипептид GAA. «Продукт» в контексте процесса ферментативной конверсии относится к соединению или молекуле, полученной в результате действия полипептида GAA на субстрат.

Используемый в настоящем документе термин «культивирование» относится к выращиванию популяции микробных клеток в любых подходящих условиях (например, с использованием жидкой, гелевой или твердой среды).

Рекомбинантные полипептиды могут быть получены с использованием любых подходящих способов, известных в данной области техники. Гены, кодирующие представляющий интерес полипептид дикого типа, могут быть клонированы в векторах, таких как плазмиды, и экспрессированы в желаемых хозяевах, таких как *E. coli*, *S. cerevisiae* и т.д. Варианты рекомбинантных полипептидов могут быть получены различными способами, известными в данной области техники. Действительно, существует широкий спектр различных методов мутагенеза, хорошо известных специалистам в данной области техники. Кроме того, наборы для мутагенеза также доступны от многих коммерческих поставщиков в области молекулярной биологии. Доступны способы осуществления специфических замен в определенных аминокислотах (сайт-направленные), специфических или случайных мутаций в локализованной области гена (региоспецифических) или случайного мутагенеза по всему гену (*например*, мутагенез с насыщением). Специалистам в данной области техники известны многочисленные подходящие способы получения вариантов ферментов, включая, но не ограничиваясь ими, сайт-направленный мутагенез одноцепочечной ДНК или двухцепочечной ДНК с использованием ПЦР, кассетный мутагенез, генный синтез, ПЦР сниженной точности, шаффлинг и химический мутагенез с насыщением или любой другой подходящий способ, известный в данной области техники. Неограничивающие примеры способов, используемых для конструирования ДНК и белков, представлены в следующих патентах: патент США № 6,117,679; патент США № 6,420,175; патент США № 6,376,246; патент США № 6,586,182; патент США № 7,747,391; патент США № 7,747,393; патент США № 7,783,428; и патент США № 8,383,346. После получения вариантов, их можно подвергнуть скринингу на любое желаемое свойство (например, высокую или повышенную активность, или низкую или пониженную активность, повышенную термическую активность, повышенную термическую стабильность и/или

стабильность при кислом рН и т. д.). В некоторых вариантах осуществления, находят применение «рекомбинантные полипептиды GAA» (также называемые в настоящем документе «сконструированными полипептидами GAA», «вариантами ферментов GAA» и «вариантами GAA»).

Используемый в настоящем документе термин «вектор» представляет собой конструкцию ДНК для введения последовательности ДНК в клетку. В некоторых вариантах осуществления, вектор представляет собой вектор экспрессии, который функционально связан с подходящей контрольной последовательностью, способной влиять на экспрессию в подходящем хозяине полипептида, кодированного в последовательности ДНК. В некоторых вариантах осуществления, «вектор экспрессии» имеет промоторную последовательность, функционально связанную с последовательностью ДНК (например, трансгеном) для управления экспрессией в клетке-хозяине, и в некоторых вариантах осуществления, он также содержит последовательность терминатора транскрипции. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, предложенный в настоящем документе вектор рДН находит применение.

Используемый в настоящем документе термин «вектор для генной терапии» относится к наполнителям или носителям, подходящим для доставки полинуклеотидных последовательностей в клетки. В некоторых вариантах осуществления, векторы инкапсулируют гены (например, терапевтические гены) или полинуклеотидные последовательности для доставки в клетки или ткани, включая, помимо прочего, аденовирус (AV), аденоассоциированный вирус (AAV), лентивирус (LV) и не вирусные векторы, такие как липосомы. Не предполагается, что настоящее изобретение ограничивается каким-либо конкретным вектором для генной терапии, поскольку любой носитель, подходящий для данных условий, находит применение. Вектор для генной терапии может быть предназначен для доставки генов конкретному виду или хозяину или может найти более широкое применение.

Используемый в настоящем документе термин «экспрессия» включает любую стадию, связанную с продуцированием полипептида, включая, но не ограничиваясь ими, транскрипцию, посттранскрипционную модификацию, трансляцию и посттрансляционную модификацию. В некоторых вариантах осуществления, термин также включает секрецию полипептида из клетки.

Используемый в настоящем документе термин «продуцирует» относится к продуцированию белков и/или других соединений клетками. Предполагается, что этот термин охватывает любую стадию, связанную с продуцированием полипептидов, включая, но не ограничиваясь ими, транскрипцию, посттранскрипционную модификацию, трансляцию и посттрансляционную модификацию. В некоторых вариантах осуществления, термин также включает секрецию полипептида из клетки.

Используемая в настоящем документе аминокислотная или нуклеотидная последовательность (например, промоторная последовательность, сигнальный пептид, терминаторная последовательность и т. д.) является «гетерологичной» другой

последовательности, с которой она функционально связана, если две последовательности не связаны в природе.

Используемые в настоящем документе термины «клетка-хозяин» и «штамм-хозяин» относятся к подходящим хозяевам для векторов экспрессии, содержащих представленную в настоящем документе ДНК (например, полинуклеотиды, кодирующие варианты GAA). В некоторых вариантах осуществления, клетки-хозяева представляют собой прокариотические или эукариотические клетки, которые были трансформированы или трансфицированы векторами, сконструированными с использованием способов рекомбинантной ДНК, известных в данной области техники.

Термин «аналог» означает полипептид, имеющий более 70% идентичность последовательности, но менее 100% идентичность последовательности (например, более 75%, 78%, 80%, 83%, 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичность последовательности) с эталонным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления, термин «аналог» относится к полипептидам, которые содержат один или несколько не встречающихся в природе аминокислотных остатков, включая, но не ограничиваясь ими, гомоаргинин, орнитин и норвалин, а также встречающиеся в природе аминокислоты. В некоторых вариантах реализации, аналоги также включают один или несколько D-аминокислотных остатков и непептидные связи между двумя или несколькими аминокислотными остатками.

Термин «терапевтический» относится к соединению, вводимому субъекту, у которого проявляются признаки или симптомы патологии, обладающему полезными или желательными медицинскими эффектами.

Термин «фармацевтическая композиция» относится к композиции, подходящей для фармацевтического применения у субъекта-млекопитающего (например, человека), содержащей фармацевтически эффективное количество сконструированного полипептида GAA, охватываемого изобретением, и приемлемый носитель.

Термин «генная терапия» относится к доставке гена, полидезоксирибонуклеотидна или полинуклеотидной последовательности(ей) с вектором для генной терапии в клетки или ткани для модификации этих клеток или тканей для лечения или профилактики заболевания. Генная терапия может включать замену мутировавшего гена, вызывающего заболевание, здоровой копией гена или инактивацию или «выключение» мутантного гена, который функционирует неправильно. В некоторых вариантах осуществления, генная терапия используется для лечения заболеваний у пациентов.

Термин «мРНК-терапия» относится к доставке полирибонуклеотидной последовательности мРНК в клетки или ткани для модификации этих клеток или тканей для лечения или профилактики заболевания. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотидные последовательности мРНК для доставки в клетки или ткани составлены, например, но не ограничиваясь ими, в липосомах. В некоторых вариантах осуществления, мРНК терапия используется для лечения заболевания у пациентов.

Термин «клеточная терапия» относится к доставке живых клеток, которые были



модифицированы экзогенно, пациентам для предоставления отсутствующего гена для лечения или профилактики заболевания. Затем модифицированные клетки повторно вводятся в организм.

Термин «эффективное количество» означает количество, достаточное для получения желаемого результата. Специалист в данной области техники может определить эффективное количество с помощью рутинных экспериментов.

Термины «выделенный» и «очищенный» используются для обозначения молекулы (например, выделенной нуклеиновой кислоты, полипептида и т. д.) или другого компонента, который удален, по меньшей мере, из одного другого компонента, с которым он связан в природе. Термин «очищенный» не требует абсолютной чистоты, скорее, это относительное определение.

Термин «субъект» охватывает млекопитающих, таких как люди, приматы, отличные от человека, домашний скот, домашние животные и лабораторные животные (например, грызуны и зайцеобразные). Предполагается, что этот термин охватывает как женщин, так и мужчин.

Используемый в настоящем документе термин «пациент» означает любого субъекта, который проходит обследование, лечится или страдает заболеванием.

Термин «младенец» относится к ребенку в период от первого месяца после рождения до приблизительно одного (1) года. Используемый в настоящем документе термин «новорожденный» относится к ребенку в период от рождения до 28 дня жизни. Термин «недоношенный младенец» относится к младенцу, рожденному после двадцатой полной недели беременности, но до полного срока, обычно с массой тела от ~500 до ~2499 граммов при рождении. «Младенец с очень низкой массой тела при рождении» представляет собой младенца с массой тела менее 1500 г при рождении.

Используемый в настоящем документе термин «ребенок» относится к лицу, не достигшему совершеннолетия для согласия на лечение или исследовательские процедуры. В некоторых вариантах осуществления, термин относится к человеку в период между рождением и подростковым возрастом.

Используемый в настоящем документе термин «взрослый» относится к лицу, достигшему совершеннолетия в соответствующей юрисдикции (например, 18 лет в США). В некоторых вариантах осуществления, термин относится к любому полностью выращенному зрелому организму. В некоторых вариантах осуществления, термин «молодой взрослый» относится к лицу моложе 18 лет, но достигшему половой зрелости.

Используемые в настоящем документе термины «композиция» и «состав» охватывают продукты, содержащие, по меньшей мере, одну модифицированную ГАА по настоящему изобретению, предназначенные для любого подходящего применения (например, фармацевтические композиции, диетические/пищевые добавки, корма и т. д.).

Термины «введение» и «вводить» композицию означают предоставление композиции по настоящему изобретению субъекту (например, человеку, страдающему от последствий болезни Помпе).

Термин «носитель» при использовании в отношении фармацевтической композиции означает любой из стандартных фармацевтических носителей, буферов и эксципиентов, таких как стабилизаторы, консерванты и адъюванты.

Термин «фармацевтически приемлемый» означает материал, который можно вводить субъекту, не вызывая каких-либо нежелательных биологических эффектов или вредного взаимодействия с любым из компонентов, в которых он содержится, и который обладает желаемой биологической активностью.

Используемый в настоящем документе термин «эксципиент» относится к любой фармацевтически приемлемой добавке, носителю, разбавителю, адъюванту или другому ингредиенту, отличному от активного фармацевтического ингредиента (API; например, сконструированных полипептидов GAA по настоящему изобретению). Эксципиенты обычно включаются в состав и/или для целей введения.

Термин «терапевтически эффективное количество» при использовании в отношении симптомов заболевания/состояния относится к количеству и/или концентрации соединения (например, сконструированных полипептидов GAA), которое улучшает, ослабляет или устраняет один или несколько симптомов заболевания/состояния, или предотвращает или отсрочивает появление симптома(ов).

Термин «терапевтически эффективное количество» при использовании в отношении заболевания/состояния относится к количеству и/или концентрации композиции (например, сконструированных полипептидов GAA), которое облегчает, ослабляет или устраняет заболевание/состояние. В некоторых вариантах осуществления, термин используется в отношении количества композиции, которое вызывает биологический (например, медицинский) ответ ткани, системы или животного, который требуется исследователю, врачу, ветеринару или другому клиницисту.

Предполагается, что термины «лечение», «лечить» и «лечение» охватывают как превентивное (например, профилактическое), так и паллиативное лечение.

#### **Сконструированные полипептиды GAA:**

В некоторых вариантах осуществления, сконструированные полипептиды GAA получают путем культивирования микроорганизма, содержащего, по меньшей мере, одну полинуклеотидную последовательность, кодирующую, по меньшей мере, один сконструированный полипептид GAA, в условиях, благоприятных для получения сконструированного(ых) полипептида(ов) GAA. В некоторых вариантах осуществления, сконструированный полипептид GAA выделяют из полученной культуральной среды и/или клеток.

Настоящее изобретение относится к типовым сконструированным полипептидам GAA, обладающим активностью GAA. В примерах представлены таблицы, показывающие информацию о структуре последовательности, коррелирующую конкретные особенности аминокислотной последовательности с функциональной активностью сконструированных полипептидов GAA. Эта информация о корреляции структура-функция представлена в виде различий конкретных аминокислотных остатков по сравнению с эталонным

сконструированным полипептидом, как указано в примерах. Кроме того, в примерах представлены экспериментально определенные данные об активности типовых сконструированных полипептидов GAA.

**Полинуклеотиды, кодирующие сконструированные полипептиды, векторы экспрессии и клетки-хозяева:**

Настоящее изобретение предлагает полинуклеотиды, кодирующие описанные в настоящем документе сконструированные полипептиды GAA. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотиды функционально связаны с одной или несколькими гетерологичными регуляторными последовательностями, которые контролируют экспрессию гена, для создания рекомбинантного полинуклеотида, способного экспрессировать полипептид. Конструкции экспрессии, содержащие гетерологичный полинуклеотид, кодирующий сконструированные полипептиды GAA, могут быть введены в соответствующие клетки-хозяева для экспрессии соответствующего полипептида GAA.

Как будет очевидно специалисту в данной области техники, доступность белковой последовательности и знание кодонов, соответствующих различным аминокислотам, обеспечивают описание всех полинуклеотидов, способных кодировать рассматриваемые полипептиды. Вырожденность генетического кода, когда одни и те же аминокислоты кодируются альтернативными или синонимичными кодонами, позволяет получить чрезвычайно большое количество нуклеиновых кислот, каждая из которых кодирует сконструированный полипептид GAA. Таким образом, обладая знаниями о конкретной аминокислотной последовательности, специалисты в данной области техники могут получить любое количество различных нуклеиновых кислот путем простой модификации последовательности одного или нескольких кодонов таким образом, чтобы не изменить аминокислотную последовательность белка. В этом отношении, настоящее изобретение конкретно рассматривает каждую и каждую возможную вариацию полинуклеотидов, которая может быть получена, кодируя полипептиды, описанные в настоящем документе, путем выбора комбинаций на основе возможного выбора кодонов, и все такие вариации следует считать конкретно описанными для любого полипептида, описанного в настоящем документе, включая варианты, представленные в таблицах 3-1, 3-2, 4-1, 6-1, 10-1, 10-2, 12-1, 13-1, 13-2, 14-1, 14-2, 15-1, 16-1, 17-1, 17-2, 17-3, 17-4, 17-5, 17-6, 17-7, 17-8 и/или 17-9, а также SEQ ID NO: 2, 8 и/или 14.

В различных вариантах осуществления, кодоны предпочтительно выбирают так, чтобы они соответствовали клетке-хозяину, в которой продуцируется белок. Например, предпочтительные кодоны, используемые в бактериях, используются для экспрессии в бактериях. Следовательно, кодон-оптимизированные полинуклеотиды, кодирующие сконструированные полипептиды GAA, содержат предпочтительные кодоны примерно в 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или более чем в 90% положений кодонов полноразмерной кодирующей области.

В некоторых вариантах осуществления, как описано выше, полинуклеотид кодирует сконструированный полипептид, обладающий активностью GAA со свойствами,

описанными в настоящем документе, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность эталонной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 946, 1956, 2496, 2880 и/или 3104, или аминокислотной последовательности любого варианта, как описано в таблицах 3-1, 3-2, 4-1, 6-1, 10-1, 10-2, 12-1, 13-1, 13-2, 14-1, 14-2, 15-1, 16-1, 17-1, 17-2, 17-3, 17-4, 17-5, 17-6, 17-7, 17-8 и/или 17-9, и одно или несколько различных остатков по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 2, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 946, 1956, 2496, 2880 и/или 3104, или аминокислотная последовательностью любого варианта, как описано в таблицах 3-1, 3-2, 4-1, 6-1, 10-1, 10-2, 12-1, 13-1, 13-2, 14-1, 14-2, 15-1, 16-1, 17-1, 17-2, 17-3, 17-4, 17-5, 17-6, 17-7, 17-8 и/или 17-9 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более положений аминокислотных остатков). В некоторых вариантах осуществления, эталонная последовательность выбрана из SEQ ID NO: 2, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 946, 1956, 2496, 2880 и/или 3104.

Настоящее изобретение предлагает рекомбинантные кислые альфа-глюкозидазы и/или биологически активные фрагменты рекомбинантных кислых альфа-глюкозидаз, содержащие аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, примерно 70%, по меньшей мере, примерно 75%, по меньшей мере, примерно 80%, по меньшей мере, примерно 85%, по меньшей мере, примерно 90%, по меньшей мере, примерно 91%, по меньшей мере, примерно 92%, по меньшей мере, примерно 93%, по меньшей мере, примерно 94%, по меньшей мере, примерно 95%, по меньшей мере, примерно 96%, по меньшей мере, примерно 97%, по меньшей мере, примерно 98% или по меньшей мере, примерно 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2. Настоящее изобретение предлагает рекомбинантные кислые альфа-глюкозидазы и/или биологически активные фрагменты рекомбинантных кислых альфа-глюкозидаз, содержащие аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 93%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряду положений, выбранных из 27, 27/944, 28, 29/478, 30, 88, 107, 109, 109/842, 110, 113, 135, 137, 138, 148, 150, 247, 274, 276, 278, 375, 403, 414, 418, 418/499, 421, 426, 437, 444, 455, 463, 471, 471/478, 476, 489, 527, 547, 581, 610, 642, 668, 670, 692, 725/732, 750, 753, 786, 820, 862, 871, 895, 897, 930, 934 и 944, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из 27P, 27P/944W, 27R, 28P, 28R, 28S, 29T/478T, 30G, 30K, 30T, 88G, 88S, 107G, 107P, 109G/842E, 109P, 110G, 110L, 113S, 135A, 135Q, 137P, 138A, 148G, 148Y, 150G, 247R, 274G, 276F, 276Y, 278A, 278G,

375E, 403W, 414P, 418E/499R, 418R, 421S, 426R, 437S, 444T, 455V, 463A, 471Q/478S, 471S, 476A, 476H, 489R, 527R, 547G, 581G, 581T, 610A, 610G, 610S, 642M, 642Q, 642S, 668H, 670N, 692Q, 725N/732I, 750P, 753T, 786P, 786Y, 820E, 862G, 871E, 895R, 897V, 930R, 934R, 944G и 944R, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из F27P, F27P/C944W, F27R, L28P, L28R, L28S, L29T/A478T, V30G, V30K, V30T, K88G, K88S, Q107G, Q107P, L109G/G842E, L109P, Q110G, Q110L, Q113S, S135A, S135Q, E137P, M138A, T148G, T148Y, T150G, Q247R, D274G, A276F, A276Y, T278A, T278G, I375E, R403W, R414P, A418E/H499R, A418R, Q421S, G426R, A437S, A444T, R455V, E463A, K471Q/A478S, K471S, S476A, S476H, A489R, N527R, A547G, K581G, K581T, W610A, W610G, W610S, L642M, L642Q, L642S, S668H, L670N, T692Q, K725N/V732I, A750P, A753T, R786P, R786Y, G820E, R862G, L871E, K895R, T897V, C930R, L934R, C944G и C944R, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в выбранном положении или ряде положений из 29/218/240/668/700/744/869, 29/218/240/700/869, 29/240/596/668/700/744/869, 29/240/596/668/869, 36/106/150/218/527/750/883/894, 106/112/150/218/414/527/793/883, 106/150/169/218/414/486/527/750/894, 106/150/169/218/414/486/527/894, 106/150/169/218/414/486/749/793/883/894, 106/150/169/218/414/486/750/793/883/894, 106/150/169/218/414/486/793/883, 106/150/169/218/414/486/894, 106/150/169/218/414/749/750/793/883, 106/150/169/218/414/749/793, 106/150/169/218/414/749/793/883, 106/150/169/218/486/527/749/793/894, 106/150/169/218/486/749/883, 106/150/169/218/486/883, 106/150/169/218/749/800, 106/150/169/414/486/749/750/883, 106/150/169/527/749/793/883, 106/150/169/749/793/883/894, 106/150/218/331/414/486/527/733/749/793, 106/150/218/414/486/642/750/793/883, 106/150/218/414/486/750/793/894, 106/150/218/414/527/749/750/883, 106/150/218/414/527/749/793/883/894, 106/150/218/414/749/750/793/883/894, 106/150/218/414/749/793/883, 106/150/218/486/527/749/894, 106/150/218/486/793/883, 106/150/218/527/749/750/793, 106/150/218/527/793/894, 106/150/218/749/750/793, 106/150/218/793, 106/150/218/793/894, 106/150/245/793/883/894, 106/150/414/749/750/793/894, 106/150/414/749/793/894, 106/150/486/527/750/793, 106/150/486/749/793/883/894, 106/150/749/793/883, 106/169/185/218/414/749/750/793, 106/191/280/402/414/444/727, 106/191/414/444/522/928/944, 106/191/414/489/928/944, 106/280/402/414/444/489/727/944, 150/169/218/414/527/793, 150/218/414/486/749/750, 150/218/414/486/750/793, 150/218/414/486/750/793/883, 150/218/414/749/750/793/894, 150/218/414/749/793, 150/218/527/749/793, 150/218/749/750/793, 150/218/749/793, 150/414/486/527/750/894, 150/414/486/749/750/793, 150/486/750/883/894, 169/486/750/793/883, 180/275/402/518/547/610/638/669/671, 180/402/431/507/547/610/669/671/793,

180/402/507/547/610/671, 191/280/402/414/444/465/842/928,  
 191/280/402/414/444/489/500/944, 191/280/414/444/489/500/522/842/928/944,  
 191/280/414/444/489/522/727/944, 191/280/414/489/842/928/944, 191/280/414/944,  
 191/414/522/842/944, 196/402/431/547/610/638, 218/668/700/869,  
 224/402/507/518/547/638/668, 269/275/431/518/547/638/668/669,  
 275/281/402/431/507/518/610/668, 275/281/402/431/518/547/610/669/671,  
 275/281/402/507/518/547/638/669/671, 275/281/402/518/547/610/638/671,  
 275/281/402/518/547/610/668/669/887, 275/281/402/547/610/638/669/671,  
 275/281/431/518/547/638/669/671, 275/281/507/547/669/671, 275/281/610/638/668/669,  
 275/281/671, 275/377/402/507/518/669/671/715, 275/402/431/507/547/671,  
 275/402/431/518/610/638/669/671/922, 275/402/507/547/610/638/668/669,  
 275/402/507/547/610/638/669/671, 275/402/507/547/610/671, 275/402/547/610/638/669/671,  
 275/402/547/638/669/671, 275/402/638/669/671, 275/431/507/518/547/668/669/671,  
 275/431/507/518/610/669/671, 275/431/507/547/610/638/671, 275/431/518/547/638/668,  
 275/431/518/610/638/669/671, 275/431/638, 275/507/518/547/610/638/668/669,  
 275/507/518/547/638/669/671, 275/507/547/610/638/669/671, 275/507/547/668/669/671,  
 275/518/671, 280/402/536/928, 281/402/507/518/547/610/638/669/671,  
 281/402/507/547/638/669/671, 281/402/518/547/610/638/668/669, 281/402/518/547/668,  
 281/431/507/518/547/610/638/668, 402/431/518/547/610/668, 402/431/518/547/671,  
 402/431/518/610, 402/431/547/638/671, 431/507/518/541/547/638/669/671,  
 431/507/518/669/671, 507/547/610, 507/547/638/669/671, 547/610/638/671 и 547/638/668, в  
 которых положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах  
 осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или  
 ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из  
 29Q/218S/240I/668D/700F/744V/869L, 29Q/240I/596P/668D/869L,  
 29Q/240I/596S/668D/700F/744V/869T, 29V/218S/240I/700F/869T,  
 36R/106P/150S/218S/527D/750P/883H/894R, 106P/112S/150S/218S/414G/527D/793K/883H,  
 106P/150S/169S/218S/414G/486E/527D/750P/894R,  
 106P/150S/169S/218S/414G/486E/527D/894R,  
 106P/150S/169S/218S/414G/486E/749E/793K/883H/894R,  
 106P/150S/169S/218S/414G/486E/750P/793K/883H/894R,  
 106P/150S/169S/218S/414G/486E/793K/883H, 106P/150S/169S/218S/414G/486E/894R,  
 106P/150S/169S/218S/414G/749E/750P/793K/883H, 106P/150S/169S/218S/414G/749E/793K,  
 106P/150S/169S/218S/414G/749E/793K/883H,  
 106P/150S/169S/218S/486E/527D/749E/793K/894R, 106P/150S/169S/218S/486E/749E/883H,  
 106P/150S/169S/218S/486E/883H, 106P/150S/169S/218S/749E/800A,  
 106P/150S/169S/414G/486E/749E/750P/883H, 106P/150S/169S/527D/749E/793K/883H,  
 106P/150S/169S/749E/793K/883H/894R,  
 106P/150S/218S/331A/414G/486E/527D/733E/749E/793K,  
 106P/150S/218S/414G/486E/642F/750P/793K/883H,

106P/150S/218S/414G/486E/750P/793K/894R, 106P/150S/218S/414G/527D/749E/750P/883H,  
 106P/150S/218S/414G/527D/749E/793K/883H/894G,  
 106P/150S/218S/414G/749E/750P/793K/883H/894R, 106P/150S/218S/414G/749E/793K/883H,  
 106P/150S/218S/486E/527D/749E/894R, 106P/150S/218S/486E/793K/883H,  
 106P/150S/218S/527D/749E/750P/793K, 106P/150S/218S/527D/793K/894G,  
 106P/150S/218S/749E/750P/793K, 106P/150S/218S/793K, 106P/150S/218S/793K/894R,  
 106P/150S/245S/793K/883H/894R, 106P/150S/414G/749E/750P/793K/894R,  
 106P/150S/414G/749E/793K/894R, 106P/150S/486E/527D/750P/793K,  
 106P/150S/486E/749E/793K/883H/894G, 106P/150S/749E/793K/883H,  
 106P/169S/185G/218S/414G/749E/750P/793K, 106P/191R/280D/402A/414G/444P/727P,  
 106P/191R/414G/444P/522V/928T/944S, 106P/191R/414G/489D/928T/944S,  
 106P/280D/402A/414G/444P/489D/727P/944S, 150S/169S/218S/414G/527D/793K,  
 150S/218S/414G/486A/750P/793K, 150S/218S/414G/486E/749E/750P,  
 150S/218S/414G/486E/750P/793K/883H, 150S/218S/414G/749E/750P/793K/894R,  
 150S/218S/414G/749E/793K, 150S/218S/527D/749E/793K, 150S/218S/749E/750P/793K,  
 150S/218S/749E/793K, 150S/414G/486E/527D/750P/894R, 150S/414G/486E/749E/750P/793K,  
 150S/486E/750P/883H/894G, 169S/486E/750P/793K/883H,  
 180H/275M/402A/518V/547G/610R/638I/669H/671N,  
 180H/402A/431V/507L/547G/610R/669H/671N/793G, 180H/402A/507L/547G/610R/671N,  
 191R/280D/402A/414G/444P/465E/842S/928T,  
 191R/280D/402A/414G/444P/489D/500A/944S,  
 191R/280D/414G/444P/489D/500A/522V/842S/928T/944S,  
 191R/280D/414G/444P/489D/522V/727P/944S, 191R/280D/414G/489D/842S/928T/944S,  
 191R/280D/414G/944S, 191R/414G/522V/842S/944S, 196V/402A/431V/547G/610R/638I,  
 218S/668D/700F/869T, 224F/402A/507L/518V/547G/638I/668D,  
 269N/275M/431V/518V/547G/638I/668D/669H,  
 275M/281V/402A/431V/507L/518V/610R/668D,  
 275M/281V/402A/507L/518V/547G/638I/669H/671N,  
 275M/281V/402A/518V/547G/610R/638I/671N,  
 275M/281V/402A/518V/547G/610R/668D/669H/887D,  
 275M/281V/402A/547G/610R/638I/669H/671N, 275M/281V/507L/547G/669H/671N,  
 275M/281V/610R/638I/668D/669H, 275M/402A/431V/507L/547G/671N,  
 275M/402A/507L/547G/610R/671N, 275M/402A/547G/638I/669H/671N,  
 275M/431V/518V/547G/638I/668D, 275M/431V/518V/610R/638I/669H/671N,  
 275M/431V/638I, 275M/507L/547G/668D/669H/671N,  
 275V/281V/402A/431V/518V/547G/610R/669H/671N,  
 275V/281V/431V/518V/547G/638I/669H/671N, 275V/281V/671N,  
 275V/377K/402A/507L/518V/669H/671N/715G,  
 275V/402A/431V/518V/610R/638I/669H/671N/922L,  
 275V/402A/507L/547G/610R/638I/668D/669H,

275V/402A/507L/547G/610R/638I/669H/671N, 275V/402A/547G/610R/638I/669H/671N,  
 275V/402A/638I/669H/671N, 275V/431V/507L/518V/547G/668D/669H/671N,  
 275V/431V/507L/518V/610R/669H/671N, 275V/431V/507L/547G/610R/638I/671N,  
 275V/507L/518V/547G/610R/638I/668D/669H, 275V/507L/518V/547G/638I/669H/671N,  
 275V/507L/547G/610R/638I/669H/671N, 275V/518V/671N, 280D/402A/536I/928T,  
 281V/402A/507L/518V/547G/610R/638I/669H/671N,  
 281V/402A/507L/547G/638I/669H/671N, 281V/402A/518V/547G/610R/638I/668D/669H,  
 281V/402A/518V/547G/668D, 281V/431V/507L/518V/547G/610R/638I/668D,  
 402A/431V/518V/547G/610R/668D, 402A/431V/518V/547G/671N, 402A/431V/518V/610R,  
 402A/431V/547G/638I/671N, 431V/507L/518V/541E/547G/638I/669H/671N,  
 431V/507L/518V/669H/671N, 507L/547G/610R, 507L/547G/638I/669H/671N,  
 547G/610R/638I/671N и 547G/638I/668D, где положения пронумерованы со ссылкой на  
 SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза  
 содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких  
 положениях, выбранных из L29Q/L218S/L240I/S668D/H700F/I744V/I869L,  
 L29Q/L240I/A596P/S668D/I869L, L29Q/L240I/A596S/S668D/H700F/I744V/I869T,  
 L29V/L218S/L240I/H700F/I869T, G36R/K106P/T150S/L218S/N527D/A750P/R883H/Q894R,  
 K106P/A112S/T150S/L218S/R414G/N527D/E793K/R883H,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/T486E/N527D/A750P/Q894R,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/T486E/N527D/Q894R,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/T486E/Q749E/E793K/R883H/Q894R,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/T486E/A750P/E793K/R883H/Q894R,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/T486E/E793K/R883H,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/T486E/Q894R,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/Q749E/A750P/E793K/R883H,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/Q749E/E793K,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/Q749E/E793K/R883H,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/T486E/N527D/Q749E/E793K/Q894R,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/T486E/Q749E/R883H,  
 K106P/T150S/N169S/L218S/T486E/R883H, K106P/T150S/N169S/L218S/Q749E/P800A,  
 K106P/T150S/N169S/R414G/T486E/Q749E/A750P/R883H,  
 K106P/T150S/N169S/N527D/Q749E/E793K/R883H,  
 K106P/T150S/N169S/Q749E/E793K/R883H/Q894R,  
 K106P/T150S/L218S/V331A/R414G/T486E/N527D/D733E/Q749E/E793K,  
 K106P/T150S/L218S/R414G/T486E/L642F/A750P/E793K/R883H,  
 K106P/T150S/L218S/R414G/T486E/A750P/E793K/Q894R,  
 K106P/T150S/L218S/R414G/N527D/Q749E/A750P/R883H,  
 K106P/T150S/L218S/R414G/N527D/Q749E/E793K/R883H/Q894G,  
 K106P/T150S/L218S/R414G/Q749E/A750P/E793K/R883H/Q894R,  
 K106P/T150S/L218S/R414G/Q749E/E793K/R883H,



K106P/T150S/L218S/T486E/N527D/Q749E/Q894R,  
 K106P/T150S/L218S/T486E/E793K/R883H,  
 K106P/T150S/L218S/N527D/Q749E/A750P/E793K,  
 K106P/T150S/L218S/N527D/E793K/Q894G,      K106P/T150S/L218S/Q749E/A750P/E793K,  
 K106P/T150S/L218S/E793K,      K106P/T150S/L218S/E793K/Q894R,  
 K106P/T150S/P245S/E793K/R883H/Q894R,  
 K106P/T150S/R414G/Q749E/A750P/E793K/Q894R,  
 K106P/T150S/R414G/Q749E/E793K/Q894R,      K106P/T150S/T486E/N527D/A750P/E793K,  
 K106P/T150S/T486E/Q749E/E793K/R883H/Q894G,      K106P/T150S/Q749E/E793K/R883H,  
 K106P/N169S/V185G/L218S/R414G/Q749E/A750P/E793K,  
 K106P/H191R/G280D/S402A/R414G/A444P/S727P,  
 K106P/H191R/R414G/A444P/E522V/D928T/C944S,  
 K106P/H191R/R414G/A489D/D928T/C944S,  
 K106P/G280D/S402A/R414G/A444P/A489D/S727P/C944S,  
 T150S/N169S/L218S/R414G/N527D/E793K,      T150S/L218S/R414G/T486A/A750P/E793K,  
 T150S/L218S/R414G/T486E/Q749E/A750P,  
 T150S/L218S/R414G/T486E/A750P/E793K/R883H,  
 T150S/L218S/R414G/Q749E/A750P/E793K/Q894R,      T150S/L218S/R414G/Q749E/E793K,  
 T150S/L218S/N527D/Q749E/E793K,      T150S/L218S/Q749E/A750P/E793K,  
 T150S/L218S/Q749E/E793K,      T150S/R414G/T486E/N527D/A750P/Q894R,  
 T150S/R414G/T486E/Q749E/A750P/E793K,      T150S/T486E/A750P/R883H/Q894G,  
 N169S/T486E/A750P/E793K/R883H,  
 N180H/L275M/S402A/I518V/A547G/W610R/V638I/L669H/S671N,  
 N180H/S402A/M431V/M507L/A547G/W610R/L669H/S671N/E793G,  
 N180H/S402A/M507L/A547G/W610R/S671N,  
 H191R/G280D/S402A/R414G/A444P/G465E/G842S/D928T,  
 H191R/G280D/S402A/R414G/A444P/A489D/D500A/C944S,  
 H191R/G280D/R414G/A444P/A489D/D500A/E522V/G842S/D928T/C944S,  
 H191R/G280D/R414G/A444P/A489D/E522V/S727P/C944S,  
 H191R/G280D/R414G/A489D/G842S/D928T/C944S,      H191R/G280D/R414G/C944S,  
 H191R/R414G/E522V/G842S/C944S,      A196V/S402A/M431V/A547G/W610R/V638I,  
 L218S/S668D/H700F/I869T,      L224F/S402A/M507L/I518V/A547G/V638I/S668D,  
 T269N/L275M/M431V/I518V/A547G/V638I/S668D/L669H,  
 L275M/A281V/S402A/M431V/M507L/I518V/W610R/S668D,  
 L275M/A281V/S402A/M507L/I518V/A547G/V638I/L669H/S671N,  
 L275M/A281V/S402A/I518V/A547G/W610R/V638I/S671N,  
 L275M/A281V/S402A/I518V/A547G/W610R/S668D/L669H/E887D,  
 L275M/A281V/S402A/A547G/W610R/V638I/L669H/S671N,  
 L275M/A281V/M507L/A547G/L669H/S671N,      L275M/A281V/W610R/V638I/S668D/L669H,  
 L275M/S402A/M431V/M507L/A547G/S671N,      L275M/S402A/M507L/A547G/W610R/S671N,

L275M/S402A/A547G/V638I/L669H/S671N, L275M/M431V/I518V/A547G/V638I/S668D,  
 L275M/M431V/I518V/W610R/V638I/L669H/S671N, L275M/M431V/V638I,  
 L275M/M507L/A547G/S668D/L669H/S671N,  
 L275V/A281V/S402A/M431V/I518V/A547G/W610R/L669H/S671N,  
 L275V/A281V/M431V/I518V/A547G/V638I/L669H/S671N, L275V/A281V/S671N,  
 L275V/R377K/S402A/M507L/I518V/L669H/S671N/V715G,  
 L275V/S402A/M431V/I518V/W610R/V638I/L669H/S671N/P922L,  
 L275V/S402A/M507L/A547G/W610R/V638I/S668D/L669H,  
 L275V/S402A/M507L/A547G/W610R/V638I/L669H/S671N,  
 L275V/S402A/A547G/W610R/V638I/L669H/S671N, L275V/S402A/V638I/L669H/S671N,  
 L275V/M431V/M507L/I518V/A547G/S668D/L669H/S671N,  
 L275V/M431V/M507L/I518V/W610R/L669H/S671N,  
 L275V/M431V/M507L/A547G/W610R/V638I/S671N,  
 L275V/M507L/I518V/A547G/W610R/V638I/S668D/L669H,  
 L275V/M507L/I518V/A547G/V638I/L669H/S671N,  
 L275V/M507L/A547G/W610R/V638I/L669H/S671N, L275V/I518V/S671N,  
 G280D/S402A/V536I/D928T,  
 A281V/S402A/M507L/I518V/A547G/W610R/V638I/L669H/S671N,  
 A281V/S402A/M507L/A547G/V638I/L669H/S671N,  
 A281V/S402A/I518V/A547G/W610R/V638I/S668D/L669H,  
 A281V/S402A/I518V/A547G/S668D,  
 A281V/M431V/M507L/I518V/A547G/W610R/V638I/S668D,  
 S402A/M431V/I518V/A547G/W610R/S668D, S402A/M431V/I518V/A547G/S671N,  
 S402A/M431V/I518V/W610R, S402A/M431V/A547G/V638I/S671N,  
 M431V/M507L/I518V/G541E/A547G/V638I/L669H/S671N,  
 M431V/M507L/I518V/L669H/S671N, M507L/A547G/W610R,  
 M507L/A547G/V638I/L669H/S671N, A547G/W610R/V638I/S671N и A547G/V638I/S668D,  
 где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2.

Настоящее изобретение предлагает рекомбинантные кислые альфа-глюкозидазы и/или биологически активные фрагменты рекомбинантных кислых альфа-глюкозидаз, содержащие аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, примерно 70%, по меньшей мере, примерно 75%, по меньшей мере, примерно 80%, по меньшей мере, примерно 85%, по меньшей мере, примерно 90%, по меньшей мере, примерно 91%, по меньшей мере, примерно 92%, по меньшей мере, примерно 93%, по меньшей мере, примерно 94%, по меньшей мере, примерно 95%, по меньшей мере, примерно 96%, по меньшей мере, примерно 97%, по меньшей мере, примерно 98% или по меньшей мере, примерно 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 8. Настоящее изобретение предлагает фрагменты рекомбинантных кислых альфа-глюкозидаз и/или биологически активных рекомбинантных кислых альфа-глюкозидаз, содержащих аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере

мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 93%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряду положений, выбранных из 4, 27, 27/28/489, 27/418/478, 28, 28/29, 28/29/113/135/138, 28/29/113/135/418, 28/29/135, 28/29/418, 29/113/126/135/193, 29/113/135, 29/113/135/455, 29/113/138, 29/148, 29/478, 106, 106/138/218/431/671/749, 106/218/281, 106/218/455, 106/218/455/507/749, 106/489/671, 106/638, 106/671/934, 113, 113/135/418, 113/418/455/478/581, 113/418/478/489/581, 135, 135/148/150/418, 135/478/489/581, 135/489, 135/944, 138/218/668/671, 138/218/749/934, 138/671/749/934, 157, 218, 218/281, 218/281/431, 218/281/671, 218/431, 218/431/489/507/749/934, 218/455, 218/507/749, 218/507/934, 218/638/671, 218/749, 281/431/489/668, 345/934, 418, 418/489, 431/668/671, 489/638/934, 489/671/934, 489/749, 489/934, 507/668, 507/671/934, 671/749, 671/934 и 749/784, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из 4H, 27P/28S/489R, 27P/418E/478T, 27R, 28S, 28S/29T, 28S/29T/113S/135Q/138A, 28S/29T/113S/135Q/418E, 28S/29T/135Q, 28S/29T/418E, 29T/113S/126Q/135Q/193Q, 29T/113S/135Q, 29T/113S/135Q/455V, 29T/113S/138A, 29T/148G, 29T/478T, 106P, 106P/138A/218S/431V/671N/749E, 106P/218S/281V, 106P/218S/455V, 106P/218S/455V/507L/749E, 106P/489R/671N, 106P/638I, 106P/671N/934R, 113S, 113S/135Q/418E, 113S/418E/455V/478T/581T, 113S/418E/478T/489R/581T, 135P/944Y, 135Q, 135Q/148G/150G/418E, 135Q/478T/489R/581T, 135Q/489R, 138A/218S/668D/671N, 138A/218S/749E/934R, 138A/671N/749E/934R, 157M, 218S, 218S/281V, 218S/281V/431V, 218S/281V/671N, 218S/431V, 218S/431V/489R/507L/749E/934R, 218S/455V, 218S/507L/749E, 218S/507L/934R, 218S/638I/671N, 218S/749E, 281V/431V/489R/668D, 345K/934R, 418E, 418E/489R, 431V/668D/671N, 489R/638I/934R, 489R/671N/934R, 489R/749E, 489R/934R, 507L/668D, 507L/671N/934R, 671N/749E, 671N/934R и 749E/784T, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из P4H, F27P/L28S/A489R, F27P/A418E/A478T, F27R, L28S, L28S/L29T, L28S/L29T/Q113S/S135Q/M138A, L28S/L29T/Q113S/S135Q/A418E, L28S/L29T/S135Q, L28S/L29T/A418E, L29T/Q113S/P126Q/S135Q/H193Q, L29T/Q113S/S135Q, L29T/Q113S/S135Q/R455V, L29T/Q113S/M138A, L29T/T148G, L29T/A478T, K106P, K106P/M138A/L218S/M431V/S671N/Q749E, K106P/L218S/A281V, K106P/L218S/R455V, K106P/L218S/R455V/M507L/Q749E, K106P/A489R/S671N, K106P/V638I, K106P/S671N/L934R, Q113S, Q113S/S135Q/A418E, Q113S/A418E/R455V/A478T/K581T, Q113S/A418E/A478T/A489R/K581T, S135P/C944Y,

S135Q, S135Q/T148G/S150G/A418E, S135Q/A478T/A489R/K581T, S135Q/A489R, M138A/L218S/S668D/S671N, M138A/L218S/Q749E/L934R, M138A/S671N/Q749E/L934R, L157M, L218S, L218S/A281V, L218S/A281V/M431V, L218S/A281V/S671N, L218S/M431V, L218S/M431V/A489R/M507L/Q749E/L934R, L218S/R455V, L218S/M507L/Q749E, L218S/M507L/L934R, L218S/V638I/S671N, L218S/Q749E, A281V/M431V/A489R/S668D, Q345K/L934R, A418E, A418E/A489R, M431V/S668D/S671N, A489R/V638I/L934R, A489R/S671N/L934R, A489R/Q749E, A489R/L934R, M507L/S668D, M507L/S671N/L934R, S671N/Q749E, S671N/L934R и Q749E/A784, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 8.

Настоящее изобретение предлагает рекомбинантные кислые альфа-глюкозидазы и/или биологически активные фрагменты рекомбинантных кислых альфа-глюкозидаз, содержащие аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, примерно 70%, по меньшей мере, примерно 75%, по меньшей мере, примерно 80%, по меньшей мере, примерно 85%, по меньшей мере, примерно 90%, по меньшей мере, примерно 91%, по меньшей мере, примерно 92%, по меньшей мере, примерно 93%, по меньшей мере, примерно 94%, по меньшей мере, примерно 95%, по меньшей мере, примерно 96%, по меньшей мере, примерно 97%, по меньшей мере, примерно 98% или по меньшей мере, примерно 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 14. Настоящее изобретение предлагает фрагменты рекомбинантных кислых альфа-глюкозидаз и/или биологически активных рекомбинантных кислых альфа-глюкозидаз, содержащих аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 93%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену в положении или ряде положений, выбранных из 22, 24, 27, 27/165, 30, 33, 34, 37/62, 37/62/79/196/696/862, 37/62/523, 37/62/523/793, 37/64/66/79/154/523/681/793/862, 37/79/154/793, 37/196, 37/528/696/793, 37/528/790, 37/528/790/793/862, 37/790/793, 39, 39/58/489/725/830/842/930/944, 39/70/109/830/842, 39/70/489/612, 39/70/725, 39/267, 39/267/489/522/612/830/842, 39/267/489/830/944, 39/489/500/612, 39/500/612, 40, 44/157, 47, 49, 50, 55, 60/500/612, 62/79/154/862, 62/79/196/681/862, 62/79/523/528/790, 62/79/790/793, 62/79/862, 62/92, 62/92/790/793, 62/106/523/528/696/793/862, 62/154/696/793/862, 62/793/862, 68, 70, 70/267/725/944, 70/267/930/944, 70/489/930, 70/725/830/860/930/944, 77, 79/154/681, 79/154/793/862, 79/862, 89, 97, 106/154, 107, 109, 109/522/612/725, 109/522/830/944, 109/612, 118, 149, 157, 158, 178, 179, 196/528/681/790/793, 207, 208, 217, 267/489/500/725/830/930, 267/522/725, 352, 385, 424, 448, 463, 489/830/944, 500, 500/612/830/860, 500/860/930, 500/930/944, 522/725, 523, 523/790/793, 528/681, 528/793, 528/862, 672, 673, 725, 734, 740, 753, 774, 778, 793, 830, 844, 862, 875, 880, 892, 902, 922, 925, 930, 932, 934, 938 и 944, где положения пронумерованы

со ссылкой на SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из 22R, 24E, 24R, 24W, 27A, 27G, 27G/165I, 27K, 27R, 27S, 27V, 27W, 30D, 30L, 33G, 33P, 34D, 34M, 34T, 37F/62E, 37F/62E/79S/196T/696S/862Q, 37F/62E/523N, 37F/62E/523N/793K, 37F/64Q/66G/79S/154R/523N/681Q/793K/862Q, 37F/79S/154R/793K, 37F/196T, 37F/528S/696S/793K, 37F/528S/790V, 37F/528S/790V/793K/862Q, 37F/790V/793K, 39D, 39H, 39Q, 39Q/58L/489D/725E/830K/842S/930P/944S, 39Q/70A/109P/830K/842S, 39Q/70A/489D/612D, 39Q/70A/725E, 39Q/267K, 39Q/267K/489D/522V/612D/830K/842S, 39Q/267K/489D/830K/944S, 39Q/489D/500A/612D, 39Q/500A/612D, 40W, 44I/157V, 47G, 47R, 49A, 49G, 50G, 50L, 50V, 55C, 55L, 60V/500A/612D, 62E/79S/154R/862Q, 62E/79S/196T/681Q/862Q, 62E/79S/523N/528S/790V, 62E/79S/790V/793K, 62E/79S/862Q, 62E/92R, 62E/92R/790V/793K, 62E/106R/523N/528S/696S/793K/862Q, 62E/154R/696S/793K/862Q, 62E/793K/862Q, 68N, 68S, 68W, 70A/267K/725E/944S, 70A/267K/930P/944S, 70A/489D/930P, 70A/725E/830K/860F/930P/944S, 70Q, 77W, 79S/154R/681Q, 79S/154R/793K/862Q, 79S/862Q, 89R, 97D, 97G, 106R/154R, 107G, 109D, 109P/522V/612D/725E, 109P/522V/830K/944S, 109P/612D, 118F, 149R, 157Q, 158E, 158F, 178G, 178V, 179L, 196T/528S/681Q/790V/793K, 207R, 207Y, 208G, 208I, 217A, 217D, 267K/489D/500A/725E/830K/930P, 267K/522V/725E, 352K, 352V, 385G, 424K, 448L, 463A, 489D/830K/944S, 500A, 500A/612D/830K/860F, 500A/860F/930P, 500A/930P/944S, 522V/725E, 523N, 523N/790V/793K, 528S/681Q, 528S/793K, 528S/862Q, 672E, 672K, 673N, 673R, 725F, 725V, 734K, 740G, 740Q, 753S, 774G, 774S, 778Q, 793K, 830V, 844R, 862Q, 875D, 880R, 892L, 902L, 922E, 925A, 925W, 930P, 932A, 934F, 938A, 938P, 944R и 944S, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления, кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из I22R, L24E, L24R, L24W, F27A, F27G, F27G/M165I, F27K, F27R, F27S, F27V, F27W, V30D, V30L, E33G, E33P, L34D, L34M, L34T, S37F/A62E, S37F/A62E/N79S/A196T/A696S/R862Q, S37F/A62E/D523N, S37F/A62E/D523N/E793K, S37F/P64Q/R66G/N79S/K154R/D523N/E681Q/E793K/R862Q, S37F/N79S/K154R/E793K, S37F/A196T, S37F/N528S/A696S/E793K, S37F/N528S/I790V, S37F/N528S/I790V/E793K/R862Q, S37F/I790V/E793K, P39D, P39H, P39Q, P39Q/R58L/A489D/K725E/Q830K/G842S/C930P/C944S, P39Q/V70A/L109P/Q830K/G842S, P39Q/V70A/A489D/S612D, P39Q/V70A/K725E, P39Q/R267K, P39Q/R267K/A489D/E522V/S612D/Q830K/G842S, P39Q/R267K/A489D/Q830K/C944S, P39Q/A489D/D500A/S612D, P39Q/D500A/S612D, V40W, T44I/L157V, A47G, A47R, Q49A, Q49G, Q50G, Q50L, Q50V, P55C, P55L, A60V/D500A/S612D, A62E/N79S/K154R/R862Q, A62E/N79S/A196T/E681Q/R862Q, A62E/N79S/D523N/N528S/I790V, A62E/N79S/I790V/E793K, A62E/N79S/R862Q, A62E/Q92R, A62E/Q92R/I790V/E793K, A62E/K106R/D523N/N528S/A696S/E793K/R862Q, A62E/K154R/A696S/E793K/R862Q,

A62E/E793K/R862Q, R68N, R68S, R68W, V70A/R267K/K725E/C944S, V70A/R267K/C930P/C944S, V70A/A489D/C930P, V70A/K725E/Q830K/L860F/C930P/C944S, V70Q, P77W, N79S/K154R/E681Q, N79S/K154R/E793K/R862Q, N79S/R862Q, A89R, A97D, A97G, K106R/K154R, Q107G, L109D, L109P/E522V/S612D/K725E, L109P/E522V/Q830K/C944S, L109P/S612D, W118F, P149R, L157Q, T158E, T158F, P178G, P178V, A179L, A196T/N528S/E681Q/I790V/E793K, E207R, E207Y, E208G, E208I, Q217A, Q217D, R267K/A489D/D500A/K725E/Q830K/C930P, R267K/E522V/K725E, Y352K, Y352V, R385G, H424K, R448L, E463A, A489D/Q830K/C944S, D500A, D500A/S612D/Q830K/L860F, D500A/L860F/C930P, D500A/C930P/C944S, E522V/K725E, D523N, D523N/I790V/E793K, N528S/E681Q, N528S/E793K, N528S/R862Q, L672E, L672K, P673N, P673R, K725F, K725V, H734K, E740G, E740Q, A753S, A774G, A774S, L778Q, E793K, Q830V, E844R, R862Q, N875D, E880R, Q892L, A902L, P922E, K925A, K925W, C930P, S932A, L934F, Q938A, Q938P, C944R и C944S, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 14.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну мутацию по меньшей мере, в одном положении, как указано в таблицах 3-1, 3-2, 4-1, 6-1, 10-1, 10-2, 12-1, 13-1, 13-2, 14-1, 14-2, 15-1, 16-1, 17-1, 17-2, 17-3, 17-4, 17-5, 17-6, 17-7, 17-8 и/или 17-9. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза получена из кислой альфа-глюкозидазы человека. В еще некоторых дополнительных вариантах осуществления, рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 946, 1956, 2496, 2880 и/или 3104.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий сконструированные полипептиды GAA, содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из полинуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 1, 5, 7, 11, 13, 15, 17, 19, 945, 1955, 2495, 2879 и /или 3103. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий сконструированный полипептид GAA, имеет, по меньшей мере, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98% или примерно 99% идентичность нуклеотидных остатков с SEQ ID NO: 1, 5, 7, 11, 13, 15, 17, 19, 945, 1955, 2495, 2879 и/или или 3103. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий сконструированный полипептид GAA, имеет, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичность нуклеотидных остатков с SEQ ID NO: 1, 5, 7, 11, 13, 15, 17, 19, 945, 1955, 2495, 2879 и/или 3103. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий сконструированный полипептид GAA содержит SEQ ID NO: 1, 5, 7, 11, 13, 15, 17, 19, 945, 1955, 2495, 2879 и/или 3103. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий сконструированный полипептид GAA, состоит из SEQ ID NO: 1, 5, 7, 11, 13, 15, 17, 19, 945, 1955, 2495, 2879 и/или 3103. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотиды способны гибридизоваться в очень жестких условиях с

эталонной полинуклеотидной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 1, 5, 7, 11, 13, 15, 17, 19, 945, 1955, 2495, 2879 и/или 3103, или ее комплементарной последовательностью, или полинуклеотидной последовательностью, кодирующей любой из вариантов полипептидов ГАА, предложенных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, выделенный полинуклеотид, кодирующий любой из сконструированных полипептидов ГАА, предложенных в настоящем документе, манипулируют различными способами для обеспечения экспрессии полипептида. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, представлены в виде векторов экспрессии, где присутствует одна или несколько контрольных последовательностей для регуляции экспрессии полинуклеотидов и/или полипептидов. Манипуляции с выделенным полинуклеотидом перед его встраиванием в вектор могут быть желательны или необходимы, в зависимости от вектора экспрессии. Методы модификации полинуклеотидов и последовательностей нуклеиновых кислот с использованием способов рекомбинантной ДНК хорошо известны в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления, контрольные последовательности включают, среди прочих последовательностей, промоторы, последовательность Козака, лидерные последовательности, последовательности полиаденилирования, последовательности пропептидов, последовательности сигнальных пептидов, регуляторные элементы на основе ДНК для сохранения геной терапии и терминаторы транскрипции. Как известно в данной области техники, подходящие промоторы могут быть выбраны на основе используемых клеток-хозяев. Для бактериальных клеток-хозяев подходящие промоторы для направления транскрипции конструкций нуклеиновых кислот по настоящей заявке включают, но не ограничены ими, промоторы, полученные из *lac*-оперона *E. coli*, гена агаразы *Streptomyces coelicolor* (*dagA*), гена левансахаразы *Bacillus subtilis* (*sacB*), гена альфа-амилазы *Bacillus licheniformis* (*amyL*), гена мальтогенной амилазы *Bacillus stearothermophilus* (*amyM*), гена альфа-амилазы *Bacillus amyloliquefaciens* (*amyQ*), гена пенициллиназы *Bacillus licheniformis* (*penP*), генов *xylA* и *xylB* *Bacillus subtilis* и прокариотического гена бета-лактамазы (см., например, Villa-Kamaroff et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 75: 3727-3731 [1978]), а также промотора *tac* (см., например, DeBoer et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 80: 21-25 [1983]). Примеры промоторов для клеток-хозяев мицелиальных грибов включают промоторы, полученные из генов для амилазы ТАКА *Aspergillus oryzae*, аспарагиновой протеиназы *Rhizomucor miehei*, нейтральной альфа-амилазы *Aspergillus niger*, кислотоустойчивой альфа-амилазы *Aspergillus niger*, глюкоамилазы *Aspergillus niger* или *Aspergillus awamori* (*glaA*), липазы *Rhizomucor miehei*, щелочной протеазы *Aspergillus oryzae*, триозофосфатизомеразы *Aspergillus oryzae*, ацетамидазы *Aspergillus nidulans* и трипсиноподобной протеазы *Fusarium oxysporum* (см., например, WO 96/00787), а также промотора NA2-*tpi* (гибрида промоторов из генов нейтральной альфа-амилазы *Aspergillus niger* и триозофосфатизомеразы *Aspergillus oryzae*), а также их мутантных, усеченных и гибридных промоторов. Примеры промоторов

дрожжевых клеток могут происходить из генов енолазы *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), галактокиназы *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), алкогольдегидрогеназы/глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP) и 3-фосфоглицераткиназы *Saccharomyces cerevisiae*. Другие полезные промоторы для дрожжевых клеток-хозяев известны в данной области техники (см., например, Romanos et al., *Yeast* 8:423-488 [1992]). Типовые промоторы для использования в клетках млекопитающих включают, но не ограничены ими, промоторы цитомегаловируса (CMV), промотор  $\beta$ -актина курицы, слитый с энхансером CMV, вакуолизирующего вируса 40 обезьяны (SV40), от фосфоглицераткиназы *Homo sapiens*, бета-актина, фактора элонгации-1a или глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы или  $\beta$ -актина из *Gallus gallus*.

В некоторых вариантах осуществления, контрольная последовательность представляет собой подходящую последовательность терминатора транскрипции, последовательность, распознаваемую клеткой-хозяином для терминации транскрипции. Последовательность терминатора функционально связана с 3' концом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. Любой терминатор, функционирующий в выбранной клетке-хозяине, находит применение в настоящем изобретении. Например, типовые терминаторы транскрипции для клеток-хозяев мицелиальных грибов могут быть получены из генов для амилазы ТАКА *Aspergillus oryzae*, глюкоамилазы *Aspergillus niger*, антранилатсинтазы *Aspergillus nidulans*, альфа-глюкозидазы *Aspergillus niger* и трипсиноподобной протеазы *Fusarium oxysporum*. Типовые терминаторы для дрожжевых клеток-хозяев могут быть получены из генов енолазы *Saccharomyces cerevisiae*, цитохрома С (CYC1) *Saccharomyces cerevisiae* и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *Saccharomyces cerevisiae*. Другие полезные терминаторы для дрожжевых клеток-хозяев известны в данной области техники (см., например, Romanos et al., *выше*). Типовые терминаторы клеток млекопитающих включают, но не ограничены ими, терминаторы цитомегаловируса (CMV), вируса вакуолизации 40 обезьян (SV40), гормона роста hGH *Homo sapiens*, из бычьего гормона роста BGH и из бета-глобулина человека или кролика.

В некоторых вариантах осуществления, контрольная последовательность представляет собой подходящую лидерную последовательность, модификацию 5'-кэпа, 5' UTR и т. д. В некоторых вариантах осуществления, эти элементы регуляторной последовательности опосредуют связывание с молекулами, участвующими в доставке и трансляции мРНК, ингибируют 5'-экзонуклеолитическую деградацию и придают устойчивость к де-кэпированию. Лидерная последовательность функционально связана с 5' концом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. Можно использовать любую лидерную последовательность, которая функциональна в выбранной клетке-хозяине. Примеры лидеров для клеток-хозяев мицелиальных грибов получают из генов для амилазы ТАКА *Aspergillus oryzae* и триозофосфатизомеразы *Aspergillus nidulans*. Подходящие лидеры для дрожжевых клеток-хозяев включают, но не ограничены ими, полученные из генов для енолазы *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), 3-фосфоглицераткиназы *Saccharomyces cerevisiae*, альфа-фактора *Saccharomyces cerevisiae* и



спиртовой дегидрогеназы/глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ADH2/GAP) *Saccharomyces cerevisiae*. Подходящие лидеры для клеток-хозяев млекопитающих включают, но не ограничены ими, элемент 5'-UTR, присутствующий в мРНК ортопоксвируса.

В некоторых вариантах осуществления, контрольная последовательность содержит 3' нетранслируемый участок нуклеиновой кислоты и последовательность нуклеиновой кислоты хвоста полиаденилирования, последовательности, функционально связанные с 3' концом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, и которые опосредуют связывание с белками, участвующими в доставке и трансляции мРНК, и периоде полувыведения мРНК. Любая последовательность полиаденилирования и 3' UTR, которые являются функциональными в выбранной клетке-хозяине, могут быть использованы в настоящем изобретении. Типовые последовательности полиаденилирования для клеток-хозяев мицелиальных грибов включают, но не ограничены ими, последовательности из генов для амилазы ТАКА *Aspergillus oryzae*, глюкоамилазы *Aspergillus niger*, антранилатсинтазы *Aspergillus nidulans*, трипсиноподобной протеазы *Fusarium oxysporum* и альфа-глюкозидазы *Aspergillus niger*. Полезные последовательности полиаденилирования для дрожжевых клеток-хозяев также известны в данной области техники (см., например, Guo and Sherman, *Mol. Cell. Biol.*, 15:5983-5990 [1995]). Подходящие последовательности полиаденилирования и 3' UTR для клеток-хозяев млекопитающих включают, но не ограничены ими, 3' UTR мРНК  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобина, которые содержат несколько элементов последовательности, повышающих стабильность и трансляцию мРНК.

В некоторых вариантах осуществления, контрольная последовательность представляет собой область, кодирующую сигнальный пептид, которая кодирует аминокислотную последовательность, связанную с аминоконцом полипептида, и направляет кодируемый полипептид в секреторный путь клетки. 5' конец кодирующей последовательности для последовательности нуклеиновой кислоты может по своей природе содержать область, кодирующую сигнальный пептид, естественно связанную в трансляционной рамке считывания с сегментом кодирующей области, который кодирует секреторируемый полипептид. Альтернативно, 5' конец кодирующей последовательности может содержать область, кодирующую сигнальный пептид, которая является чужеродной для кодирующей последовательности. Любая область, кодирующая сигнальный пептид, которая направляет экспрессируемый полипептид в секреторный путь выбранной клетки-хозяина, находит применение для экспрессии сконструированных полипептидов GAA, предложенных в настоящем документе. Области, кодирующие эффективные сигнальные пептиды для бактериальных клеток-хозяев, включают, но не ограничены ими, области, кодирующие сигнальные пептиды, полученные из генов для мальтогенной амилазы *Bacillus* NCIB 11837, альфа-амилазы *Bacillus stearothermophilus*, субтилизина *Bacillus licheniformis*, бета-лактамазы *Bacillus licheniformis*, нейтральных протеаз *Bacillus stearothermophilus* (nprT, nprS, nprM) и prsA *Bacillus subtilis*. Другие

сигнальные пептиды известны в данной области техники (см., например, Simonen and Palva, *Microbiol. Rev.*, 57:109-137 [1993]). Области, кодирующие эффективные сигнальные пептиды для клеток-хозяев мицелиальных грибов, включают, но не ограничены ими, области, кодирующие сигнальные пептиды, полученные из генов для амилазы ТАКА *Aspergillus oryzae*, нейтральной амилазы *Aspergillus niger*, глюкоамилазы *Aspergillus niger*, аспарагиновой протеиназы *Rhizomucor miehei*, целлюлазы *Humicola insolens* и липазы *Humicola lanuginosa*. Полезные сигнальные пептиды для дрожжевых клеток-хозяев включают, но не ограничены ими, пептиды из генов для альфа-фактора *Saccharomyces cerevisiae* и инвертазы *Saccharomyces cerevisiae*. В некоторых вариантах осуществления, находит применение препептид фактора  $\alpha$ -спаривания *S. cerevisiae* (M $\alpha$ ) (например, SEQ ID NO: 3383 и 3384). Полезные сигнальные пептиды для клеток-хозяев млекопитающих включают, но не ограничены ими, пептиды из генов для иммуноглобулина гамма (IgG). Дополнительные сигнальные пептиды, применимые для хозяев-млекопитающих, включают сигнальные пептиды мыши. В некоторых вариантах осуществления, находит применение синтетический сигнальный пептид IG мыши (например, SEQ ID NO: 3381 и 3382).

В некоторых вариантах осуществления, контрольная последовательность представляет собой область, кодирующую пропептид, которая кодирует аминокислотную последовательность, расположенную на аминоконце полипептида. Полученный полипептид в некоторых случаях называют «проферментом», «прополипептидом» или «зимогеном». Пропептид может быть превращен в зрелый активный полипептид путем каталитического или аутокаталитического отщепления пропептида от прополипептида. Область, кодирующая пропептид, включает, помимо прочего, гены для щелочной протеазы (*aprE*) *Bacillus subtilis*, нейтральной протеазы (*nprT*) *Bacillus subtilis*, альфа-фактора *Saccharomyces cerevisiae*, аспарагиновой протеиназы *Rhizomucor miehei* и лактазы *Myceliophthora thermophila* (см., например, WO 95/33836). Если области сигнального пептида и пропептида присутствуют на аминоконце полипептида, область пропептида расположена рядом с аминоконцом полипептида, и область сигнального пептида расположена рядом с аминоконцом области пропептида.

В некоторых вариантах осуществления, также используются регуляторные последовательности. Эти последовательности облегчают регулирование экспрессии полипептида относительно роста клетки-хозяина. Примерами регуляторных систем являются те, которые вызывают включение или выключение экспрессии гена в ответ на химический или физический раздражитель, включая присутствие регуляторного соединения. В прокариотических клетках-хозяевах, подходящие регуляторные последовательности включают, но не ограничены ими, операторные системы *lac*, *tac* и *trp*. В дрожжевых клетках-хозяевах подходящие регуляторные системы включают, но не ограничены ими, систему ADH2 или систему GAL1. В мицелиальных грибах, подходящие регуляторные последовательности включают, но не ограничены ими, промотор альфа-амилазы ТАКА, промотор глюкоамилазы *Aspergillus niger* и промотор глюкоамилазы

*Aspergillus oryzae*.

В другом аспекте, настоящее изобретение также относится к рекомбинантному вектору экспрессии, содержащему полинуклеотид, кодирующий сконструированный полипептид GAA, и одну или несколько областей, регулирующих экспрессию, таких как промотор и терминатор, начало репликации и т. д., в зависимости от типа хозяев, в которые они должны быть введены. В некоторых вариантах осуществления, различные нуклеиновые кислоты и контрольные последовательности, описанные выше, объединяют вместе для получения рекомбинантного вектора экспрессии, который включает один или несколько удобных сайтов рестрикции, позволяющих вставлять или заменять последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариантный полипептид GAA, в таких сайтах. Альтернативно, полинуклеотидная(ые) последовательность(и) по настоящему изобретению экспрессируется путем вставки полинуклеотидной последовательности или конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей полинуклеотидную последовательность, в подходящий вектор для экспрессии. При создании вектора экспрессии кодирующая последовательность располагается в векторе таким образом, чтобы кодирующая последовательность была функционально связана с соответствующими контрольными последовательностями для экспрессии.

Рекомбинантный вектор экспрессии может быть любым подходящим вектором (например, плазмидой или вирусом, включая, помимо прочего, аденовирус (AV), аденоассоциированный вирус (AAV), лентивирус (LV) и невирусные векторы, такие как липосомы), который может быть легко подвергнут процедурам рекомбинантной ДНК и может привести к экспрессии вариантной полинуклеотидной последовательности GAA. Выбор вектора обычно будет зависеть от совместимости вектора с клеткой-хозяином, в которую должен быть введен вектор. Векторы могут быть линейными или замкнутыми кольцевыми плазмидами. Действительно, не предполагается, что настоящее изобретение ограничивается каким-либо конкретным вектором.

В некоторых вариантах осуществления, вектор экспрессии представляет собой автономно реплицирующийся вектор (т.е. вектор, который существует как внехромосомный объект, репликация которого не зависит от хромосомной репликации, такой как плазида, внехромосомный элемент, минихромосома или искусственная хромосома). Вектор может содержать любые средства для обеспечения саморепликации. В некоторых альтернативных вариантах осуществления, вектор может представлять собой вектор, который при введении в клетку-хозяина интегрируется в геном и реплицируется вместе с хромосомой(ами), в которую(ые) он был интегрирован. Кроме того, можно использовать один вектор или плазмиду или два или несколько векторов или плазмид, которые вместе содержат всю ДНК для введения в геном клетки-хозяина, или транспозон.

В некоторых вариантах осуществления, вектор экспрессии представляет собой рДН. Карта плазмиды этого вектора, содержащего SEQ ID NO: 1, представлена на фигуре 9. Последовательность этой плазмиды представлена как SEQ ID NO: 3379. Карта плазмиды этого вектора, содержащего последовательность бета-лактамазного буфера,

представлена на фигуре 10. Последовательность этой плазмиды представлена как SEQ ID NO: 3380. Предполагается, что вектор рДН найдет применение для экспрессии различных генов, включая, но не ограничиваясь ими, полинуклеотидные последовательности, кодирующие кислые альфа-глюкозидазы, представленные в настоящем документе. Действительно, предполагается, что штатная последовательность (или SEQ ID NO: 1, представленная в SEQ ID NO: 3379) будет заменена любым подходящим представляющим интерес геном.

В некоторых вариантах осуществления, вектор экспрессии предпочтительно содержит один или несколько селективируемых маркеров, которые обеспечивают легкий отбор трансформированных клеток. «Селективируемый маркер» представляет собой ген, продукт которого обеспечивает устойчивость к биоцидам или вирусам, устойчивость к тяжелым металлам, прототрофность к ауксотрофам и подобные. Примеры бактериальных селективируемых маркеров включают, но не ограничены ими, *dal* гены из *Bacillus subtilis* или *Bacillus licheniformis*, или маркеры, которые придают резистентность к антибиотикам, такую как резистентность к ампициллину, канамицину, хлорамфениколу или тетрациклину. Подходящие маркеры для дрожжевых клеток-хозяев включают, но не ограничены ими, *ADE2*, *HIS3*, *LEU2*, *LYS2*, *MET3*, *TRP1* и *URA3*. Селективные маркеры для использования в клетке-хозяине мицелиальных грибов включают, но не ограничены ими, *amdS* (ацетамидазу), *argB* (орнитинкарбамоилтрансферазу), *bar* (фосфинотрицинацетилтрансферазу), *hph* (гигромицинфосфоттрансферазу), *niaD* (нитратредуктазу), *purG* (оротидин-5'-фосфатдекарбоксилазу), *sC* (сульфатаденилтрансферазу) и *trpC* (антранилатсинтазу), а также их эквиваленты. В другом аспекте, настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей полинуклеотид, кодирующий, по меньшей мере, один сконструированный полипептид GAA по настоящей заявке, где полинуклеотид функционально связан с одной или несколькими контрольными последовательностями для экспрессии сконструированного(ых) фермента(ов) GAA в организме клетки-хозяина. Клетки-хозяева для использования при экспрессии полипептидов, кодируемых векторами экспрессии по настоящему изобретению, хорошо известны в данной области техники и включают, но не ограничены ими, бактериальные клетки, такие как клетки *E. coli*, *Vibrio fluvialis*, *Streptomyces* и *Salmonella typhimurium*, клетки грибов, такие как клетки дрожжей (например, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris* [номер доступа ATCC 201178]); клетки насекомых, такие как клетки *Drosophila S2* и *Spodoptera Sf9*; клетки животных (например, CHO, CHO-K1, COS и ВНК) и клетки человека (например, HEK293T, фибробласты человека, линии клеток меланомы TNP-1, Jurkat и Bowes); и клетки растений.

Соответственно, в другом аспекте, настоящее изобретение предлагает способы получения сконструированных полипептидов GAA, где способы включают культивирование клетки-хозяина, способной экспрессировать полинуклеотид, кодирующий сконструированный полипептид GAA, в условиях, подходящих для

экспрессии полипептида. В некоторых вариантах осуществления, способы дополнительно включают стадии выделения и/или очистки полипептидов GAA, как описано в настоящем документе.

Подходящие культуральные среды и условия роста для вышеописанных клеток-хозяев хорошо известны в данной области техники. Полинуклеотиды для экспрессии полипептидов GAA можно вводить в клетки различными способами, известными в данной области техники. Методы включают, среди прочего, электропорацию, бомбардировку биолисточескими частицами, трансфекцию, опосредованную липосомами, трансфекцию хлоридом кальция и слияние протопластов.

Сконструированную GAA со свойствами, описанными в настоящем документе, можно получить, подвергая полинуклеотид, кодирующий встречающийся в природе или сконструированный полипептид GAA, мутагенезу и/или способам направленной эволюции, известным в данной области и описанным в настоящем документе. Типовым методом направленной эволюции является мутагенез и/или шаффлинг ДНК (см., например, Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751 [1994]; WO 95/22625; WO 97/0078; WO 97/35966; WO 98/27230; WO 00/42651; WO 01/75767 и патент США 6,537,746). Другие процедуры направленной эволюции, которые можно использовать, включают, среди прочего, процесс ступенчатого удлинения (StEP), рекомбинацию *in vitro* (см., например, Zhao et al., Nat. Biotechnol., 16:258-261 [1998]), мутагенную ПЦР (см., например, Caldwell et al., PCR Methods Appl., 3:S136-S140 [1994]), и кассетный мутагенез (см., например, Black et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:3525-3529 [1996]).

Например, методы мутагенеза и направленной эволюции могут быть легко применены к полинуклеотидам для создания библиотек вариантов, которые можно экспрессировать, подвергать скринингу и анализу. Мутагенез и способы направленной эволюции хорошо известны в данной области техники (см., например, патенты США №№ 5,605,793, 5,811,238, 5,830,721, 5,834,252, 5,837,458, 5,928,905, 6,096,548, 6,117,679, 6,132,970, 6,165,793, 6,180,406, 6,251,674, 6,265,201, 6,277,638, 6,287,861, 6,287,862, 6,291,242, 6,297,053, 6,303,344, 6,309,883, 6,319,713, 6,319,714, 6,323,030, 6,326,204, 6,335,160, 6,335,198, 6,344,356, 6,352,859, 6,355,484, 6,358,740, 6,358,742, 6,365,377, 6,365,408, 6,368,861, 6,372,497, 6,337,186, 6,376,246, 6,379,964, 6,387,702, 6,391,552, 6,391,640, 6,395,547, 6,406,855, 6,406,910, 6,413,745, 6,413,774, 6,420,175, 6,423,542, 6,426,224, 6,436,675, 6,444,468, 6,455,253, 6,479,652, 6,482,647, 6,483,011, 6,484,105, 6,489,146, 6,500,617, 6,500,639, 6,506,602, 6,506,603, 6,518,065, 6,519,065, 6,521,453, 6,528,311, 6,537,746, 6,573,098, 6,576,467, 6,579,678, 6,586,182, 6,602,986, 6,605,430, 6,613,514, 6,653,072, 6,686,515, 6,703,240, 6,716,631, 6,825,001, 6,902,922, 6,917,882, 6,946,296, 6,961,664, 6,995,017, 7,024,312, 7,058,515, 7,105,297, 7,148,054, 7,220,566, 7,288,375, 7,384,387, 7,421,347, 7,430,477, 7,462,469, 7,534,564, 7,620,500, 7,620,502, 7,629,170, 7,702,464, 7,747,391, 7,747,393, 7,751,986, 7,776,598, 7,783,428, 7,795,030, 7,853,410, 7,868,138, 7,783,428, 7,873,477, 7,873,499, 7,904,249, 7,957,912, 7,981,614, 8,014,961, 8,029,988, 8,048,674, 8,058,001, 8,076,138, 8,108,150, 8,170,806, 8,224,580,

8,377,681, 8,383,346, 8,457,903, 8,504,498, 8,589,085, 8,762,066, 8,768,871, 9,593,326, 9,684,771, 9,665,694; и WO 95/22625; WO 97/0078; WO 97/35966; WO 98/27230; WO 00/42651; WO 01/75767; WO 2009/152336, WO 2013/138339, WO 2015/048572 и WO 2015/048573; и все соответствующие американские и не американские аналоги этих перечисленных патентов и заявок; Ling et al., *Anal. Biochem.*, 254:157-78 [1997]; Dale et al., *Meth. Mol. Biol.*, 57:369-74 [1996]; Smith, *Ann. Rev. Genet.*, 19:423-462 [1985]; Botstein et al., *Science*, 229:1193-1201 [1985]; Carter, *Biochem. J.*, 237:1-7 [1986]; Kramer et al., *Cell*, 38:879-887 [1984]; Wells et al., *Gene*, 34:315-323 [1985]; Minshull et al., *Curr. Op. Chem. Biol.*, 3:284-290 [1999]; Christians et al., *Nat. Biotechnol.*, 17:259-264 [1999]; Cramer et al., *Nature*, 391:288-291 [1998]; Cramer et al., *Nat. Biotechnol.*, 15:436-438 [1997]; Zhang et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 94:4504-4509 [1997]; Cramer et al., *Nat. Biotechnol.*, 14:315-319 [1996]; Stemmer, *Nature*, 370:389-391 [1994]; и Stemmer, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91:10747-10751 [1994]; все они включены в настоящий документ посредством ссылки).

В некоторых вариантах осуществления, клоны ферментов, полученные после обработки мутагенезом, подвергаются скринингу путем воздействия на ферменты определенной температуры (или других условий анализа) и измерения степени активности фермента, оставшейся после тепловой обработки или других условий анализа. Клоны, содержащие полинуклеотид, кодирующий полипептид GAA, затем выделяют из гена, секвенируют для выявления изменений нуклеотидной последовательности (если таковые имеются) и используют для экспрессии фермента в клетке-хозяине. Измерение ферментативной активности библиотек экспрессии можно проводить с использованием любого подходящего способа, известного в данной области техники (например, стандартных биохимических методов, таких как анализ ВЭЖХ).

Для сконструированных полипептидов с известной последовательностью полинуклеотиды, кодирующие фермент, могут быть получены стандартными твердофазными способами в соответствии с известными способами синтеза. В некоторых вариантах осуществления, фрагменты приблизительно до 100 оснований могут быть синтезированы индивидуально, затем соединены (например, с помощью ферментативных или химических способов методов лигирования или способов, опосредованных полимеразой) с образованием любой желаемой непрерывной последовательности. Например, полинуклеотиды и олигонуклеотиды, описанные в настоящем документе, могут быть получены путем химического синтеза с использованием классического фосфорамидитного способа (см., например, Beaucage et al., *Tetra. Lett.*, 22:1859-69 [1981]; and Matthes et al., *EMBO J.*, 3:801-05 [1984]), как это обычно практикуется в автоматизированных способах синтеза. Согласно фосфорамидитному способу, олигонуклеотиды синтезируют (например, в автоматическом ДНК синтезаторе), очищают, отжигают, лигируют и клонируют в соответствующих векторах.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, способ получения сконструированного полипептида GAA может включать: (а) синтез полинуклеотида, кодирующего полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную

из аминокислотной последовательности любого варианта, представленного в таблицах 3-1, 3-2, 4-1, 6-1, 10-1, 10-2, 12-1, 13-1, 13-2, 14-1, 14-2, 15-1, 16-1, 17-1, 17-2, 17-3, 17-4, 17-5, 17-6, 17-7, 17-8 и/или 17-9, а также SEQ ID NO: 2, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 946, 1956, 2496, 2880 и/или 3104, и (b) экспрессию полипептида GAA, кодируемого полинуклеотидом. В некоторых вариантах способа, аминокислотная последовательность, кодируемая полинуклеотидом, может необязательно иметь одну или несколько (например, до 3, 4, 5 или до 10) делеций, вставок и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления, аминокислотная последовательность необязательно имеет 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 1-15, 1-20, 1-21, 1-22, 1-23, 1-24, 1-25, 1-30, 1-35, 1-40, 1-45 или 1-50 делеций, вставок и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления, аминокислотная последовательность необязательно имеет 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, 30, 30, 35, 40, 45 или 50 делеций, вставок и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления, аминокислотная последовательность необязательно имеет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 делеций, вставок и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления, замены могут быть консервативными или неконсервативными заменами.

Экспрессированный сконструированный полипептид GAA может быть измерен в отношении любого желаемого улучшенного свойства (например, активности, селективности, стабильности, кислотоустойчивости, чувствительности к протеазе и т.д.) с использованием любого подходящего анализа, известного в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, анализы и описанные в настоящем документе условия.

В некоторых вариантах осуществления, любой, некоторые или все сконструированные полипептиды GAA, экспрессированные в клетке-хозяине, выделяют из клеток и/или культуральной среды с использованием любого одного или нескольких хорошо известных способов очистки белка, включая, помимо прочего, обработку лизоцимом, обработку ультразвуком, фильтрацию, высаливание, ультрацентрифугирование и хроматографию.

Хроматографические методы выделения полипептидов GAA включают, среди прочего, хроматографию с обращенной фазой, высокоэффективную жидкостную хроматографию, ионообменную хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия, гель-электрофорез и аффинную хроматографию. Условия очистки конкретного фермента частично зависят от таких факторов, как суммарный заряд, гидрофобность, гидрофильность, молекулярная масса, форма молекулы и т.д., и они очевидны специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления, для выделения улучшенных вариантов ферментов GAA можно использовать аффинные методики. В некоторых вариантах осуществления, с использованием очистки аффинной хроматографией, находит применение любое антитело, которое специфически связывает вариант полипептида GAA. Для получения антител, различных животных-хозяев, включая, но не ограничиваясь ими, кроликов,

мышей, крыс и т.д., иммунизируют путем инъекции полипептида GAA (например, варианта GAA) или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, полипептид или фрагмент GAA присоединен к подходящему носителю, такому как BSA, с помощью функциональной группы боковой цепи или линкеров, присоединенных к функциональной группе боковой цепи.

В некоторых вариантах осуществления, сконструированный полипептид GAA продуцируют в клетке-хозяине способом, включающим культивирование клетки-хозяина (например, *S. cerevisiae*, *Daucus carota*, *Nicotiana tabacum*, *H. sapiens* [например, HEK293T] или *Cricetulus griseus* [например, CHO]), содержащей полинуклеотидную последовательность, кодирующую сконструированный полипептид GAA, как описано в настоящем документе, в условиях, способствующих получению сконструированного полипептида GAA, восстановление сконструированного полипептида GAA из клеток и/или культуральной среды.

В некоторых вариантах осуществления, сконструированный полипептид GAA продуцируют в клетке-хозяине способом, включающим культивирование клетки-хозяина, содержащей полинуклеотидную последовательность, кодирующую сконструированный полипептид GAA, как описано в настоящем документе, в условиях, способствующих продуцированию сконструированного полипептида GAA, и восстановление сконструированного полипептида GAA из клеток и/или культуральной среды.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, изобретение относится к способу продуцирования сконструированного полипептида GAA, включающему культивирование рекомбинантной бактериальной клетки, содержащей полинуклеотидную последовательность, кодирующую сконструированный полипептид GAA, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности эталонным последовательностям SEQ ID NO: 2, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 946, 1956, 2496, 2880 и/или 3104, и одно или несколько различий аминокислотных остатков по сравнению с SEQ ID NO: 2, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 946, 1956, 2496, 2880 и/или 3104, и/или их комбинациями при выравнивании в соответствии с подходящими условиями культивирования, чтобы позволить продуцирование сконструированного полипептида GAA и, необязательно, выделение сконструированного полипептида GAA из культуры и/или культивируемых бактериальных клеток.

В некоторых вариантах осуществления, после выделения сконструированных полипептидов GAA из рекомбинантных клеток-хозяев или клеточной культуры их дополнительно очищают любым(и) подходящим(и) способом(ами), известными в данной области техники. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, очищенные полипептиды GAA комбинируют с другими ингредиентами и соединениями для получения композиций и составов, содержащих сконструированный полипептид GAA, подходящий для различных применений и применений (например, фармацевтических композиций).

### **Композиции:**



Настоящее изобретение предлагает сконструированные полипептиды GAA, подходящие для использования в фармацевтических и других композициях, таких как диетические/пищевые добавки, а также для других целей.

**Фармацевтические композиции:**

В зависимости от способа введения, композиции, содержащие терапевтически эффективное количество сконструированной GAA по настоящему изобретению, находятся в форме твердого, полутвердого вещества, геля или жидкости. В некоторых вариантах осуществления, композиции включают другие фармацевтически приемлемые компоненты, такие как разбавители, буферы, эксципиенты, соли, эмульгаторы, консерванты, стабилизаторы, наполнители и другие ингредиенты. Подробная информация о способах составления и введения хорошо известна в данной области техники и описана в литературе.

В некоторых вариантах осуществления, сконструированные полипептиды GAA составляют для применения в пероральных фармацевтических композициях. Любой подходящий формат для доставки сконструированных полипептидов GAA находит применение в настоящем изобретении, включая, но не ограничиваясь ими, пилюли, таблетки, гелевые таблетки, капсулы, леденцы, драже, порошки, мягкие гели, золь-гели, гели, эмульсии, имплантаты, пластыри, спреи, мази, линименты, кремы, пасты, желе, краски, аэрозоли, жевательные резинки, успокаивающие средства, палочки, суспензии (включая, но не ограничиваясь ими, суспензии на масляной основе, эмульсии масло-в-воде и т. д.), суспензии, сиропы, составы с контролируемым высвобождением, суппозитории и т.д. В некоторых вариантах осуществления, сконструированные полипептиды GAA представлены в форме, пригодной для инъекций (т.е. в составе для инъекций). В некоторых вариантах осуществления, сконструированные полипептиды GAA представлены в биосовместимых матрицах, таких как золь-гели, включая золь-гели на основе диоксида кремния (например, оксисилана). В некоторых вариантах осуществления, сконструированные полипептиды GAA инкапсулированы. В некоторых альтернативных вариантах осуществления, сконструированные полипептиды GAA инкапсулированы в наноструктуры (например, нанотрубки, нанотрубочки, нанокапсулы или микрокапсулы, микросферы, липосомы и т.д.). Действительно, не предполагается, что настоящее изобретение ограничивается каким-либо конкретным составом для доставки и/или средством доставки. Предполагается, что сконструированные полипептиды GAA вводят любыми подходящими способами, известными в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, парентеральное, пероральное, местное, трансдермальное, интраназальное, внутриглазное, интратекальное, через имплантаты и т. д.

В некоторых вариантах осуществления, сконструированные полипептиды GAA химически модифицированы гликозилированием, пегилированием (т.е. модифицированы полиэтиленгликолем [ПЭГ] или активированным ПЭГ, и т. д.) или другими соединениями (см., например, Ikeda, *Amino Acids* 29:283-287 [2005]; патенты США № 7,531,341,

7,534,595, 7,560,263 и 7,53,653; публикации заявок на патент США №№ 2013/0039898, 2012/0177722 и т.д.). Действительно, настоящее изобретение не ограничивается каким-либо конкретным способом и/или механизмом доставки.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления, сконструированные полипептиды GAA предложены для доставки в клетки или ткани с помощью генной терапии, включая вирусные векторы доставки, включая, но не ограничиваясь ими, аденовирус (AV), аденоассоциированный вирус (AAV), лентивирус (LV) или невирусные векторы (например, липосомы). В некоторых вариантах осуществления, сконструированные полипептиды GAA предложены для доставки в клетки или ткани с помощью мРНК-терапии после составления последовательностей полирибонуклеотидов в инкапсулированной доставке, такой как липосомы. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, сконструированные полипептиды GAA предложены для доставки в клетки или ткани посредством клеточной терапии, где полинуклеотидная последовательность, кодирующая сконструированные полипептиды GAA, вводится в экзогенную клетку, и эта клетка (или клетки) вводится реципиенту (например, у пациента с болезнью Помпе или с риском ее развития).

В некоторых дополнительных вариантах осуществления, сконструированные полипептиды GAA представлены в препаратах, содержащих кристаллы фермента, стабилизированные матрицей. В некоторых вариантах осуществления, состав содержит поперечно-сшитый кристаллический сконструированный фермент GAA и полимер с реакционноспособной группой, который прилипает к кристаллам фермента. Настоящее изобретение также предлагает сконструированные полипептиды GAA в полимерах.

В некоторых вариантах осуществления, композиции, содержащие сконструированные полипептиды GAA по настоящему изобретению, включают одно или несколько обычно используемых соединений-носителей, включая, но не ограничиваясь ими, сахара (например, лактозу, сахарозу, маннит и/или сорбит), крахмалы (например, кукурузный, пшеничный, рисовый, картофельный или другой растительный крахмал), целлюлозу (например, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, натрий-карбоксиметилцеллюлозу), камеди (например, аравийскую, трагакантовую, гуаровую и т. д.) и/или белки (например, желатин, коллаген и др.). Дополнительные компоненты в составах для перорального применения могут включать красители и/или подсластители (например, глюкозу, сахарозу и маннит) и смазывающие агенты (например, стеарат магния), а также энтеросолюбильные покрытия (например, метакрилатные полимеры, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы и/или любое другое подходящее энтеросолюбильное покрытие, известное в данной области техники). В некоторых вариантах осуществления, включены разрыхляющие или солубилизирующие агенты (например, поперечно-сшитый поливинилпирролидон, агар, альгиновая кислота или ее соли, такие как альгинат натрия). В некоторых вариантах осуществления, сконструированный полипептид GAA комбинируют с различными дополнительными компонентами, включая, но не ограничиваясь ими, консерванты, суспендирующие агенты,

загустители, смачивающие агенты, спирты, жирные кислоты и/или эмульгаторы, особенно в жидких составах. В некоторых вариантах осуществления, сконструированные полипептиды GAA вводят субъектам в комбинации с другими соединениями, молекулами и/или материалами, используемыми для лечения болезни Помпе, включая, но не ограничиваясь ими, фармакологические белки теплового шока, а также любые другие подходящие соединения. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, фармацевтическая композиция пригодна для парентеральной инъекции человеку. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция включает пилюлю, таблетку, капсулу или желатиновую капсулу, которые дополнительно содержат энтеросолюбильное покрытие.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает сконструированные полипептиды GAA, подходящие для применения для снижения концентрации гликогена в тканях. Дозы сконструированного(ых) полипептида(ов) GAA, вводимого животному, зависят от состояния или заболевания, общего состояния животного и других факторов, известных специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления, композиции предназначены для однократного или многократного введения животному. В некоторых вариантах осуществления, предполагается, что концентрация сконструированного(ых) полипептида(ов) GAA в композиции(ях), вводимой животному (например, человеку с болезнью Помпе), достаточна для эффективного лечения, облегчения и/или профилактики симптомов заболевания (например, болезни Помпе и/или связанных с болезнью Помпе состояний, заболеваний и/или симптомов). В некоторых вариантах осуществления, сконструированные полипептиды GAA вводят в комбинации с другими фармацевтическими и/или диетическими композициями.

Вышеизложенные и другие аспекты изобретения могут быть лучше поняты в связи со следующими неограничивающими примерами. Примеры представлены только в иллюстративных целях и никоим образом не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

### **ЭКСПЕРИМЕНТЫ**

Следующие примеры, включая эксперименты и полученные результаты, представлены только в иллюстративных целях и не должны рассматриваться как ограничивающие настоящее изобретение.

В приведенном ниже описании экспериментов применяются следующие сокращения: ч/млн (части на миллион); М (моль); mM (миллимолярный), мкМ (микромольный); нМ (наномольный); моль (моль); г (граммы); мг (миллиграммы); мкг (микрограммы); л (литры); мл (миллилитры); см (сантиметры); мм (миллиметры); мкм (микрометры); с (секунды); мин (минуты); ч (часы); ед. (единицы); MM (молекулярная масса); об/мин (обороты в минуту); °C (градусы Цельсия); CDS (кодирующая последовательность); ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота); РНК (рибонуклеиновая кислота); E. coli W3110 (обычно используемый лабораторный штамм E. coli, доступный в

Coli Genetic Stock Center [CGSC], New Haven, CT); DPBS (забуференный фосфатом солевой раствор по Дульбекко); LB (Лурия-Буртани); TB (среда TB); 4-MUGlu (4-метилумбеллиферил  $\alpha$ -D-глюкопиранозид); SD-Ura (среда для однократного осаждения без урацила); ВЭЖХ (жидкостная хроматография высокого давления); SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия); MU-Glu (4-метилумбеллиферил  $\alpha$ -D-глюкопиранозид), IPTG (изопропил  $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид), PMBS (сульфат полимиксина B), FIOPC (кратное улучшение по сравнению с положительным контролем); РВМС (моноклеарные клетки периферической крови); LB (бульон Лурия); MeOH (метанол); Axygen (Axygen, Inc., Union City, CA); Athens Research (Athens Research Technology, Athens, GA); ProSpec (ProSpec Tany Technogene, East Brunswick, NJ); Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); Ram Scientific (Ram Scientific, Inc., Yonkers, NY); Pall Corp. (Pall, Corp., Pt. Washington, NY); Millipore (Millipore, Corp., Billerica MA); Difco (Difco Laboratories, BD Diagnostic Systems, Detroit, MI); Molecular Devices (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA); Kuhner (Adolf Kuhner, AG, Basel, Switzerland); Microfluidics (Microfluidics Corp., Westwood, MA); Thermotron (Thermotron, Inc., Holland, MI); Cambridge Isotope Laboratories, (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Tewksbury, MA); Applied Biosystems (Applied Biosystems, часть Life Technologies, Corp., Grand Island, NY); Greiner Bio-One (Greiner Bio-One North America, Monroe, NC); Agilent (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA); Thermo Scientific (часть Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA); Corning (Corning, Inc., Palo Alto, CA); Megazyme (Megazyme International, Wicklow, Ireland); Enzo (Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY); GE Healthcare (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ); Pierce (Pierce Biotechnology (в настоящее время часть Thermo Fisher Scientific), Rockford, IL); Phenomenex (Phenomenex, Inc., Torrance, CA); Optimal (Optimal Biotech Group, Belmont, CA); и Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

### **ПРИМЕР 1**

#### **Приобретение гена GAA и конструирование векторов экспрессии**

В этом примере описано приобретение гена GAA и конструирование вектора экспрессии. Синтетический ген, кодирующий GAA человека дикого типа (Uniprot ID P10253) с удаленным нативным сигнальным пептидом, конструируют для оптимизированной экспрессии гена в *Saccharomyces cerevisiae* и сливают с последовательностью сигнального пептида MF $\alpha$  дрожжей (SEQ ID NO: 3383) для получения последовательности гена, представленного SEQ ID NO:2, который клонируют в дрожжевой вектор экспрессии pYT-72, как описано ранее (см., например, публикацию патентной заявки США № 2017/0360900 A1). Рекомбинационное клонирование и экспрессию генов проводят в штамме *S. cerevisiae* INVSc1. Методы направленной эволюции используют для создания библиотек генных вариантов из этой плазмидной конструкции (см., например, патент США № 8,383,346 и WO 2010/144103).

Для секретируемой экспрессии и временной трансфекции в клетках млекопитающих, химерную конструкцию экспрессии GAA, кодирующую синтетический

сигнальный пептид IG мыши (остатки 1-19 номера доступа Uniprot: A0N1R5; SEQ ID NO: 3381), слитую с синтетическим геном, кодирующим различные варианты GAA, конструируют следующим образом. В некоторых вариантах осуществления, синтетические варианты гена GAA основаны на последовательности GAA, кодон-оптимизированной для дрожжей (SEQ ID NO: 3), в то время как в некоторых альтернативных вариантах осуществления, синтетические варианты GAA основаны на последовательности GAA, которая является кодон-оптимизированной для экспрессии у млекопитающих (SEQ ID NO: 5). Олигонуклеотиды, содержащие фланкирующие области рестрикционных ферментов для клонирования либо в сайт BamHI/XhoI, либо в сайт HindIII/XhoI используют для амплификации фрагмента, кодирующего синтетический сигнальный пептид IG мыши (SEQ ID NO: 3381 и 3382) и кодирующую последовательность для зрелой формы GAA. Для экспрессии у млекопитающих, продукт ПЦР лигируют в линейаризованный вектор pcDNA3.1(+) либо на сайте BamHI/XhoI, либо на сайте HindIII/XhoI (Invitrogen). Направленную эволюцию используют для создания специфических вариантов гена, полученных из SEQ ID NO: 18-828, в плазмидной конструкции pcDNA3.1(+) (см., например, патент США № 8,383,346 и WO 2010/144103, каждый из которых включен посредством ссылки полностью).

Вектор рDH создают для оптимизации числа копий вектора, желаемого селективируемого лекарственного средства и длины пары оснований, чтобы обеспечить совместимость с созданием варианта библиотеки. Для экспрессии у млекопитающих, продукт ПЦР лигируют в линейаризованный вектор рDH либо на сайте BamHI/XhoI, либо на сайте HindIII/XhoI. Направленную эволюцию используют для создания специфических вариантов гена (SEQ ID NO: 829-3378), полученных из SEQ ID NO: 20, в конструкции плазмиды рDH. Карта плазмиды для рDH, содержащей GAA дикого типа, показана на фигуре 9, и последовательность плазмиды представлена как SEQ ID NO: 3379. Кроме того, карта плазмиды для рDH, содержащей бета-лактамазную (bla) штатную последовательность, представлена на фигуре 10, и последовательность представлена как SEQ ID NO: 3380.

В некоторых экспериментах, экспрессию вариантов GAA осуществляют с использованием продукта амплификации линейной ПЦР кассет экспрессии, описанных выше (т.е. химерной конструкции экспрессии, состоящей из синтетического сигнального пептида IG мыши (остатки 1-19 номера доступа Uniprot: A0N1R5; SEQ ID NO: 3381), слитого с синтетическим геном, кодирующим различные варианты GAA) в pcDNA3.1(+) или рDH. ПЦР амплификацию проводят с оптимизацией, общеизвестной специалистам в данной области техники, с парой праймеров (SEQ ID NO: 3387 и 3388) для pcDNA3.1(+) и парой праймеров (SEQ ID NO: 3385 и 3386; или SEQ ID NO: 3387 и 3388) для рDH. В некоторых случаях, используют тиофосфоротиоатные праймеры.

## **ПРИМЕР 2**

### **Высокопроизводительный рост *Saccharomyces cerevisiae* и анализы GAA**

В этом примере описаны эксперименты, включающие высокопроизводительный

рост клеток, продуцирующих варианты GAA, и анализы для определения активности GAA.

#### **Высокопроизводительный (НТП) рост *S. cerevisiae***

Клетки дрожжей (INVSc1), трансформированные векторами, экспрессирующими GAA и варианты GAA, с использованием известного в данной области техники способа с ацетатом лития, селективируют на чашках с агаром SD-Ura. После 72 ч инкубации при 30°C, колонии помещают в лунки 1,1 мл 96-луночных планшетов AXYGEN® (Axygen), заполненных 200 мкл/лунку бульоном SD-Ura (2 г/л SD-Ura, 6,8 г/л дрожжевой азотной основы без аминокислот [Sigma Aldrich]), 3,06 г/л дигидрофосфата натрия, 0,804 г/л гидрофосфата динатрия, pH 6,0, с добавлением 6% глюкозы. Клетки выращивают в течение 20-24 часов на шейкере Kuhner (250 об/мин, 30°C, относительная влажность 85%). Образцы ночных культур (20 мкл) переносят в глубокие 96-луночные планшеты COSTAR® (Corning), заполненные 380 мкл бульона SD-ura с добавлением 2% глюкозы. Планшеты инкубируют в течение 66-84 ч на шейкере Kuhner (250 об/мин, 30°C и относительная влажность 85%). Затем клетки осаждают (4000 об/мин x 20 мин), и супернатанты (кондиционированные среды) хранят при 4°C до анализа.

#### **НТП-анализ супернатантов**

Активность варианта GAA определяют путем измерения гидролиза 4-метилумбеллиферил  $\alpha$ -D-глюкопиранозида (4-MUGlu). Для не спровоцированного анализа, 50 мкл кондиционированной среды SD-URA, полученной, как описано выше, смешивают с 50 мкл 1 mM 4-MUGlu в буфере McIlvaine (McIlvaine, J. Biol. Chem., 49:183-186 [1921]), pH 4,5, в 96-луночном планшете с черным непрозрачным дном. Реакции быстро перемешивают и инкубируют при 37°C в течение 4-24 часов перед гашением 100 мкл 0,5 M карбоната натрия, pH 10,5. Гидролиз анализируют с использованием микропланшетного ридера SPECTRAMAX® M2 (Molecular Devices) путем мониторинга флуоресценции (возб. 355 нм, исп. 460 нм).

#### **НТП-анализ супернатантов, спровоцированных нейтральным буфером**

Варианты GAA подвергают провокации буфером от нейтрального до близкого к нейтральному (pH 6,5-7,5), чтобы имитировать pH, с которым варианты сталкиваются в крови после их введения пациенту. Сначала в лунки 96-луночного круглодонного планшета добавляют 50 мкл вариантов GAA в среде, кондиционированной SD-URA, и 50 мкл буфера McIlvaine (pH 6,5-7,4). Планшеты запечатывают и инкубируют при 37°C в течение 1 часа. Затем 50 мкл каждого зараженного образца смешивают с 50 мкл 1 mM 4-MUGlu в буфере McIlvaine с pH 4,4. Реакционные смеси быстро перемешивают и инкубируют при 37°C в течение 4-24 часов перед гашением 100 мкл 0,5 M карбоната натрия, pH 10,5. Гидролиз анализируют с использованием планшетного ридера SPECTRAMAX® M2 (Molecular Devices) путем мониторинга флуоресценции (возб. 355 нм, исп. 460 нм).

#### **НТП-анализ супернатантов, предварительно обработанных кислотой**

Варианты GAA подвергают провокации кислым (pH 3) буфером для имитации pH,

с которым варианты сталкиваются в лизосомах после их введения пациенту. Сначала, в лунки 96-луночного круглодонного планшета добавляют 50 мкл вариантов GAA в среде, кондиционированной SD-URA, и 50 мкл буфера McIlvaine (pH 3). Планшеты запечатывают и инкубируют при 37°C в течение 1 часа. Затем, 50 мкл каждого спровоцированного образца смешивают с 50 мкл 1 mM 4-MUGlu в буфере McIlvaine с pH 4,4. Реакционные смеси быстро перемешивают и инкубируют при 37°C в течение 4-24 часов перед гашением 100 мкл 0,5 M карбоната натрия, pH 10,5. Гидролиз анализируют с использованием микропланшетного ридера SPECTRAMAX® M2 (Molecular Devices) с мониторингом флуоресценции (возб. 355 нм, исп. 460 нм).

### **НТР-анализ супернатантов с гликогеновым субстратом**

Гидролитическую активность вариантов GAA определяют путем измерения гидролиза гликогена до глюкозы. Для незараженного анализа 50 мкл кондиционированной среды SD-URA, полученной, как описано выше, смешивают с 50 мкл 5 mM гликогена в буфере McIlvaine с pH 4,5 (7,71 мл 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и 12,29 мкл 0,1 M лимонной кислоты) в 96-луночном, черном планшете с непрозрачным дном. Реакционные смеси быстро перемешивают и инкубируют при 37°C в течение 24 часов. После инкубации, 20 мкл реакционных смесей гидролиза гликогена смешивают с 80 мкл набора AMPLEX® Red Glucose Assay Kit (Sigma) для определения содержания глюкозы в каждой реакции. Гидролиз анализируют с использованием микропланшетного ридера SPECTRAMAX® M2 (Molecular Devices) путем мониторинга флуоресценции (возб. 544 нм, исп. 585 нм).

### **ПРИМЕР 3**

#### **GAA и варианты GAA**

Активность GAA и варианта GAA определяют путем анализа активности фермента после серии независимых провокаций. Результаты для всех вариантов и замен в каждой из полипептидных последовательностей представлены со ссылкой на SEQ ID NO: 2. Эти варианты тестируют на активность GAA 4-MUGlu (неспровоцированная активность FIORC) после инкубации при pH 6,5 (стабильности активности при pH 6,5 FIORC) и гидролиза гликогена (активность гликогена FIORC), как описано в примере 2. В таблицах 3-1 и 3-2 представлены результаты этих анализов.

| <b>SEQ ID NO:<br/>(нт/ак)</b> | <b>Аминокислотные различия<br/>(относительно SEQ ID NO: 2)</b> | <b>Неспровоцированная активность FIORC</b> | <b>pH 6.5 стабильность активности FIORC</b> | <b>Активность гликогена FIORC</b> |
|-------------------------------|--|--|---|-----------------------------------|
| 21/22                         | A276F  | ++   | +++   | +                                 |
| 23/24                         | A276Y  | +++  | +++   | +                                 |
| 25/26                         | A418E/H499R  |  |   | ++                                |
| 27/28                         | A418R  |  | ++  | +                                 |

|       |             |    |     |     |
|-------|-------------|----|-----|-----|
| 29/30 | A437S       | +  | +   |     |
| 31/32 | A444T       |    | ++  | +   |
| 33/34 | A489R       | ++ | ++  | +++ |
| 35/36 | A547G       | +  | ++  |     |
| 37/38 | A750P       | +  | +   | +   |
| 39/40 | A753T       | +  | +   | +   |
| 41/42 | C930R       | +  | +   | +   |
| 43/44 | C944G       | +  | +   | +   |
| 45/46 | C944R       | +  | +   | +   |
| 47/48 | D274G       |    | ++  |     |
| 49/50 | E137P       | +  | ++  | +   |
| 51/52 | E463A       |    | ++  | +   |
| 53/54 | F27P        | ++ | ++  | +   |
| 55/56 | F27P/C944W  | ++ | ++  | ++  |
| 57/58 | F27R        |    | +++ | ++  |
| 59/60 | G426R       |    | ++  | +   |
| 61/62 | G820E       |    | ++  | +   |
| 63/64 | I375E       | ++ | ++  | +   |
| 65/66 | K471Q/A478S | +  | +   | +   |
| 67/68 | K471S       | +  | +   |     |
| 69/70 | K581G       | +  |     | +   |
| 71/72 | K581T       | ++ | ++  | ++  |
| 73/74 | K725N/V732I | +  | ++  |     |
| 75/76 | K88G        | ++ | ++  |     |
| 77/78 | K88S        |    | ++  |     |
| 79/80 | K895R       |    | ++  | ++  |
| 81/82 | L109G/G842E | ++ | +++ | +   |
| 83/84 | L109P       | +  | +   | +   |
| 85/86 | L28P        | ++ | +   | +   |
| 87/88 | L28R        | ++ | +   | ++  |
| 89/90 | L28S        | ++ | ++  | ++  |
| 91/92 | L29T/A478T  | +  | ++  | ++  |
| 93/94 | L642M       | ++ | ++  | +   |
| 95/96 | L642Q       | ++ | ++  | +   |



|         |       |    |      |    |
|---------|-------|----|------|----|
| 97/98   | L642S | ++ | ++   | +  |
| 99/100  | L670N |    | ++   |    |
| 101/102 | L871E |    | ++   | +  |
| 103/104 | L934R | ++ | ++   | ++ |
| 105/106 | M138A | +  | +    | ++ |
| 107/108 | N527R |    | ++   | +  |
| 109/110 | Q107G |    | ++   | +  |
| 111/112 | Q107P |    |      | +  |
| 113/114 | Q110G |    | +++  | +  |
| 115/116 | Q110L |    | ++   | +  |
| 117/118 | Q113S | +  | +    | ++ |
| 119/120 | Q247R |    | +    | +  |
| 121/122 | Q421S |    |      | +  |
| 123/124 | R403W | +  | +    | +  |
| 125/126 | R414P | +  | +    | ++ |
| 127/128 | R455V |    |      | ++ |
| 129/130 | R786P |    | ++   | +  |
| 131/132 | R786Y |    | ++   |    |
| 133/134 | R862G |    | ++   | +  |
| 135/136 | S135A |    | ++   | +  |
| 137/138 | S135Q | +  | +++  | ++ |
| 139/140 | S476A |    | ++   | +  |
| 141/142 | S476H |    | ++   |    |
| 143/144 | S668H | ++ | ++++ |    |
| 145/146 | T148G | ++ | ++   | +  |
| 147/148 | T148Y | +  | +    |    |
| 149/150 | T150G | ++ | ++   | ++ |
| 151/152 | T278A | +  | +    |    |
| 153/154 | T278G |    | ++   | +  |
| 155/156 | T692Q | +  | +    | +  |
| 157/158 | T897V |    | ++   |    |
| 159/160 | V30G  |    | +++  | ++ |
| 161/162 | V30K  | ++ | ++   | +  |
| 163/164 | V30T  | ++ | ++   | +  |

|         |       |    |    |   |
|---------|-------|----|----|---|
| 165/166 | W610A | ++ | +  |   |
| 167/168 | W610G | ++ | ++ |   |
| 169/170 | W610S | +  | ++ | + |

<sup>1</sup>Всю активность определяют относительно эталонного полипептида с SEQ ID NO: 2. Уровни повышенной активности определены следующим образом: «+»=0,9 до 1,1; «++» >1,1; «+++» >2; и «++++» >3,5.

**Таблица 3-2. Активность вариантов ГАА относительно SEQ ID NO: 2<sup>1</sup>**

| <b>SEQ ID NO:<br/>(нт/ак)</b> | <b>Аминокислотные различия<br/>(относительно SEQ ID NO: 2)</b>      | <b>Неспровоцированная активность<br/>ФИОРС</b> | <b>pH 6.5<br/>стабильность<br/>активности<br/>ФИОРС</b> | <b>активность<br/>гликогена<br/>ФИОРС</b> |
|-------------------------------|---|--|---|---|
| 171/172                       | G280D/S402A/V536I/D928T   |  |   | ++  |
| 173/174                       | H191R/G280D/S402A/R414G<br>/A444P/G465E/G842S/D928T                 | +  | +   | ++  |
| 175/176                       | L275V/A281V/S671N   | ++   | +   | ++  |
| 177/178                       | K106P/H191R/R414G/A444P/<br>E522V/D928T/C944S                       | ++   | +   | +   |
| 179/180                       | H191R/G280D/R414G/A444P<br>/A489D/D500A/E522V/G842<br>S/D928T/C944S | ++   | ++  | ++  |
| 181/182                       | K106P/H191R/R414G/A489D<br>/D928T/C944S                             | ++   | ++  |   |
| 183/184                       | L275M/A281V/S402A/M431<br>V/M507L/I518V/W610R/S66<br>8D             | ++   | +   | ++  |
| 185/186                       | L275M/M507L/A547G/S668<br>D/L669H/S671N                             | ++   | ++  | +   |
| 187/188                       | L275M/M431V/V638I   | ++   | ++  | ++  |
| 189/190                       | A281V/S402A/I518V/A547G/<br>S668D                                   | ++   | ++  | +   |
| 191/192                       | L275V/I518V/S671N   | ++   | ++  | +   |
| 193/194                       | L275V/M431V/M507L/I518V<br>/A547G/S668D/L669H/S671N                 | ++   | ++  | +   |

|         |   |    |    |    |
|---------|---|----|----|----|
| 195/196 | S402A/M431V/I518V/W610R                                 | ++ | ++ | +  |
| 197/198 | K106P/H191R/G280D/S402A<br>/R414G/A444P/S727P           | ++ | ++ | +  |
| 199/200 | M431V/M507L/I518V/L669H<br>/S671N                       | ++ | ++ | +  |
| 201/202 | L275V/R377K/S402A/M507L<br>/I518V/L669H/S671N/V715G     | ++ | ++ | +  |
| 203/204 | H191R/R414G/E522V/G842S<br>/C944S                       | ++ | ++ | +  |
| 205/206 | H191R/G280D/R414G/A489<br>D/G842S/D928T/C944S           | ++ | ++ | +  |
| 207/208 | L275M/A281V/W610R/V638I<br>/S668D/L669H                 | ++ | ++ | +  |
| 209/210 | A196V/S402A/M431V/A547<br>G/W610R/V638I                 | ++ | ++ | ++ |
| 211/212 | H191R/G280D/S402A/R414G<br>/A444P/A489D/D500A/C944<br>S | ++ | ++ | +  |
| 213/214 | L275V/S402A/V638I/L669H/<br>S671N                       | ++ | ++ | +  |
| 215/216 | L29Q/L240I/A596P/S668D/I8<br>69L                        | ++ | ++ | ++ |
| 217/218 | K106P/G280D/S402A/R414G<br>/A444P/A489D/S727P/C944S     | ++ | ++ | ++ |
| 219/220 | L29Q/L240I/A596S/S668D/H<br>700F/I744V/I869T            | ++ | ++ | +  |
| 221/222 | L218S/S668D/H700F/I869T                                 | ++ | ++ | +  |
| 223/224 | M507L/A547G/W610R                                       | ++ | ++ |    |
| 225/226 | A281V/M431V/M507L/I518V<br>/A547G/W610R/V638I/S668D     | ++ | ++ | ++ |
| 227/228 | H191R/G280D/R414G/A444P<br>/A489D/E522V/S727P/C944S     | ++ | ++ | +  |
| 229/230 | L275V/S402A/M431V/I518V/<br>W610R/V638I/L669H/S671N/    | ++ | ++ |    |

|         |   |    |    |    |
|---------|---|----|----|----|
|         | P922L   |    |    |    |
| 231/232 | L29V/L218S/L240I/H700F/I8<br>69T                        | ++ | ++ | +  |
| 233/234 | A547G/V638I/S668D                                       | ++ | ++ | +  |
| 235/236 | H191R/G280D/R414G/C944S                                 | ++ | ++ | +  |
| 237/238 | L275V/M431V/M507L/I518V<br>/W610R/L669H/S671N           | ++ | ++ |    |
| 239/240 | L275M/S402A/M431V/M507<br>L/A547G/S671N                 | ++ | ++ |    |
| 241/242 | S402A/M431V/A547G/V638I<br>/S671N                       | ++ | ++ | +  |
| 243/244 | A281V/S402A/M507L/A547<br>G/V638I/L669H/S671N           | ++ | ++ | +  |
| 245/246 | L275M/A281V/M507L/A547<br>G/L669H/S671N                 | ++ | ++ |    |
| 247/248 | L275M/M431V/I518V/A547G<br>/V638I/S668D                 | ++ | ++ |    |
| 249/250 | A547G/W610R/V638I/S671N                                 | ++ | ++ | +  |
| 251/252 | L275V/M431V/M507L/A547<br>G/W610R/V638I/S671N           | ++ | ++ | +  |
| 253/254 | L275M/S402A/M507L/A547<br>G/W610R/S671N                 | ++ | ++ |    |
| 255/256 | L275M/A281V/S402A/I518V/<br>A547G/W610R/V638I/S671N     | ++ | ++ |    |
| 257/258 | A281V/S402A/I518V/A547G/<br>W610R/V638I/S668D/L669H     | ++ | ++ |    |
| 259/260 | L275M/A281V/S402A/A547<br>G/W610R/V638I/L669H/S671<br>N | ++ | ++ |    |
| 261/262 | L275M/M431V/I518V/W610<br>R/V638I/L669H/S671N           | ++ | ++ | +  |
| 263/264 | L29Q/L218S/L240I/S668D/H<br>700F/I744V/I869L            | ++ | ++ | ++ |
| 265/266 | A281V/S402A/M507L/I518V/<br>/S671N                      | ++ | ++ | +  |

|         |   |    |     |    |
|---------|---|----|-----|----|
|         | A547G/W610R/V638I/L669H<br>/S671N                             |    |     |    |
| 267/268 | S402A/M431V/I518V/A547G<br>/S671N                             | ++ | ++  |    |
| 269/270 | L275V/A281V/S402A/M431<br>V/I518V/A547G/W610R/L66<br>9H/S671N | ++ | ++  |    |
| 271/272 | L224F/S402A/M507L/I518V/<br>A547G/V638I/S668D                 | ++ | ++  | ++ |
| 273/274 | N180H/S402A/M507L/A547<br>G/W610R/S671N                       | ++ | ++  | +  |
| 275/276 | L275M/A281V/S402A/M507<br>L/I518V/A547G/V638I/L669<br>H/S671N | ++ | ++  |    |
| 277/278 | K106P/T150S/T486E/Q749E/<br>E793K/R883H/Q894G                 | ++ | +++ | ++ |
| 279/280 | L275V/A281V/M431V/I518V<br>/A547G/V638I/L669H/S671N           | ++ | ++  |    |
| 281/282 | L275V/S402A/A547G/W610R<br>/V638I/L669H/S671N                 | ++ | ++  |    |
| 283/284 | L275M/S402A/A547G/V638I/<br>L669H/S671N                       | ++ | ++  | +  |
| 285/286 | K106P/T150S/T486E/N527D/<br>A750P/E793K                       | ++ | +++ | ++ |
| 287/288 | S402A/M431V/I518V/A547G<br>/W610R/S668D                       | ++ | ++  |    |
| 289/290 | T150S/L218S/N527D/Q749E/<br>E793K                             | ++ | +++ | ++ |
| 291/292 | L275V/M507L/I518V/A547G/<br>V638I/L669H/S671N                 | ++ | ++  | +  |
| 293/294 | N180H/S402A/M431V/M507<br>L/A547G/W610R/L669H/S67<br>1N/E793G | ++ | ++  |    |
| 295/296 | L275V/M507L/I518V/A547G/<br>/S671N                            | ++ | ++  | +  |

|         |   |     |     |    |
|---------|---|-----|-----|----|
|         | W610R/V638I/S668D/L669H                                       |     |     |    |
| 297/298 | L275V/S402A/M507L/A547G<br>/W610R/V638I/S668D/L669H           | ++  | ++  | +  |
| 299/300 | M507L/A547G/V638I/L669H/<br>S671N                             | +++ | ++  | +  |
| 301/302 | K106P/T150S/N169S/L218S/<br>Q749E/P800A                       | +++ | +++ | ++ |
| 303/304 | T150S/R414G/T486E/Q749E/<br>A750P/E793K                       | +++ | +++ | ++ |
| 305/306 | K106P/T150S/L218S/R414G/<br>T486E/L642F/A750P/E793K/<br>R883H | +++ | +++ | ++ |
| 307/308 | N180H/L275M/S402A/I518V/<br>A547G/W610R/V638I/L669H<br>/S671N | +++ | ++  |    |
| 309/310 | T150S/L218S/R414G/Q749E/<br>E793K                             | +++ | +++ | +  |
| 311/312 | L275V/M507L/A547G/W610<br>R/V638I/L669H/S671N                 | +++ | ++  | +  |
| 313/314 | T150S/R414G/T486E/N527D/<br>A750P/Q894R                       | +++ | +++ | ++ |
| 315/316 | K106P/T150S/L218S/N527D/<br>E793K/Q894G                       | +++ | +++ | ++ |
| 317/318 | T150S/N169S/L218S/R414G/<br>N527D/E793K                       | +++ | +++ | ++ |
| 319/320 | K106P/T150S/L218S/E793K                                       | +++ | +++ | ++ |
| 321/322 | K106P/T150S/R414G/Q749E/<br>A750P/E793K/Q894R                 | +++ | +++ | ++ |
| 323/324 | K106P/T150S/N169S/N527D/<br>Q749E/E793K/R883H                 | +++ | +++ | ++ |
| 325/326 | L275V/S402A/M507L/A547G<br>/W610R/V638I/L669H/S671N           | +++ | ++  | +  |
| 327/328 | K106P/T150S/L218S/Q749E/<br>A750P/E793K                       | +++ | +++ | ++ |

|         |   |     |     |    |
|---------|---|-----|-----|----|
| 329/330 | M431V/M507L/I518V/G541E<br>/A547G/V638I/L669H/S671N                 | +++ | +++ | +  |
| 331/332 | T150S/L218S/R414G/T486A/<br>A750P/E793K                             | +++ | +++ | ++ |
| 333/334 | T150S/L218S/Q749E/A750P/<br>E793K                                   | +++ | +++ | ++ |
| 335/336 | K106P/T150S/N169S/L218S/<br>R414G/T486E/Q894R                       | +++ | +++ | ++ |
| 337/338 | T150S/L218S/R414G/T486E/<br>A750P/E793K/R883H                       | +++ | +++ | ++ |
| 339/340 | K106P/T150S/N169S/L218S/<br>R414G/Q749E/E793K                       | +++ | +++ | ++ |
| 341/342 | T269N/L275M/M431V/I518V<br>/A547G/V638I/S668D/L669H                 | +++ | +++ |    |
| 343/344 | K106P/T150S/R414G/Q749E/<br>E793K/Q894R                             | +++ | +++ | ++ |
| 345/346 | K106P/T150S/L218S/N527D/<br>Q749E/A750P/E793K                       | +++ | +++ | ++ |
| 347/348 | K106P/T150S/N169S/Q749E/<br>E793K/R883H/Q894R                       | +++ | +++ | ++ |
| 349/350 | K106P/T150S/L218S/E793K/<br>Q894R                                   | +++ | +++ | ++ |
| 351/352 | K106P/T150S/N169S/L218S/<br>T486E/N527D/Q749E/E793K/<br>Q894R       | +++ | +++ | ++ |
| 353/354 | K106P/T150S/L218S/R414G/<br>T486E/A750P/E793K/Q894R                 | +++ | +++ | ++ |
| 355/356 | K106P/T150S/N169S/L218S/<br>R414G/T486E/Q749E/E793K/<br>R883H/Q894R | +++ | +++ | ++ |
| 357/358 | K106P/T150S/N169S/L218S/<br>T486E/R883H                             | +++ | +++ | ++ |
| 359/360 | K106P/T150S/N169S/L218S/<br>R414G/T486E/A750P/E793K/                | +++ | +++ | ++ |

|         |   |     |      |     |
|---------|---|-----|------|-----|
|         | R883H/Q894R   |     |      |     |
| 361/362 | G36R/K106P/T150S/L218S/N<br>527D/A750P/R883H/Q894R            | +++ | +++  | ++  |
| 363/364 | K106P/T150S/N169S/L218S/<br>T486E/Q749E/R883H                 | +++ | +++  | ++  |
| 365/366 | K106P/N169S/V185G/L218S/<br>R414G/Q749E/A750P/E793K           | +++ | +++  | ++  |
| 367/368 | K106P/T150S/P245S/E793K/<br>R883H/Q894R                       | +++ | +++  | +++ |
| 369/370 | K106P/T150S/N169S/L218S/<br>R414G/Q749E/A750P/E793K/<br>R883H | +++ | +++  | ++  |
| 373/374 | T150S/L218S/Q749E/E793K                                       | +++ | +++  | ++  |
| 375/376 | T150S/L218S/R414G/Q749E/<br>A750P/E793K/Q894R                 | +++ | +++  | ++  |
| 377/378 | K106P/T150S/N169S/R414G/<br>T486E/Q749E/A750P/R883H           | +++ | +++  | ++  |
| 379/380 | K106P/T150S/N169S/L218S/<br>R414G/T486E/E793K/R883H           | +++ | +++  | ++  |
| 381/382 | K106P/T150S/L218S/T486E/<br>N527D/Q749E/Q894R                 | +++ | +++  | ++  |
| 383/384 | K106P/T150S/N169S/L218S/<br>R414G/T486E/N527D/Q894R           | +++ | +++  | ++  |
| 385/386 | T150S/L218S/R414G/T486E/<br>Q749E/A750P                       | +++ | +++  | ++  |
| 387/388 | K106P/T150S/L218S/R414G/<br>Q749E/E793K/R883H                 | +++ | +++  | ++  |
| 389/390 | K106P/T150S/N169S/L218S/<br>R414G/T486E/N527D/A750P/<br>Q894R | +++ | +++  | ++  |
| 391/392 | N169S/T486E/A750P/E793K/<br>R883H                             | +++ | +++  | ++  |
| 7/8     | T150S/T486E/A750P/R883H/<br>Q894G                             | +++ | ++++ | +++ |



|  |   |      |      |     |
|--|---|------|------|-----|
| 393/394  | K106P/T150S/L218S/R414G/<br>N527D/Q749E/A750P/R883H                 | +++  | ++++ | ++  |
| 395/396  | K106P/T150S/L218S/R414G/<br>Q749E/A750P/E793K/R883H/<br>Q894R       | +++  | +++  | ++  |
| 397/398  | K106P/T150S/N169S/L218S/<br>R414G/Q749E/E793K/R883H                 | +++  | ++++ | ++  |
| 399/400  | K106P/T150S/L218S/T486E/<br>E793K/R883H                             | +++  | +++  | ++  |
| 401/402  | K106P/T150S/L218S/V331A/<br>R414G/T486E/N527D/D733E/<br>Q749E/E793K | +++  | ++++ | ++  |
| 403/404  | L275M/A281V/S402A/I518V/<br>A547G/W610R/S668D/L669H<br>/E887D       | +++  | +++  | ++  |
| 405/406  | K106P/T150S/L218S/R414G/<br>N527D/Q749E/E793K/R883H<br>/Q894G       | +++  | +++  | ++  |
| 407/408  | K106P/T150S/Q749E/E793K/<br>R883H                                   | +++  | ++++ | +++ |
| 409/410  | K106P/A112S/T150S/L218S/<br>R414G/N527D/E793K/R883H                 | ++++ | ++++ | +++ |
| <sup>1</sup> Всю активность определяют относительно эталонного полипептида с SEQ ID NO: 2.<br>Уровни повышенной активности определены следующим образом: «+»=0,9 до 1,1; «++»<br>>1,1; «+++» >2; и «++++» >3,5 |   |      |      |     |

#### **ПРИМЕР 4**

##### **Варианты GAA SEQ ID NO: 8**

В этом примере описан анализ вариантов GAA, полученных из SEQ ID NO: 8, на улучшенную активность GAA после ряда испытаний. Направленную эволюцию GAA, кодируемой SEQ ID NO: 8, проводят путем конструирования библиотек вариантных генов. Затем эти библиотеки высевают, выращивают и подвергают скринингу на активность GAA 4-MUGlu после анализа активности неспровоцированной, без предварительной инкубации (неспровоцированная активность FIOPC), после инкубации при pH 7 (стабильность активности при pH 7 FIOPC) или после инкубации при pH 3 (стабильность активности при pH 3 FIOPC), как описано в примере 2. Результаты представлены в таблице 4-1.

| <b>Таблица 4-1. Активность вариантов ГАА относительно SEQ ID NO: 8<sup>1</sup></b> |  |  |  |   |
|--|--|--|--|---|
| <b>SEQ ID NO:<br/>(нт/ак)</b>  | <b>Аминокислотные различия<br/>(относительно<br/>SEQ ID NO: 8)</b> | <b>Неспровоц<br/>ированная<br/>активност<br/>ь FIOPC</b> | <b>pH 3 стабиль<br/>ность<br/>активности<br/>FIOPC</b> | <b>pH 7<br/>стабильность<br/>активности<br/>FIOPC</b> |
| 411/412  | A281V/M431V/A489R/S668D  | +++  | +++  | +++   |
| 413/414  | A418E  | ++++   | +++++  | ++++  |
| 415/416  | A418E/A489R  | +  | ++   | +   |
| 417/418  | A489R/L934R  | +  | +  |   |
| 419/420  | A489R/Q749E  | +  | +  |   |
| 421/422  | A489R/S671N/L934R  | +  | +  |   |
| 423/424  | A489R/V638I/L934R  | ++   | ++   | ++  |
| 425/426  | F27P/A418E/A478T   | +  | +  | +++   |
| 427/428  | F27P/L28S/A489R  | +  | +++  | ++  |
| 429/430  | F27R   | +  | +  | ++  |
| 431/432  | K106P  | ++   | +++  | ++  |
| 433/434  | K106P/A489R/S671N  | +++  | ++   | +++   |
| 435/436  | K106P/L218S/A281V  | ++   | +++  | ++  |
| 437/438  | K106P/L218S/R455V  | +++  | +++  | +++   |
| 439/440  | K106P/L218S/R455V/M507L/<br>Q749E                                  | +++  | +++  | +++   |
| 441/442  | K106P/M138A/L218S/M431V<br>/S671N/Q749E                            | +++  |  | ++  |
| 443/444  | K106P/S671N/L934R  | +  |  | +   |
| 445/446  | K106P/V638I  | +  | +++  | +   |
| 447/448  | L157M  | +++  | +++  | +++   |
| 449/450  | L218S  | +  | ++   | +   |
| 451/452  | L218S/A281V  | ++   | +++  | ++  |
| 453/454  | L218S/A281V/M431V  | +++  | +++  | +++   |
| 455/456  | L218S/A281V/S671N  | +  |  |   |
| 457/458  | L218S/M431V  | +  | +  |   |
| 459/460  | L218S/M431V/A489R/M507L<br>/Q749E/L934R                            | +++  | ++   | +++   |
| 461/462  | L218S/M507L/L934R  | +  | +  | +   |

|         |                               |     |      |     |
|---------|-------------------------------|-----|------|-----|
| 463/464 | L218S/M507L/Q749E             | +++ | ++   | +++ |
| 465/466 | L218S/Q749E                   | +++ | +++  | +++ |
| 467/468 | L218S/R455V                   | +   | +    | +   |
| 469/470 | L218S/V638I/S671N             | +++ | +++  | +++ |
| 471/472 | L28S                          | +   | ++   | +   |
| 473/474 | L28S/L29T                     | +   | +    | +   |
| 475/476 | L28S/L29T/A418E               | ++  | +++  | ++  |
| 477/478 | L28S/L29T/Q113S/S135Q/A418E   | +   | ++++ | +++ |
| 479/480 | L28S/L29T/Q113S/S135Q/M138A   | +   | +    | +   |
| 13/14   | L28S/L29T/S135Q               | +++ | ++++ | +++ |
| 481/482 | L29T/A478T                    | +   |      | +   |
| 483/484 | L29T/Q113S/M138A              | +   | +    | +   |
| 485/486 | L29T/Q113S/P126Q/S135Q/H193Q  | +   | +++  | ++  |
| 487/488 | L29T/Q113S/S135Q              | ++  | +++  | ++  |
| 489/490 | L29T/Q113S/S135Q/R455V        | +   | +    | +   |
| 491/492 | L29T/T148G                    | +++ | +++  | +++ |
| 493/494 | M138A/L218S/Q749E/L934R       | +   | +    |     |
| 495/496 | M138A/L218S/S668D/S671N       | +++ | ++   | +++ |
| 497/498 | M138A/S671N/Q749E/L934R       | +++ | ++   | +++ |
| 499/500 | M431V/S668D/S671N             | +   | +    | +   |
| 501/502 | M507L/S668D                   | +   | +    | +   |
| 503/504 | M507L/S671N/L934R             | +++ | +++  | +++ |
| 505/506 | P4H                           | +   | ++   | +   |
| 507/508 | Q113S                         | +   | ++   | +   |
| 509/510 | Q113S/A418E/A478T/A489R/K581T | +   | +    | +   |
| 511/512 | Q113S/A418E/R455V/A478T/K581T | +   | +    | +   |
| 513/514 | Q113S/S135Q/A418E             | ++  | +++  | +++ |
| 515/516 | Q345K/L934R                   | +   | ++   |     |
| 517/518 | Q749E/A784T                   | +++ | +++  | ++  |

|         |                         |     |     |     |
|---------|-------------------------|-----|-----|-----|
| 519/520 | S135P/C944Y             | +++ | +++ | +++ |
| 521/522 | S135Q                   | +   | ++  | +   |
| 523/524 | S135Q/A478T/A489R/K581T | +   |     | +   |
| 525/526 | S135Q/A489R             | +   | +++ | ++  |
| 527/528 | S135Q/T148G/S150G/A418E | +   | +++ | +   |
| 529/530 | S671N/L934R             | +++ | ++  | +++ |
| 531/532 | S671N/Q749E             | +++ | +++ | +++ |

<sup>1</sup>Всю активность определяют относительно эталонного полипептида с SEQ ID NO: 8. Уровни повышенной активности определены следующим образом: «+»=0,5-0,9; «++» 0,9-1,1; «+++» >1,1; «++++» >2; и «+++++» >3,5.

### ПРИМЕР 5

#### **Высокопроизводительный рост адгерентных клеток млекопитающих и анализы GAA, полученные с помощью адгерентной экспрессии у млекопитающих** **Высокопроизводительный (НТР) рост GAA и вариантов GAA в адгерентных клетках млекопитающих (НЕК293Т)**

Клетки НЕК 293Т трансфицируют вектором pcDNA 3.1(+) (ThermoFisher Scientific), вектором pDH или ПЦР-амплифицированной линейной ДНК (как описано в примере 1), кодирующей синтетический сигнальный пептид IG мыши (SEQ ID NO: 3381 и 3382), слиянием с GAA дикого типа или вариантами GAA способом липофекции с реагентом LIPOFECTAMINE® 3000 (ThermoFisher Scientific). Клетки НЕК 293Т культивируют в стандартной полной питательной среде (DMEM с 10% фетальной бычьей сывороткой [оба от Corning]) и высевают в 96-луночный планшет NUNC® Edge 2.0 (ThermoFisher Scientific) при плотности  $0,5 \times 10^5$  клеток/лунку/250 мкл для прилипания и роста в течение 24 часов при 37°C и в присутствии 5% CO<sub>2</sub> до трансфекции, опосредованной липофекцией. После трансфекции клетки инкубируют в течение 24-96 часов, чтобы обеспечить экспрессию и секрецию вариантов GAA в кондиционированные среды. Кондиционированные среды (20-100 мкл) после трансфекции НЕК293Т затем переносят в новые 96-луночные планшеты для определения активности, стабильности или поглощения в клеточном анализе.

#### **НТР-анализ супернатантов**

Активность варианта GAA определяют путем измерения гидролиза 4-метилумбеллиферил α-D-глюкопиранозида (4-MUGlu). Для неспровоцированного анализа 20 мкл кондиционированной среды НЕК 293Т, полученной, как описано выше, смешивают с 50 мкл 1,5 мМ 4-MUGlu в буфере McIlvaine (McIlvaine, J. Biol. Chem., 49:183-186 [1921]), pH 4,4, в 96-луночном планшете с черным непрозрачным дном. Реакции инкубируют при 25-37°C в течение 30-60 минут при перемешивании со скоростью 400 об/мин перед гашением 100 мкл 0,5 М карбоната натрия, pH 10,5. Гидролиз анализируют с использованием микропланшетного ридера SPECTRAMAX® M2

(Molecular Devices) или микропланшетного ридера ENVISION® (Perkin Elmer) с мониторингом флуоресценции (возб. 355 нм, исп. 460 нм).

#### **НТР-анализ супернатантов, спровоцированных нейтральным буфером**

Варианты GAA провоцируют нейтральным буфером для имитации pH, с которым варианты сталкиваются в крови после их введения пациенту. Сначала 20 мкл кондиционированной среды, содержащей варианты GAA из экспрессии НЕК 293Т, объединяют со 100 мкл буфера DPBS (pH 7,4) в 96-луночном планшете. Планшеты запечатывают и инкубируют при 37°C в течение 24-96 часов. Затем 20 мкл образца с нейтральным pH смешивают с 50 мкл 1,5 mM 4-MUGlu в буфере McIlvaine, pH 4,4. Реакции инкубируют при 37°C в течение 180 минут при перемешивании со скоростью 400 об/мин перед гашением 100 мкл 0,5 М карбоната натрия, pH 10,5. Гидролиз анализируют с использованием микропланшетного ридера SPECTRAMAX® M2 или микропланшетного ридера ENVISION® (Perkin Elmer) с мониторингом флуоресценции (возб. 355 нм, исп. 460 нм).

#### **НТР-анализ супернатантов, спровоцированных плазмой**

Варианты GAA подвергают провокации плазмой, чтобы имитировать условия, с которыми варианты сталкиваются в крови после их введения пациенту. Сначала 30 мкл кондиционированной среды, содержащей варианты GAA из экспрессии НЕК 293Т, объединяют с 30 мкл плазмы (Innovative Research, Innovative Grade US Origin Monkey Cynomolgus Plasma K2 EDTA) в 96-луночном планшете. Планшеты запечатывают и инкубируют при 37°C в течение 2-4 часов. Затем 10 мкл образца, зараженного плазмой, смешивают с 50 мкл 1,5 mM 4-MUGlu в буфере McIlvaine, pH 4,4. Реакции инкубируют при 25-37°C в течение 15-60 минут при перемешивании со скоростью 400 об/мин перед гашением 100 мкл 0,5 М карбоната натрия, pH 10,5. Гидролиз анализируют с использованием микропланшетного ридера SPECTRAMAX® M2 или микропланшетного ридера ENVISION® (Perkin Elmer) с мониторингом флуоресценции (возб. 355 нм, исп. 460 нм).

#### **НТР-анализ активности GAA в лизатах фибробластов Помпе и нокаутных миобластов C2C12 GAA**

Варианты GAA, полученные в НТР, инкубируют с клетками-мишенями и анализируют на остаточную внутриклеточную активность через 24 часа. Для этих экспериментов используют клетки млекопитающих, лишенные функциональной активности GAA, а именно фибробласты, полученные от пациентов с Помпе (Coriell Institute for Medical Research # GM00248) и миобласты C2C12, чей нативный ген GAA нокаутирован с помощью редактирования Crispr-Cas9. В этих экспериментах, фибробласты Помпе или нокаутные миобласты C2C12 GAA высевают в 96-луночные планшеты COSTAR® с черным прозрачным дном, обработанные для культивирования тканей (Corning, 3904), и оставляют расти до конfluence в стандартной полной питательной среде. После достижения конfluence, полную культуральную среду для роста удаляют из планшетов с помощью автоматизированного робота для работы с

жидкостями BIOMEK® i5. Кондиционированную среду, продуцируемую клетками HEK293T, временно трансфицированными, как описано выше, переносят в фибробласты, полученные от пациентов с Помпе, и миобласты C2C12, и инкубируют в течение 4-24 часов при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Среду удаляют из культур с помощью автоматизированного робота для работы с жидкостями BIOMEK® i5. Клетки быстро промывают 150 мкл 1xDPBS на лунку и удаляют DPBS с помощью автоматизированного робота для работы с жидкостями BIOMEK® i5. Затем в каждую лунку добавляют 200 мкл стандартной полной питательной среды и планшеты возвращают в инкубатор на 0-72 часа. По завершении инкубации, стандартную полную среду для выращивания удаляют с помощью автоматизированного робота для работы с жидкостями BIOMEK® i5. Клетки промывают 150 мкл 1xDPBS на лунку и удаляют DPBS с помощью автоматизированного устройства для обработки жидкостей BIOMEK® i5. Клетки лизируют добавлением 50 мкл буфера McIlvaine, pH 4,4, с добавлением 0,2-0,5% неионного поверхностно-активного вещества TRITON X-100™ (Sigma #93443) и перемешиванием при комнатной температуре в течение 30 минут. Активность оценивают добавлением 50 мкл 1,5 мМ 4-MUGlu в буфере McIlvaine, pH 4,4. Планшеты запечатывают, инкубируют при 37°C в течение 300-360 минут при встряхивании при 400 об/мин, перед гашением 100 мкл 0,5 М карбоната натрия, pH 10,5. Гидролиз анализируют с использованием микропланшетного ридера SPECTRAMAX® M2 или микропланшетного ридера ENVISION® (Perkin Elmer) с мониторингом флуоресценции (возб. 355 нм, исп. 460 нм). Клеточное поглощение FIOPC рассчитывают путем деления внутриклеточной активности нормализованного варианта GAA на активность эталонного полипептида с указанной SEQ ID NO.

### **ПРИМЕР 6**

#### **Варианты GAA SEQ ID NO: 16**

В этом примере описаны эксперименты по эволюции и скринингу вариантов GAA, полученных из SEQ ID NO: 16, на улучшенную активность GAA после ряда провокаций. Синтетический ген GAA, кодирующий SEQ ID NO: 13, сливают с полинуклеотидом синтетического сигнального пептида IG мыши (SEQ ID NO: 3381) (как описано в примере 1) для получения синтетического гена, кодирующего SEQ ID NO: 15. Направленную эволюцию GAA, кодируемой SEQ ID NO: 16, осуществляют путем конструирования библиотек вариантных генов. Затем эти библиотеки высевают, выращивают и подвергают скринингу на активность GAA MU-Glu («неспровоцированная активность FIOPC»), а также после предварительной инкубации при pH 7,4 («стабильность и активность при pH 7,4 FIOPC»), как описано в Примере 5. Варианты также тестируют на активность 4-MUGlu после лизиса фибробластов Помпе («Активность из лизата фибробластов Помпе FIOPC») или клеток C2C12 GAA<sup>-/-</sup> («Активность из лизата C2C12 GAA<sup>-/-</sup> FIOPC»), как описано в Примере 5. Результаты этих анализов представлены в Таблице 6-1.

|   |
|---|
| <b>Таблица 6-1. Активность вариантов GAA относительно SEQ ID NO: 16<sup>1</sup></b> |
|---|

| SEQ<br>ID NO:<br>(нт/ак) | Аминокислотные<br>различия<br>(относительно SEQ<br>ID NO: 16) | Неспровоц<br>ированная<br>активност<br>ь<br>FIOPC | pH 7.4<br>Стабильно<br>сть и<br>активност<br>ь<br>FIOPC | Активност<br>ь от лизата<br>фибробласт<br>а Помпе<br>FIOPC | Активност<br>ь от лизата<br>C2C12<br>GAA-/-<br>FIOPC |
|--------------------------|---|---|---|--|--|
| 533/534                  | V70A/R267K/K725E/<br>C944S                                    | +++   | +++   | +++  | +++  |
| 535/536                  | R267K/A489D/D500A<br>/K725E/Q830K/C930P                       | +++   | +++   | ++   | ++   |
| 537/538                  | L109P/E522V/Q830K/<br>C944S                                   | +++   | +++   | +++  | +++  |
| 539/540                  | V70A/R267K/C930P/<br>C944S                                    | +++   | +++   | +++  | ++   |
| 541/542                  | V70A/K725E/Q830K/<br>L860F/C930P/C944S                        | +++   | +++   | +++  | +++  |
| 545/546                  | P39Q/R58L/A489D/K<br>725E/Q830K/G842S/C<br>930P/C944S         | ++  | +++   | ++   | ++   |
| 547/548                  | A60V/D500A/S612D  | +   | +   | +  | +  |
| 549/550                  | P39Q/D500A/S612D  | +++   | +++   | +++  | +++  |
| 551/552                  | E522V/K725E   | +++   | +++   | +++  | +++  |
| 553/554                  | P39Q/V70A/L109P/Q8<br>30K/G842S                               | +++   | +++   | +++  | +++  |
| 555/556                  | P39Q/V70A/K725E   | +++   | +++   | +++  | +++  |
| 557/558                  | P39Q/R267K/A489D/<br>Q830K/C944S                              | +++   | +++   | ++   | +++  |
| 559/560                  | C930P   | +++   | +++   | +++  | +++  |
| 561/562                  | D500A/C930P/C944S   | +++   | +++   | +++  | +++  |
| 563/564                  | C944S   | ++  | +++   | ++   | ++   |
| 565/566                  | L109P/E522V/S612D/<br>K725E                                   | +++   | +++   | ++   | ++   |

|         |  |     |     |     |     |
|---------|--|-----|-----|-----|-----|
| 19/20   | P39Q/R267K/A489D/<br>E522V/S612D/Q830K/<br>G842S | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 567/568 | P39Q/R267K                                       | +++ | +   | +++ | ++  |
| 569/570 | P39Q/V70A/A489D/S<br>612D                        | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 571/572 | L109P/S612D                                      | ++  | +   | +   | +   |
| 573/574 | D500A/L860F/C930P                                | +++ | +++ | ++  | ++  |
| 575/576 | R267K/E522V/K725E                                | ++  | ++  | +++ | +   |
| 577/578 | V70A/A489D/C930P                                 | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 579/580 | A489D/Q830K/C944S                                | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 581/582 | D500A/S612D/Q830K/<br>L860F                      | +++ | +   | +++ | +++ |
| 583/584 | P39Q/A489D/D500A/<br>S612D                       | +++ | +   | ++  | +   |
| 585/586 | P39Q   | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 587/588 | N528S/E793K                                      | +   |     | ++  |     |
| 589/590 | K106R/K154R                                      | +++ | +   |     | ++  |
| 591/592 | A62E/K106R/D523N/<br>N528S/A696S/E793K/<br>R862Q | +   |     | +   |     |
| 593/594 | A196T/N528S/E681Q/<br>I790V/E793K                | +   |     |     |     |
| 595/596 | A62E/K154R/A696S/E<br>793K/R862Q                 | +++ | +   | +   | ++  |
| 597/598 | A62E/Q92R/I790V/E7<br>93K                        | ++  | +   |     | ++  |
| 599/600 | E793K  | +++ | ++  | +   | +++ |
| 601/602 | S37F/N528S/I790V                                 | +   |     |     |     |
| 603/604 | N528S/E681Q                                      | +   |     |     |     |
| 605/606 | D523N/I790V/E793K                                | +++ | ++  | +   | ++  |
| 607/608 | D523N  | ++  | +   | +   | ++  |
| 609/610 | N528S/R862Q                                      | ++  |     |     |     |
| 611/612 | S37F/A62E  | ++  | +   | +   | ++  |



|         |   |     |     |     |     |
|---------|---|-----|-----|-----|-----|
| 613/614 | A753S   | +++ | +++ |     | ++  |
| 615/616 | A62E/N79S/K154R/R862Q                             | +++ |     |     | ++  |
| 617/618 | A62E/N79S/I790V/E793K                             | +++ | +   |     | +++ |
| 619/620 | A62E/N79S/R862Q                                   | +++ | +   | +++ | +++ |
| 621/622 | A62E/N79S/D523N/N528S/I790V                       | +++ |     | +   |     |
| 623/624 | A62E/N79S/A196T/E681Q/R862Q                       | ++  |     | +   | +   |
| 625/626 | S37F/A196T  | +   |     |     | +   |
| 627/628 | S37F/A62E/D523N                                   | +++ | +   | ++  | ++  |
| 629/630 | S37F/N79S/K154R/E793K                             | +++ | ++  |     | ++  |
| 631/632 | S37F/P64Q/R66G/N79S/K154R/D523N/E681Q/E793K/R862Q | +   |     | +   |     |
| 633/634 | S37F/A62E/N79S/A196T/A696S/R862Q                  | +++ | +   | +   | +   |
| 635/636 | S37F/I790V/E793K                                  | +   |     |     | +   |
| 637/638 | N79S/R862Q  | +++ | +   | ++  | ++  |
| 639/640 | N79S/K154R/E681Q                                  | +++ |     | ++  | +   |
| 641/642 | S37F/A62E/D523N/E793K                             | ++  | +   | +   | +   |
| 643/644 | A62E/E793K/R862Q                                  | +++ | +++ | +   | +++ |
| 645/646 | S37F/N528S/A696S/E793K                            | +   |     |     |     |
| 647/648 | S37F/N528S/I790V/E793K/R862Q                      | ++  |     |     |     |
| 649/650 | A62E/Q92R   | ++  | +   | +   | ++  |
| 651/652 | N79S/K154R/E793K/R862Q                            | +++ | +   | +   | +   |
| 653/654 | R862Q   | ++  | +   |     | ++  |
| 655/656 | L34D  | +++ | +++ | +++ | +++ |

|         |       |      |     |     |     |
|---------|-------|------|-----|-----|-----|
| 657/658 | Y352K | ++   | ++  | ++  | ++  |
| 659/660 | E207R | ++   | ++  | ++  | ++  |
| 661/662 | Q50L  | +    | +   | ++  | +   |
| 663/664 | L672K | ++   | +   | ++  | +   |
| 665/666 | Q938P | +++  | +++ | +++ | +++ |
| 667/668 | N875D | ++   | +   | ++  | ++  |
| 669/670 | Q830V | +++  | +   | ++  | ++  |
| 671/672 | P178G | ++   |     | +   | +   |
| 673/674 | I22R  | +++  | ++  | +++ | ++  |
| 675/676 | L24W  | +++  | ++  | ++  | ++  |
| 677/678 | L778Q | +++  | +   | +   | +   |
| 679/680 | E208I | ++   | ++  | ++  | +   |
| 681/682 | K925A | ++   | +   | ++  | ++  |
| 683/684 | A47G  | ++   | +   | ++  | +   |
| 685/686 | Y352V | ++   |     |     |     |
| 687/688 | F27S  | ++   | +   | ++  | ++  |
| 689/690 | P149R | +++  | +++ | +++ | +++ |
| 691/692 | F27K  | ++   | ++  | ++  | ++  |
| 693/694 | L672E | +++  | +   | ++  | +   |
| 695/696 | S932A | ++   | ++  | ++  | ++  |
| 697/698 | L24R  | +++  | +++ | +++ | +++ |
| 699/700 | L24E  | ++   | ++  | ++  | +   |
| 701/702 | C944R | +++  | +++ | ++  | +++ |
| 703/704 | E740G | +++  | ++  | +++ | ++  |
| 705/706 | P55C  | +    | +   | ++  | ++  |
| 707/708 | P673R | ++   |     |     |     |
| 709/710 | F27G  | ++++ | +++ | +++ | +++ |
| 711/712 | Q49A  | +    | +   | ++  | ++  |
| 713/714 | L34M  | +++  | ++  | ++  | ++  |
| 715/716 | E207Y | +    | +   | ++  | ++  |
| 717/718 | R68S  | +++  | ++  | +++ | +++ |
| 719/720 | P55L  | ++   | ++  | ++  | +   |
| 721/722 | V70Q  | +++  | +++ | +++ | +++ |
| 723/724 | P39H  | +++  | +++ | +++ | +++ |

|         |            |     |     |     |     |
|---------|------------|-----|-----|-----|-----|
| 725/726 | P922E      | +++ | ++  | +++ | ++  |
| 727/728 | R68W       | ++  | ++  | ++  | ++  |
| 729/730 | P77W       | ++  | +   | ++  | ++  |
| 731/732 | A774G      | ++  | +   | ++  | ++  |
| 733/734 | Q50G       | ++  | ++  | ++  | +++ |
| 735/736 | F27W       | ++  | +   | +   | ++  |
| 737/738 | W118F      | ++  | +   | ++  | ++  |
| 739/740 | F27V       | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 741/742 | P178V      | ++  | +   | +   | +   |
| 743/744 | H424K      | +++ |     |     |     |
| 745/746 | R385G      | +++ | +   | +   | +   |
| 747/748 | F27G/M165I | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 749/750 | V30D       | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 751/752 | V30L       | +   | ++  | +   | +   |
| 753/754 | V40W       | ++  | +   | ++  | +++ |
| 755/756 | R68N       | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 757/758 | A179L      | ++  | ++  | ++  | ++  |
| 759/760 | A774S      | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 761/762 | E33G       | ++  | ++  | ++  | ++  |
| 763/764 | A902L      | ++  | ++  | ++  | ++  |
| 765/766 | L109D      | +++ | +++ | +++ | ++  |
| 767/768 | E463A      | +   | +   | +   | +   |
| 769/770 | F27A       | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 771/772 | E880R      | ++  | +   | ++  | ++  |
| 773/774 | T44I/L157V | +++ | ++  | ++  | ++  |
| 775/776 | T158E      | +++ | ++  | ++  | ++  |
| 777/778 | L157Q      | ++  | ++  | ++  | ++  |
| 779/780 | K725V      | ++  | +   | ++  | +   |
| 781/782 | Q217A      | ++  | +++ | +   | +   |
| 783/784 | Q938A      | +++ | ++  | ++  | +   |
| 785/786 | D500A      | +   | +   | ++  | +++ |
| 787/788 | A89R       | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 789/790 | E844R      | ++  | +   | ++  | +   |
| 791/792 | R448L      | +   |     |     |     |

|         |       |     |     |     |     |
|---------|-------|-----|-----|-----|-----|
| 793/794 | Q107G | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 795/796 | E208G | +   | +   | +   | +   |
| 797/798 | A47R  | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 799/800 | E740Q | ++  | +   | ++  | ++  |
| 801/802 | F27R  | ++  | ++  | ++  | ++  |
| 803/804 | L934F | +   | +   | +   | +   |
| 805/806 | K725F | ++  | +++ | +   | +   |
| 807/808 | K925W | +   | ++  | ++  | ++  |
| 809/810 | Q49G  | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 811/812 | Q50V  | +++ | ++  | +++ | +++ |
| 813/814 | Q217D | ++  | ++  | ++  | +++ |
| 815/816 | Q892L | ++  | +++ | ++  | ++  |
| 817/818 | L34T  | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 819/820 | A97G  | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 821/822 | P673N | +   |     |     |     |
| 823/824 | T158F | ++  | +   | +   | ++  |
| 825/826 | A97D  | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 827/828 | E33P  | ++  | ++  | +++ | ++  |
| 371/372 | P39D  | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 543/544 | H734K | +   | +   | ++  | +   |

<sup>1</sup>Всю активность определяют относительно эталонного полипептида с SEQ ID NO: 16.

Уровни повышенной активности определены следующим образом: «+»=0,5-0,9;

«++»=0,9-1,1; «+++» >1,1; и «++++» >2.

### **ПРИМЕР 7**

#### **Продуцирование вариантов GAA**

В этом примере описано продуцирование вариантов GAA.

#### **Продуцирование GAA в клетках EXP1293™**

Продуцирование вариантов GAA в миллиграммовом масштабе достигают путем временной трансфекции клеток EXP1293™ (ThermoFisher Scientific) с использованием способа липофекции с реагентом EXPIFECTAMINE™ 293 (ThermoFisher Scientific) в экспрессионной среде EXP1293™ (ThermoFisher Scientific). Варианты GAA, слитые с N-концевым синтетическим сигнальным пептидом млекопитающих (SEQ ID NO: 3381), субклонировать в векторы экспрессии млекопитающих pLEV113, pcDNA 3.1(+) или pDH, как описано в примере 1. Клетки EXP1293™ трансфицируют плазмидной ДНК и выращивают в суспензии в течение 4-7 дней. Затем кондиционированные среды собирают, очищают центрифугированием и фильтрованием и хранят при 4°C до проведения анализа.

**ПРИМЕР 8****Очистка вариантов GAA**

В этом примере описаны способы очистки вариантов GAA.

**Очистка вариантов GAA из супернатантов клеток млекопитающих**

Варианты GAA (SEQ ID NO: 4, 6, 10, 12, 16, 18, 20, 946, 1894, 1924, 1950, 1956, 1984, 2034, 2054, 2066, 2074, 2178, 2202 и 2496), полученные в клетках EXP1293F™, как описано в примере 7, очищают из супернатанта культуры млекопитающих, как описано в литературе (Yasuda et al., Prot. Exp. Pur, 37:499-506 [2004]). Смолы Concanavalin A (Sigma Aldrich) уравнивают 0,1 М ацетатом натрия, 0,1 М NaCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> и MnCl<sub>2</sub>, pH 6,0 (буфер для связывания Concanavalin A). Супернатант стерильно фильтруют через 0,2 мкм фильтр в форме бутылочного горлышка перед загрузкой в колонку. После загрузки колонку промывают 10 объемами колонки буфером для связывания Concanavalin A, и связанный белок элюируют буфером для связывания Concanavalin A с добавлением 0,9 М метил- $\alpha$ -D-маннопиранозида и 0,9 М метил- $\alpha$ -D-глюкопиранозида. Элюированный белок концентрируют, и буфер заменяют буфером для хранения (20 мМ фосфата натрия, 150 мМ хлорида натрия, 185 мМ неионного детергента TWEEN®-20, pH 6,0) с использованием 15 мл фильтрующей установки AMICON® Ultra с отсекающей мембраной молекулярной массой 50 кДа (Millipore). GAA в буфере для хранения стерильно фильтруют через шприцевые фильтры ANOTOP® 0,2 мкм (Whatman) и хранят при -80°C. Основываясь на количественном анализе ВСА (описанном ниже), процесс очистки дает 2,4-50 нг очищенного белка/мл культурального супернатанта.

**Количественное определение белка с помощью анализа ВСА**

Анализ белка с бичинхониновой кислотой (ВСА) (Sigma Aldrich) используют для количественного определения очищенных вариантов GAA, полученных, как описано выше. В титрационном микропланшете, 25 мкл белковых стандартов и очищенной GAA соответствующего разведения смешивают с 200 мкл рабочего реагента, содержащего 50 частей реагента А ВСА и 1 часть реагента В ВСА. Планшет тщательно перемешивают на шейкере в течение 30 секунд и инкубируют при 37°C в течение 30 минут. Абсорбцию измеряют при 562 нм на планшетном ридере.

**ПРИМЕР 9****In vitro характеристика вариантов GAA**

В этом примере описаны эксперименты, проведенные для характеристики вариантов GAA, полученных, как указано в настоящем документе.

**Кинетическая характеристика вариантов rhGAA и GAA**

Активность варианта GAA определяют путем измерения гидролиза 4-метилумбеллиферил  $\alpha$ -D-глюкопиранозида (4-MUGlu). Очищенный фермент, полученный, как описано выше, смешивают с 50 мкл 0-2,5 мМ 4-MUGlu в буфере McIlvaine (McIlvaine, J. Biol. Chem., 49:183-186 [1921]), pH 4,5, в 96-луночном планшете с черным непрозрачным дном. Реакционные смеси кратковременно перемешивают и инкубируют при 37°C в течение 15-30 мин перед гашением 100 мкл 0,5 М карбоната

натрия, рН 10,5. Гидролиз анализируют с использованием микропланшетного ридера SPECTRAMAX® M2, отслеживая флуоресценцию (возб. 355 нм, исп. 460 нм), наносят на график и анализируют с использованием уравнения Михаэлиса-Ментен. Результаты этого анализа представлены на фигуре 1.

#### **Стабильность при нейтральном рН вариантов rhGAA и GAA**

Стабильность варианта GAA к нейтральному рН определяют путем инкубации вариантов в 100 мкл полной питательной среды MEM (рН 7,4) в 96-луночном планшете. Планшеты запечатывают и инкубируют при 37°C до 48 часов. Затем 10 мкл пробы с нейтральным рН смешивают с 50 мкл 1,5 мМ 4-MUGlu в буфере McIlvaine, рН 4,4, в 96-луночном планшете с черным непрозрачным дном. Реакции инкубируют при комнатной температуре в течение 30 минут при перемешивании перед гашением 100 мкл 0,5 М карбоната натрия, рН 10,5. Гидролиз анализируют с использованием микропланшетного ридера SPECTRAMAX® M2 или микропланшетного ридера ENVISION® (Perkin Elmer) с мониторингом флуоресценции (возб. 355 нм, исп. 460 нм, измеряя гидролиз 4-метилумбеллиферил  $\alpha$ -D-глюкопиранозида (4-MUGlu). Результаты этого анализа представлены на фигуре 11.

#### **Клеточное поглощение в фибробластах Помпе или нокаутных миобластах C2C12 GAA очищенных вариантов GAA, экспрессированных в клетках Expi293F**

Клеточное поглощение вариантов GAA по сравнению с эталонными ферментами (SEQ ID NO: 4 и 6) определяют для оценки их общей способности к эндоцитозу в культивируемых клетках. Фибробласты Помпе (GM00248, Coriell Institute for Medical Research) или нокаутные клетки C2C12 GAA высевают в 96-луночный планшет с черными стенками и прозрачным дном (Costar, #3603) в стандартной полной питательной среде и оставляют для достижения конфлюентности (2-3 дня) при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). После достижения конфлюентности, стандартную полную питательную среду удаляют с помощью автоматизированного робота для работы с жидкостями BIOMEK® i5. Ферменты, очищенные, как описано в примере 8, добавляют к клеткам в концентрации 0-10 мкг GAA/мл в стандартной полной питательной среде и инкубируют для кратковременной (1-6 часов) или продолжительной (16-96 часов) обработки при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Среда, содержащая варианты GAA, отсасывают с помощью автоматизированного робота для работы с жидкостями BIOMEK® i5. Клетки быстро промывают 150 мкл 1хDPBS на лунку и удаляют DPBS с помощью автоматизированного робота для работы с жидкостями BIOMEK® i5. Затем в каждую лунку добавляют 200 мкл стандартной полной питательной среды, и планшеты возвращают в инкубатор на 0-72 часа. По завершении инкубации, полную питательную среду MEM удаляют с помощью автоматизированного робота для работы с жидкостями BIOMEK® i5. Клетки промывают 150 мкл 1хDPBS на лунку и удаляют DPBS с помощью автоматизированного робота для работы с жидкостями BIOMEK® i5. Клетки лизируют добавлением 50 мкл буфера McIlvaine, рН 4,4, с добавлением 0,2-0,5% неионного поверхностно-активного вещества TRITON X-100™ (Sigma #93443) и перемешивают при комнатной температуре в течение 30 минут.

Активность GAA оценивают путем добавления 50 мкл 1,5 mM 4-MUGlu в буфер McIlvaine, pH 4,4. Планшеты запечатывают, инкубируют при 37°C в течение 300-360 минут при встряхивании при 400 об/мин, перед гашением 100 мкл 0,5 M карбоната натрия, pH 10,5. Гидролиз анализируют с использованием микропланшетного ридера SPECTRAMAX® M2, отслеживая флуоресценцию (возб. 355 нм, исп. 460 нм). Клеточное поглощение FIORC рассчитывают путем деления внутриклеточной активности нормализованного варианта GAA на контрольную (WT) активность. На фигурах 4, 5, 8, 12, 13, 16-18, 22, 24 и 26 представлены графики, показывающие клеточное поглощение фибробластами Помпе очищенных вариантов GAA после обработки от 1 до 96 часов. На фигуре 6, 7, 14, 15, 19-21, 23, 25 и 27 представлены графики, показывающие клеточное поглощение миобластами C2C12 GAA KO очищенных вариантов GAA после обработки от 1 до 96 часов. На фигуре 8 представлен график, показывающий поглощение клетками и стабильность вариантов GAA через 1-7 дней.

**Активность деградации гликогена вариантов GAA, экспрессированных в клетках EXPI293F™**

Относительную активность гидролиза гликогена вариантов GAA оценивают с использованием набора AMPLEX® Red Glucose/Glucose Oxidase Kit (Invitrogen, #A22189) в соответствии с инструкциями производителя с описанными в настоящем документе модификациями. Коротко, варианты GAA разводят до соответствующего диапазона концентраций (0-2 мкг/мл) в реакционных смесях объемом 50 мкл с 10 mM гликогена в буфере McIlvaine pH 4,4 в 96-луночном планшете COSTAR® с черными стенками и прозрачным дном (#3603, Corning). Планшеты закрывают и осторожно встряхивают при комнатной температуре в течение 30 минут. Реакции нейтрализуют добавлением 25 мкл 0,5 M карбоната натрия, pH 10,5. В каждую лунку добавляют 50 мкл раствора оксидазы AMPLEX® Red/Horseradish Peroxidase/Glucose, приготовленного в соответствии с инструкциями производителя. Планшеты закрывают и осторожно встряхивают при комнатной температуре в течение 30 минут. Реакции количественно определяют по стандартной кривой свободной глюкозы с использованием микропланшетного ридера SPECTRAMAX® M2 с мониторингом флуоресценции (возб. 530 нм, исп. 590 нм). Результаты показаны на фигуре 2.

**ПРИМЕР 10**

**Варианты GAA SEQ ID NO: 20**

В этом примере описаны эксперименты по эволюции и скринингу вариантов GAA, полученных из SEQ ID NO: 20 для улучшения активности GAA после описанного ряда провокаций. Библиотеки вариантных генов GAA, кодированных на основе SEQ ID NO: 20 сконструируют, высевают, выращивают и подвергают скринингу на активность GAA MU-Glu («Неспровоцированная активность FIORC»), а также после провокации плазмой («Стабильность плазмы и активность FIORC»), как описано в Примере 5. Варианты также тестируют на активность 4-MUGlu после лизиса фибробластов Помпе («Активность из лизата фибробластов Помпе FIORC») или клеток C2C12 GAA<sup>-/-</sup> («Активность из лизата

C2C12 GAA-/- FIOPC»), как описано в примере 5. Результаты этих анализов представлены в таблицах 10-1 и 10-2.

| <b>Таблица 10-1. Активность вариантов GAA относительно SEQ ID NO: 20<sup>1</sup></b> |   |  |   |   |  |
|--|---|--|---|---|--|
| <b>SEQ ID NO:<br/>(нт/ак)</b>  | <b>Аминокислотные различия<br/>(относительно SEQ ID NO: 20)</b> | <b>Неспроводимая и рованная активность FIOPC</b> | <b>Стабильность и активность в плазме FIOPC</b> | <b>Активность от лизата фибробласта Помпе FIOPC</b> | <b>Активность от лизата C2C12 GAA-/- FIOPC</b> |
| 19/20  |   | +  | +   | +   | +  |
| 829/830  | L24R/F27G/A89R/D500A/S842G                                      |  | ++  | ++  | ++   |
| 831/832  | L24R/F27G/D500A/S842G   | +  | ++  | ++  | +  |
| 833/834  | D500A/S932A   |  | +   | ++  | +  |
| 835/836  | L24R/Q39H/S842G/S932A   |  | +   | +   | ++   |
| 837/838  | Q39D/A89R/A97G/D500A  |  | +   | ++  | ++   |
| 839/840  | D500A/S842G   |  | ++  | ++  | +  |
| 841/842  | S842G/S932A   |  |   | +   | ++   |
| 843/844  | A89R/A97G/Q107G   |  | ++  | ++  | ++   |
| 845/846  | A89R/A97G/D500A   |  |   | ++  | ++   |
| 847/848  | F27G/Q39H/Q49G/A97G/D500A/S842G                                 |  | ++  | ++  | ++   |
| 849/850  | R68N/A89R/A97G/S932A  |  | +   | ++  | +  |
| 851/852  | A89R/S842G  |  | +   | ++  | +  |
| 853/854  | L24R/Q39D/R68S/A89R/Q107G/D500A/S842G                           | +  | ++  | ++  | ++   |
| 855/856  | L24R/F27G/D500A   |  |   | ++  | ++   |



|         |   |   |   |    |    |
|---------|---|---|---|----|----|
|         | A/S842G/S932A   |   |   |    |    |
| 857/858 | L24R/Q39H/Q49<br>G/A89R/A97G/S<br>842G/S932A                  |   |   | ++ | ++ |
| 859/860 | L24R/S842G/S93<br>2A  | + | + | ++ | ++ |
| 861/862 | L24R/A89R/D50<br>0A   |   | + | ++ | ++ |
| 863/864 | L24R/Q39H/A89<br>R/A97D/S842G/S<br>932A                       |   |   | ++ | ++ |
| 865/866 | L24R  | + | + | ++ | ++ |
| 867/868 | F27G/Q49G/R68<br>S/D500A/S842G                                |   | + | ++ | ++ |
| 869/870 | Q107G/D500A/S<br>842G   |   | + | ++ | ++ |
| 871/872 | L34T/Q39D/D50<br>0A/S932A                                     | + | + | ++ | ++ |
| 873/874 | R68S  | + | + | ++ | +  |
| 875/876 | L24W/L109D/D6<br>12S  |   | + | ++ | ++ |
| 877/878 | L24W/V70A/K26<br>7R/A774S                                     |   | + | ++ | ++ |
| 879/880 | I22R/L24W/D612<br>S/K725E/C944R                               | + | + | ++ | ++ |
| 881/882 | L24W  |   |   | ++ | +  |
| 883/884 | I22R/L24W/F27A<br>/D489A                                      |   | + | ++ | +  |
| 885/886 | D489A   |   |   | +  | +  |
| 887/888 | I22R/L24W/F27A<br>/Q50V/Q107G/L1<br>09D/D489A/D61<br>2S/K725E |   | + | ++ | +  |
| 889/890 | Q50V/D612S/C9   | + |   | ++ | +  |

|         |  |    |    |     |    |
|---------|--|----|----|-----|----|
|         | 44S  |    |    |     |    |
| 891/892 | D612S/K725E/C9<br>44S                                    | ++ | ++ | ++  |    |
| 893/894 | L109D/D612S/A7<br>74S/C944S                              | +  | ++ | +   | ++ |
| 895/896 | I22R/L24W/F27A<br>/D612S/C944R                           | +  | +  | ++  | +  |
| 897/898 | Q50V/D489A/A7<br>74S                                     |    |    | ++  | ++ |
| 899/900 | Q50V/L109D/D4<br>89A/D612S                               |    |    | +   | +  |
| 901/902 | I22R/L24W/Q50<br>V/L109D/K267R/<br>D489A/A774S/C<br>944R |    | +  | ++  | ++ |
| 903/904 | I22R/L24W  | +  |    | ++  | ++ |
| 905/906 | L24W/Q50V/D48<br>9A/C944S                                |    | +  | ++  | ++ |
| 907/908 | I22R/Q50V/L109<br>D/K267R/D489A                          | +  | ++ | ++  | +  |
| 909/910 | L24W/D489A/C9<br>44R                                     |    |    | ++  | ++ |
| 911/912 | L24W/K725E   |    |    | ++  | +  |
| 913/914 | L24W/L109D/C9<br>44S                                     | +  | +  | ++  | +  |
| 915/916 | D612S/P922E  |    | +  | +   | +  |
| 917/918 | L24W/K267R/K7<br>25E/C944S                               | +  | +  | ++  | ++ |
| 919/920 | Q107G/L109D  |    |    |     | ++ |
| 921/922 | D489A/C944R  | +  | +  | +   | +  |
| 923/924 | I22R/L24W/Q50<br>V/K267R/D612S/<br>P922E/C944R           |    |    | ++  | ++ |
| 925/926 | I22R/L24W/F27A   | +  |    | +++ | +  |

|         |  |   |   |     |    |
|---------|--|---|---|-----|----|
|         | /D489A/D612S/A<br>774S                                     |   |   |     |    |
| 927/928 | L24W/F27A/Q10<br>7G/K267R/D612<br>S/C944S                  | + |   | ++  | +  |
| 929/930 | L24W/F27A/K26<br>7R/C944R                                  |   |   | +   | +  |
| 931/932 | I22R/L24W/D489<br>A  |   |   | ++  | ++ |
| 933/934 | I22R/Q50V/Q107<br>G/K267R/D489A/<br>D612S/C944S            | + | + | ++  | +  |
| 935/936 | L24W/V70A/Q10<br>7G/L109D/D489<br>A/D612S/K725E            | + | + | ++  | ++ |
| 937/938 | I22R/L24W/Q107<br>G/K267R/D489A/<br>P922E                  | + |   | +++ | ++ |
| 939/940 | L24W/Q107G/L1<br>09D/K267R/D489<br>A/D612S/K725E/<br>A774S | + | + | ++  | ++ |
| 941/942 | L24W/F27A/C94<br>4R  | + | + | ++  | +  |
| 943/944 | D612S  |   |   | +   | ++ |
| 945/946 | L24W/Q50V/D61<br>2S  | + |   | ++  | ++ |
| 947/948 | I22R/K267R/D48<br>9A/D612S                                 |   | + | ++  | ++ |
| 949/950 | L24W/F27A/Q50<br>V/Q107G/K267R/<br>A774S/C944S             | + | + | ++  | +  |
| 951/952 | L24W/C944S   | + |   | ++  | ++ |
| 953/954 | E614W  |   |   | ++  | +  |

|           |       |    |    |     |    |
|-----------|-------|----|----|-----|----|
| 955/956   | N527R | +  | +  | ++  | +  |
| 957/958   | E381W |    |    | ++  | +  |
| 959/960   | R862Y | +  |    | ++  | +  |
| 961/962   | D923L |    |    | ++  | ++ |
| 963/964   | A62L  | +  | ++ | ++  | ++ |
| 965/966   | S916R |    |    | ++  | +  |
| 967/968   | P914G |    |    | +   | +  |
| 969/970   | D523E | +  |    | ++  | +  |
| 971/972   | D923W |    |    | ++  |    |
| 973/974   | A62F  |    |    | +++ | +  |
| 975/976   | E188W |    |    | ++  | +  |
| 977/978   | P71V  |    |    | +   |    |
| 979/980   | P71W  |    |    | ++  | +  |
| 981/982   | L742V | +  | +  | ++  | +  |
| 983/984   | N527V |    |    | +   | +  |
| 985/986   | P123V |    |    | +   | +  |
| 987/988   | H193P | +  | ++ | ++  |    |
| 989/990   | P123L |    | ++ | ++  | +  |
| 991/992   | P914Q |    |    | +   | ++ |
| 993/994   | S124V |    |    | ++  | +  |
| 995/996   | E858C |    |    | ++  | +  |
| 997/998   | P57M  |    |    | +   | ++ |
| 999/1000  | S264M | +  | +  | ++  | +  |
| 1001/1002 | T148K |    |    | +   |    |
| 1003/1004 | P57F  | +  | +  | ++  | ++ |
| 1005/1006 | E614Q | +  |    | ++  | ++ |
| 1007/1008 | A112H | ++ | +  | ++  | +  |
| 1009/1010 | R862Q | +  | +  | ++  | +  |
| 1011/1012 | H48W  |    |    | ++  | ++ |
| 1013/1014 | P914T |    |    | +   |    |
| 1015/1016 | S916G |    |    | ++  | +  |
| 1017/1018 | K88R  |    | +  | ++  | +  |
| 1019/1020 | P914K |    |    | ++  | ++ |
| 1021/1022 | G820A |    |    | ++  | +  |

|           |       |    |    |     |    |
|-----------|-------|----|----|-----|----|
| 1023/1024 | V913W |    |    | ++  | +  |
| 1025/1026 | D923V |    | ++ | ++  | ++ |
| 1027/1028 | P832A |    |    |     | +  |
| 1029/1030 | P71L  | +  | ++ | ++  | +  |
| 1031/1032 | A253M |    | ++ | +   | ++ |
| 1033/1034 | L823F |    | +  | ++  | +  |
| 1035/1036 | L305F |    |    | ++  | +  |
| 1037/1038 | P914S |    |    | +   | +  |
| 1039/1040 | S727W | +  |    | ++  | ++ |
| 1041/1042 | L940Q | +  | +  | ++  | +  |
| 1043/1044 | E188R |    |    | +   | +  |
| 1045/1046 | H48V  | +  |    | +   | +  |
| 1047/1048 | P832R |    | +  | ++  | ++ |
| 1049/1050 | H48Q  | +  | +  | +   |    |
| 1051/1052 | H193E | +  | +  | +   | +  |
| 1053/1054 | T148R | +  |    | +++ | ++ |
| 1055/1056 | G820V |    |    | ++  |    |
| 1057/1058 | E381R |    |    | ++  |    |
| 1059/1060 | S402N | +  | +  | ++  | ++ |
| 1061/1062 | L823V |    | +  | ++  | ++ |
| 1063/1064 | R862M |    | +  | ++  | +  |
| 1065/1066 | K88L  |    |    |     | +  |
| 1067/1068 | A62W  |    | ++ | ++  | ++ |
| 1069/1070 | G108R | +  | ++ | +   | +  |
| 1071/1072 | L748V |    | +  | ++  | +  |
| 1073/1074 | E42G  |    | +  | ++  | +  |
| 1075/1076 | E858W |    | +  | ++  | ++ |
| 1077/1078 | P57L  | +  | +  | ++  | ++ |
| 1079/1080 | I333L |    |    | +   |    |
| 1081/1082 | V312A |    |    | +   |    |
| 1083/1084 | P197G | ++ | ++ | +   | +  |
| 1085/1086 | S916H | +  | ++ | ++  | +  |
| 1087/1088 | P914I |    |    | ++  |    |
| 1089/1090 | N911R |    |    | ++  |    |

|           |             |   |    |      |    |
|-----------|-------------|---|----|------|----|
| 1091/1092 | E381V       |   |    | ++   | +  |
| 1093/1094 | P71Y        |   |    | ++   | +  |
| 1095/1096 | R862I       | + | ++ | ++   | ++ |
| 1097/1098 | S124M       | + | +  | ++   | +  |
| 1099/1100 | P71G        | + |    | +    | +  |
| 1101/1102 | P914R       | + | +  | ++   | ++ |
| 1103/1104 | S124G       |   |    | ++   | +  |
| 1105/1106 | N911G       |   |    | +    | +  |
| 1107/1108 | E614R       |   |    | ++++ | ++ |
| 1109/1110 | V913R       | + | ++ | ++   | ++ |
| 1111/1112 | E937K       |   | +  | +++  | ++ |
| 1113/1114 | E204A       |   | +  |      |    |
| 1115/1116 | S402V/P781Q | + | ++ | ++   | +  |
| 1117/1118 | V913G       | + | +  | ++   | +  |

<sup>1</sup>Всю активность определяют относительно эталонного полипептида с SEQ ID NO: 20. Уровни повышенной активности определены следующим образом: «+»=0,9-1,1; «++» >1,1; «+++» >2; и «++++» >3,5.

**Таблица 10-2. Активность вариантов GAA относительно SEQ ID NO: 20<sup>1</sup>**

| <b>SEQ ID NO: (нт/ак)</b> | <b>Аминокислотные различия (относительно SEQ ID NO: 20)</b> | <b>Неспровоцированная активность FIOPC</b> | <b>Стабильность и активность в плазме FIOPC</b> | <b>Активность от лизата фибробласта Помпе FIOPC</b> |
|---------------------------|---|--|---|---|
| 19/20                     |   | +  | +   | +   |
| 1119/1120                 | K88G  | ++   | ++  | +   |
| 1121/1122                 | L818V   | +  |   | ++  |
| 1123/1124                 | T148E   | +  | +   | +   |
| 1125/1126                 | A741D   | +  |   | +   |
| 1127/1128                 | N527P   | +  | +   | ++  |
| 1129/1130                 | L737M   | ++   | ++  | ++  |
| 1131/1132                 | G445L   | +  |   |   |
| 1133/1134                 | P197L   | +  | +   | +   |
| 1135/1136                 | M260V   | +  | +   |   |
| 1137/1138                 | A112W   | +  |   | ++  |
| 1139/1140                 | H45M  | +  | +   | +   |

|           |             |    |    |    |
|-----------|-------------|----|----|----|
| 1141/1142 | G108S       | +  | +  | ++ |
| 1143/1144 | L259N       |    |    | +  |
| 1145/1146 | P71Q        | +  | +  | ++ |
| 1147/1148 | E42C        |    |    | +  |
| 1149/1150 | P57T        | +  | +  |    |
| 1151/1152 | P197I       | +  | +  | +  |
| 1153/1154 | L238Q       | +  |    |    |
| 1155/1156 | I816L       | +  | +  | ++ |
| 1157/1158 | E858V       | +  | +  | +  |
| 1159/1160 | S916A       | +  | +  | +  |
| 1161/1162 | P682A       | +  | +  | +  |
| 1163/1164 | M260F       | +  |    | +  |
| 1165/1166 | H255Q       | +  |    | +  |
| 1167/1168 | M432C       | +  | +  | ++ |
| 1169/1170 | P71D        | +  |    | ++ |
| 1171/1172 | T325A       | +  |    |    |
| 1173/1174 | E188Q/R377Q | +  | +  |    |
| 1175/1176 | K106G       | +  | +  |    |
| 1177/1178 | K106N       | ++ | +  | +  |
| 1179/1180 | L244I       | +  |    | +  |
| 1181/1182 | A319F       |    |    | +  |
| 1183/1184 | I815M       |    |    | +  |
| 1185/1186 | F237L       | +  |    | +  |
| 1187/1188 | H63A        | ++ | +  | +  |
| 1189/1190 | P832E       | +  | +  | +  |
| 1191/1192 | A741T       |    | +  | +  |
| 1193/1194 | S124F       | ++ | +  | ++ |
| 1195/1196 | T325V       | +  | ++ | ++ |
| 1197/1198 | P832V       | ++ | +  | +  |
| 1199/1200 | P682K       | ++ | ++ | +  |
| 1201/1202 | H387R       | +  | +  | +  |
| 1203/1204 | R862G       | +  | +  | ++ |
| 1205/1206 | H63K        | +  | +  | +  |
| 1207/1208 | S243R       |    |    | +  |

|           |             |    |    |    |
|-----------|-------------|----|----|----|
| 1209/1210 | H255R       | +  |    | +  |
| 1211/1212 | E204G       | +  | +  | ++ |
| 1213/1214 | V312F       | +  |    | +  |
| 1215/1216 | S727T       | ++ | ++ | ++ |
| 1217/1218 | L240I       | ++ | ++ | ++ |
| 1219/1220 | L261T       | +  |    |    |
| 1221/1222 | S264F       | +  | +  | ++ |
| 1223/1224 | E614V       | +  |    | ++ |
| 1225/1226 | T91I        |    |    | +  |
| 1227/1228 | L240M       | ++ | +  | ++ |
| 1229/1230 | S727A       | +  | +  | +  |
| 1231/1232 | V913A       | +  |    | +  |
| 1233/1234 | P832K       |    | +  | ++ |
| 1235/1236 | L940G       | +  |    | ++ |
| 1237/1238 | Q61V        | +  | +  | +  |
| 1239/1240 | R455T       | +  | +  | +  |
| 1241/1242 | H193S       | ++ | +  | ++ |
| 1243/1244 | M260R       | +  |    |    |
| 1245/1246 | E204Q       |    |    | +  |
| 1247/1248 | S262L       | +  |    | +  |
| 1249/1250 | T91K        | +  | +  | ++ |
| 1251/1252 | S127G/P914F |    |    | +  |
| 1253/1254 | R455V       | ++ | +  |    |
| 1255/1256 | A62P        | +  | +  |    |
| 1257/1258 | E42Q        | +  | +  | +  |
| 1259/1260 | E614L       | +  | +  | +  |
| 1261/1262 | L305Y       | +  | +  | ++ |
| 1263/1264 | S264L       | +  | +  | +  |
| 1265/1266 | P186G       | +  | +  |    |
| 1267/1268 | G820K       | +  | +  | +  |
| 1269/1270 | P832M       | +  | +  | ++ |
| 1271/1272 | S264R       | +  | +  | ++ |
| 1273/1274 | H63T        | +  | +  | +  |
| 1275/1276 | S262F       |    |    | +  |



|           |       |   |    |    |
|-----------|-------|---|----|----|
| 1277/1278 | F237M | + |    |    |
| 1279/1280 | K88V  | + | +  | +  |
| 1281/1282 | S124R | + | +  | +  |
| 1283/1284 | Q61M  | + | +  | +  |
| 1285/1286 | H193V | + | +  | +  |
| 1287/1288 | H63C  | + |    | ++ |
| 1289/1290 | T148V | + | +  | +  |
| 1291/1292 | N911M |   |    | +  |
| 1293/1294 | N527F | + |    | ++ |
| 1295/1296 | K88E  | + | +  |    |
| 1297/1298 | L305G | + |    |    |
| 1299/1300 | Q61G  | + | +  | ++ |
| 1301/1302 | S124D | + | +  | ++ |
| 1303/1304 | F237V | + |    |    |
| 1305/1306 | A253L | + | ++ | +  |
| 1307/1308 | I815A |   |    | +  |
| 1309/1310 | R862C | + | +  | ++ |
| 1311/1312 | Q421R | + | +  | ++ |
| 1313/1314 | H255T | + |    |    |
| 1315/1316 | H63D  | + | +  | +  |
| 1317/1318 | P832W | + | +  | ++ |
| 1319/1320 | P57R  | + | +  | ++ |
| 1321/1322 | T148S |   | +  | +  |
| 1323/1324 | S262T | + | +  | +  |
| 1325/1326 | A62G  |   |    | +  |
| 1327/1328 | P914E | + | +  | +  |
| 1329/1330 | K88M  | + | +  | +  |
| 1331/1332 | R862K | + | +  | ++ |
| 1333/1334 | R455G | + |    |    |
| 1335/1336 | S264C |   |    | +  |
| 1337/1338 | K88I  | + | +  |    |
| 1339/1340 | Y248A | + |    |    |
| 1341/1342 | L305R | + | +  | ++ |
| 1343/1344 | P279G | + |    |    |

|           |       |    |    |    |
|-----------|-------|----|----|----|
| 1345/1346 | A62S  | +  | +  | ++ |
| 1347/1348 | R455H | +  | +  | +  |
| 1349/1350 | L320M | +  | ++ | ++ |
| 1351/1352 | L736V | +  | +  | +  |
| 1353/1354 | A309C | +  | +  | +  |
| 1355/1356 | E204D | +  | +  | +  |
| 1357/1358 | S264A | ++ | ++ | ++ |
| 1359/1360 | H193R | +  | +  | ++ |
| 1361/1362 | E614G | +  | +  | ++ |
| 1363/1364 | K154R | +  | +  | +  |
| 1365/1366 | K154E | +  | +  | +  |
| 1367/1368 | T29S  | +  | +  | ++ |
| 1369/1370 | Q421Y |    |    | +  |
| 1371/1372 | P197V | +  | +  |    |
| 1373/1374 | E188G | +  | +  | ++ |
| 1375/1376 | K88S  |    | +  |    |
| 1377/1378 | Y248F | +  | +  | +  |
| 1379/1380 | K88W  |    | +  | +  |
| 1381/1382 | H45N  | ++ | +  | +  |
| 1383/1384 | P914M | +  | +  | ++ |
| 1385/1386 | S727Q | +  | +  | +  |
| 1387/1388 | P71A  | +  | +  | +  |
| 1389/1390 | P197T | +  | +  | +  |
| 1391/1392 | T148A | +  | +  |    |
| 1393/1394 | E858M | +  |    | +  |
| 1395/1396 | L823A | +  | +  | ++ |
| 1397/1398 | P57S  | +  | ++ | +  |
| 1399/1400 | E204S | +  |    | +  |
| 1401/1402 | P186S | +  |    |    |
| 1403/1404 | K106V | +  | +  | +  |
| 1405/1406 | L736W | +  | +  |    |
| 1407/1408 | E614I | +  |    | +  |
| 1409/1410 | S916I | +  | +  | +  |
| 1411/1412 | R862A | +  | +  | +  |

|           |       |    |    |    |
|-----------|-------|----|----|----|
| 1413/1414 | V913E | +  | +  | +  |
| 1415/1416 | H63R  | +  | +  | ++ |
| 1417/1418 | E937S | +  | +  | ++ |
| 1419/1420 | S262A | +  | +  |    |
| 1421/1422 | P71R  | +  | +  | ++ |
| 1423/1424 | E858R | +  |    |    |
| 1425/1426 | H63P  | +  | +  |    |
| 1427/1428 | L305V | ++ | ++ |    |
| 1429/1430 | E42W  | +  | +  | ++ |
| 1431/1432 | H48I  | +  | +  | +  |
| 1433/1434 | K154A | +  | +  |    |
| 1435/1436 | Y248V | +  |    |    |
| 1437/1438 | A112F | +  | +  | +  |
| 1439/1440 | L818T |    |    | +  |
| 1441/1442 | A741C | +  | +  | +  |
| 1443/1444 | P123Y | +  | +  | +  |
| 1445/1446 | F556S | +  | +  | ++ |
| 1447/1448 | D523L | +  |    | +  |
| 1449/1450 | R862L | +  |    | +  |
| 1451/1452 | A62V  | +  | +  | +  |
| 1453/1454 | Q61P  | +  | +  | +  |
| 1455/1456 | H193A | +  | +  |    |
| 1457/1458 | H255V | +  |    |    |
| 1459/1460 | L748I | +  | +  | +  |
| 1461/1462 | M260W | ++ |    | ++ |
| 1463/1464 | R455L | +  | +  | +  |
| 1465/1466 | I249L | +  | +  | +  |
| 1467/1468 | G108N | +  | +  | ++ |
| 1469/1470 | Q421G | +  | +  | ++ |
| 1471/1472 | I816V | +  | +  | +  |
| 1473/1474 | L818M | +  | +  | +  |
| 1475/1476 | R195Y | +  | +  |    |
| 1477/1478 | P832C |    |    | ++ |
| 1479/1480 | L748T | +  |    |    |

|           |             |    |    |    |
|-----------|-------------|----|----|----|
| 1481/1482 | N527W       |    |    | ++ |
| 1483/1484 | T148R/V772I | +  | +  | ++ |
| 1485/1486 | K106T       | +  | +  |    |
| 1487/1488 | L240W/A374T |    | +  |    |
| 1489/1490 | F556Y       |    | +  |    |
| 1491/1492 | P914F       |    |    | +  |
| 1493/1494 | P57Y        | ++ | ++ | ++ |
| 1495/1496 | M432L       | +  | ++ | ++ |
| 1497/1498 | P123S       | +  | +  | +  |
| 1499/1500 | G108V       | +  | +  |    |
| 1501/1502 | P279R       | +  |    |    |
| 1503/1504 | R195V       | +  | +  |    |
| 1505/1506 | E42D        | +  | +  |    |
| 1507/1508 | F205L       | +  | +  |    |
| 1509/1510 | H45S        | +  | +  | ++ |
| 1511/1512 | Q421M       |    |    | ++ |
| 1513/1514 | A112R       | +  | +  | ++ |
| 1515/1516 | S916V       | +  | +  | ++ |
| 1517/1518 | E381T       | +  |    | ++ |
| 1519/1520 | A253S       | +  |    |    |
| 1521/1522 | F205V       | +  | +  | +  |
| 1523/1524 | E858S       | +  | ++ | +  |
| 1525/1526 | E858G       | +  | ++ | ++ |
| 1527/1528 | E937Q       | +  | +  | +  |
| 1529/1530 | P914W       |    |    | +  |
| 1531/1532 | P197R       | +  | ++ | ++ |
| 1533/1534 | S264V       | +  | +  | ++ |
| 1535/1536 | S727R       |    |    | +  |
| 1537/1538 | E858K       |    | +  | +  |
| 1539/1540 | P832G       | ++ | +  | ++ |
| 1541/1542 | V913H       |    |    | ++ |
| 1543/1544 | T148M       | +  |    | ++ |
| 1545/1546 | L252V       | +  |    | +  |
| 1547/1548 | P123M       | +  | +  | ++ |

|           |       |    |    |    |
|-----------|-------|----|----|----|
| 1549/1550 | E937R |    |    | +  |
| 1551/1552 | S243G |    |    | +  |
| 1553/1554 | R455S |    |    | +  |
| 1555/1556 | A741E |    |    | +  |
| 1557/1558 | S243V |    |    | +  |
| 1559/1560 | S402R | +  | +  | +  |
| 1561/1562 | P832I | +  | +  | ++ |
| 1563/1564 | P57C  | +  | +  | +  |
| 1565/1566 | E614P |    |    | +  |
| 1567/1568 | P279E | +  |    | +  |
| 1569/1570 | V913Q | +  | +  | ++ |
| 1571/1572 | P682W |    |    | ++ |
| 1573/1574 | E381G |    |    | ++ |
| 1575/1576 | N527S | +  | +  | +  |
| 1577/1578 | E614Y | +  | ++ | ++ |
| 1579/1580 | I816M |    |    | +  |
| 1581/1582 | H45C  | +  | +  | +  |
| 1583/1584 | L259G | +  |    |    |
| 1585/1586 | S243E |    |    | +  |
| 1587/1588 | E204V | +  | +  | +  |
| 1589/1590 | P57N  | +  | +  | +  |
| 1591/1592 | H45Y  |    |    | +  |
| 1593/1594 | F237A |    |    | +  |
| 1595/1596 | P71C  | +  |    | ++ |
| 1597/1598 | H48G  | +  | +  | ++ |
| 1599/1600 | A253G | +  |    | ++ |
| 1601/1602 | L736M | ++ | +  | ++ |
| 1603/1604 | L940W | +  |    | ++ |
| 1605/1606 | L823G |    |    | ++ |
| 1607/1608 | S262E | ++ | ++ | +  |
| 1609/1610 | E188S | +  | ++ | +  |
| 1611/1612 | T325L | +  | +  | ++ |
| 1613/1614 | N527G |    |    | +  |
| 1615/1616 | P197A | +  | +  | +  |

|           |       |    |    |    |
|-----------|-------|----|----|----|
| 1617/1618 | H193L | +  | +  |    |
| 1619/1620 | S727G | +  | +  | ++ |
| 1621/1622 | F556R | +  | +  | ++ |
| 1623/1624 | L261E | +  |    | +  |
| 1625/1626 | A309G | ++ |    | ++ |
| 1627/1628 | E42Y  |    |    | +  |
| 1629/1630 | K154L | +  |    | +  |
| 1631/1632 | F556H | +  | +  | +  |
| 1633/1634 | K106A | +  | +  |    |
| 1635/1636 | S402G | ++ | ++ | ++ |
| 1637/1638 | H45T  | ++ | ++ | +  |
| 1639/1640 | E858P | +  | +  | ++ |
| 1641/1642 | S262P | +  | ++ | +  |
| 1643/1644 | P914H |    | +  | ++ |
| 1645/1646 | P71E  | ++ | ++ | +  |
| 1647/1648 | P682L | +  | +  | +  |
| 1649/1650 | E188T | +  | ++ | +  |
| 1651/1652 | L329F | +  | ++ | ++ |
| 1653/1654 | S246G |    |    | +  |
| 1655/1656 | H63M  | +  | ++ | +  |
| 1657/1658 | H63L  | +  | +  | +  |
| 1659/1660 | R323A |    |    | +  |
| 1661/1662 | T148G | ++ | ++ | ++ |
| 1663/1664 | S124C |    |    | ++ |
| 1665/1666 | R323L |    |    | +  |
| 1667/1668 | P682V | +  | ++ | ++ |
| 1669/1670 | G445Y | +  |    | ++ |
| 1671/1672 | E858Y | +  | ++ | ++ |
| 1673/1674 | P279L | +  |    | ++ |
| 1675/1676 | R862N | ++ | ++ | +  |
| 1677/1678 | P186A | +  | +  |    |
| 1679/1680 | S262M | +  | +  | ++ |
| 1681/1682 | E937F |    |    | ++ |
| 1683/1684 | A741G | ++ | ++ | +  |

|           |       |    |    |    |
|-----------|-------|----|----|----|
| 1685/1686 | P123G | +  | +  | ++ |
| 1687/1688 | H45L  |    | +  | ++ |
| 1689/1690 | H63W  | +  | ++ | ++ |
| 1691/1692 | S246A | +  |    | +  |
| 1693/1694 | L940T | ++ | ++ | +  |
| 1695/1696 | P57E  | +  | ++ | +  |
| 1697/1698 | P123A | +  | +  | ++ |
| 1699/1700 | H63V  | +  | +  | +  |
| 1701/1702 | H255S | +  |    |    |
| 1703/1704 | H387L | +  | ++ | +  |
| 1705/1706 | K106W |    |    | +  |
| 1707/1708 | P832S | ++ | ++ | ++ |
| 1709/1710 | S727C | ++ | +  | +  |
| 1711/1712 | S124L | ++ | ++ | ++ |
| 1713/1714 | P914V | ++ | ++ | ++ |
| 1715/1716 | S124N | +  | +  | +  |
| 1717/1718 | L244V | +  |    | ++ |
| 1719/1720 | R323M | +  |    | ++ |
| 1721/1722 | S402D | +  | +  | +  |
| 1723/1724 | S402M | +  | +  | ++ |
| 1725/1726 | L259M | +  | +  | ++ |
| 1727/1728 | D523W | +  | +  | +  |
| 1729/1730 | R195G | ++ | ++ | +  |
| 1731/1732 | Q421F |    |    | ++ |
| 1733/1734 | T148H | +  | ++ | ++ |
| 1735/1736 | Y248R | +  |    |    |
| 1737/1738 | A62T  | +  | +  | +  |
| 1739/1740 | P279A | +  |    | +  |
| 1741/1742 | R455E |    | +  |    |
| 1743/1744 | P682G | ++ | ++ | +  |
| 1745/1746 | E188M | +  | ++ | ++ |
| 1747/1748 | P57Q  | +  | +  | +  |
| 1749/1750 | H193Y | +  | +  | +  |
| 1751/1752 | Q421A | +  | +  | ++ |

|           |             |    |    |    |
|-----------|-------------|----|----|----|
| 1753/1754 | R195P       | +  | +  | +  |
| 1755/1756 | L320V       | ++ | +  | +  |
| 1757/1758 | A253P       | +  | ++ | +  |
| 1759/1760 | S298P/Q421R |    |    | ++ |
| 1761/1762 | H63G        | ++ | ++ | ++ |
| 1763/1764 | A319M       |    |    | ++ |
| 1765/1766 | P682F       | +  | +  | ++ |
| 1767/1768 | H48R        | +  | +  | ++ |
| 1769/1770 | I333V       | +  | +  | ++ |
| 1771/1772 | A112P       |    | +  | +  |
| 1773/1774 | Q61D        | +  |    |    |
| 1775/1776 | R323K       |    | +  | +  |
| 1777/1778 | P71F        | +  | +  | +  |
| 1779/1780 | V913L       | +  | +  | +  |
| 1781/1782 | E614S       | +  | ++ | +  |
| 1783/1784 | M260L       |    |    | ++ |
| 1785/1786 | L259S       |    |    | +  |
| 1787/1788 | L823R       |    |    | ++ |
| 1789/1790 | L240Y       |    |    | +  |
| 1791/1792 | S402W       | +  |    | ++ |
| 1793/1794 | E937G       |    |    | +  |
| 1795/1796 | H63Y        |    | +  | ++ |
| 1797/1798 | I249V/S777N | +  |    | ++ |
| 1799/1800 | E42M        |    |    | +  |
| 1801/1802 | E188V       | +  | +  | +  |
| 1803/1804 | S402L       | +  | +  | +  |
| 1805/1806 | A112V       | ++ | ++ | ++ |
| 1807/1808 | G108H       | +  | ++ | ++ |
| 1809/1810 | P682R       | ++ | +  | +  |
| 1811/1812 | M432I       |    |    | +  |
| 1813/1814 | Q61S        | +  | +  | +  |
| 1815/1816 | N527A       | +  | +  | +  |
| 1817/1818 | A741I       |    |    | +  |
| 1819/1820 | G251C       |    |    | +  |



|           |       |    |    |   |
|-----------|-------|----|----|---|
| 1821/1822 | H63E  | ++ | ++ | + |
| 1823/1824 | T91V  |    |    | + |
| 1825/1826 | Q421P |    |    | + |
| 1827/1828 | E937L |    |    | + |

<sup>1</sup>Всю активность определяют относительно эталонного полипептида с SEQ ID NO: 20. Уровни повышенной активности определены следующим образом: «+»=0,9-1,1; и «++» >1,1.

### ПРИМЕР 11

#### **Высокопроизводительный рост суспензионных клеток млекопитающих и анализы ГАА, полученные с помощью экспрессии суспензии млекопитающих** **Высокопроизводительный (НТР) рост ГАА и вариантов ГАА в суспензионных клетках млекопитающих (Expi293F)**

Клетки EXPI293F™ (ThermoFisher Scientific) трансфицируют рДН или ПЦР-амплифицированной линейной ДНК (как описано в примере 1), кодирующей синтетический сигнальный пептид IG мыши (SEQ ID NO: 3381 и 3382), слитый с ГАА дикого типа или вариантами ГАА, с использованием способа липофекции с реагентом EXPIFECTAMINE™ 293 (ThermoFisher Scientific) в экспрессионной среде EXPI293™ (ThermoFisher Scientific). Клетки EXPI293F™ (ThermoFisher Scientific) культивируют в экспрессионной среде EXPI293™ (ThermoFisher Scientific) и высевают в планшеты с глубокими лунками объемом 1,1 мл Axygen (Corning, P-DW-11-CS) при плотности  $1 \times 10^6$  клеток/лунку/400 мкл. Клетки подвергают трансфекции, опосредованной липофекцией, и возвращают во встряхивающий инкубатор с 8% CO<sub>2</sub> и 70% влажностью на 3-4 дня для обеспечения экспрессии и секреции вариантов ГАА в кондиционированные среды. Кондиционированные среды собирают путем центрифугирования планшетов экспрессии и переноса кондиционированных сред в ПЦР планшеты BioRad Hardshell (BioRad, HSP9601). Планшеты снова центрифугируют, и осветленные кондиционированные среды переносят в новые 96-луночные планшеты для определения активности, стабильности или поглощения при анализе клеток.

#### **НТР-анализ супернатантов**

Активность варианта ГАА определяют путем измерения гидролиза 4-метилумбеллиферил  $\alpha$ -D-глюкопиранозида (4-MUGlu). Для не спровоцированного анализа, 5-10 мкл осветленной кондиционированной среды EXPI293F™, полученной, как описано выше, смешивают с 50 мкл 1 мМ 4-MUGlu в буфере McIlvaine (McIlvaine, J. Biol. Chem., 49:183-186 [1921]), pH 4,5, в 96-луночном планшете с черным непрозрачным дном. Реакции инкубируют при 25-37°C в течение 10-60 минут при перемешивании при 400 об/мин перед гашением 100 мкл 0,5 М карбоната натрия, pH 10,5. Гидролиз анализируют с использованием микропланшетного ридера SPECTRAMAX® M2 (Molecular Devices) или микропланшетного ридера ENVISION® (Perkin Elmer) (возб. 355 нм, исп. 460 нм). Неспровоцированную активность FIOPC рассчитывают делением нормализованного

варианта GAA на активность эталонного полипептида с указанной SEQ ID NO.

#### **НТР-анализ супернатантов, спровоцированных плазмой**

Варианты GAA провоцируют плазмой, чтобы имитировать условия, с которыми варианты сталкиваются в крови после их введения пациенту. Сначала 30 мкл вариантов GAA в очищенной кондиционированной среде EXPI293F™ объединяют с 30 мкл плазмы (Innovative Research, Innovative Grade US Origin Monkey Cynomolgus Plasma K2 EDTA) в 96-луночном планшете. Планшеты запечатывают и инкубируют при 37°C в течение 2-4 часов. Затем 10 мкл образца, зараженного плазмой, смешивают с 50 мкл 1,5 мМ 4-MUGlu в буфере McIlvaine, pH 4,4. Реакции инкубируют при 25-37°C в течение 15-60 минут при перемешивании со скоростью 400 об/мин перед гашением 100 мкл 0,5 М карбоната натрия, pH 10,5. Гидролиз анализируют с использованием микропланшетного ридера SPECTRAMAX® M2 или микропланшетного ридера ENVISION® (Perkin Elmer) с мониторингом флуоресценции (возб. 355 нм, исп. 460 нм). Стабильность плазмы FIOPC рассчитывают путем деления нормализованной активности варианта GAA после провокации на активность эталонного полипептида с указанной SEQ ID NO после провокации.

#### **НТР-анализ активности GAA в лизатах фибробластов Помпе и нокаутных миобластов C2C12 GAA**

Варианты GAA из экспрессии НТР EXPI293F™ в осветленной кондиционированной среде инкубируют с клетками-мишенями и анализируют на остаточную внутриклеточную активность через 24-72 часа. Для этих экспериментов, используют клетки млекопитающих, лишенные функциональной активности GAA, а именно фибробласты, полученные от пациентов с Помпе (Coriell Institute for Medical Research # GM00248) и миобласты C2C12, чей нативный ген GAA нокаутирован с помощью редактирования Crispr-Cas9. В этих экспериментах, фибробласты Помпе или миобласты с нокаутом C2C12 GAA высевают в 96-луночные планшеты COSTAR® (3904, Corning) и позволяют расти до конфлюентности в стандартной полной питательной среде. После конфлюентности, полную культуральную среду для роста удаляют из планшетов с помощью автоматизированного робота для работы с жидкостями BIOMEK® i5. Осветленную кондиционированную среду от транзиторных трансфекций НРТ в EXPI293F™ переносят в фибробласты, полученные от пациентов Помпе, и миобласты C2C12, и инкубируют в течение 4-24 часов при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Среду удаляют из культур с помощью автоматизированного робота для работы с жидкостями BIOMEK® i5. Клетки быстро промывают 150 мкл 1xDPBS на лунку и удаляют DPBS с помощью автоматизированного робота для работы с жидкостями BIOMEK® i5. Затем в каждую лунку добавляют 200 мкл стандартной полной питательной среды, и планшеты возвращают в инкубатор на 0-72 часа. По завершении инкубации, стандартную полную среду для выращивания удаляют с помощью автоматизированного робота для работы с жидкостями BIOMEK® i5. Клетки промывают 150 мкл 1xDPBS на лунку и удаляют DPBS с помощью автоматизированного устройства для обработки жидкостей BIOMEK® i5.

Клетки лизируют добавлением 50 мкл буфера McIlvaine, pH 4,4, с добавлением 0,2-0,5% неионного поверхностно-активного вещества TRITON X-100™ (Sigma #93443) и перемешиванием при комнатной температуре в течение 30 минут. Активность оценивают добавлением 50 мкл 1,5 mM 4-MUGlu в буфере McIlvaine, pH 4,4. Планшеты запечатывают, инкубируют при 37°C в течение 300-360 минут при встряхивании при 400 об/мин, перед гашением 100 мкл 0,5 M карбоната натрия, pH 10,5. Гидролиз анализируют с использованием микропланшетного ридера SPECTRAMAX® M2 или микропланшетного ридера ENVISION® (Perkin Elmer) с мониторингом флуоресценции (возб. 355 нм, исп. 460 нм). Клеточное поглощение FIOPC рассчитывают путем деления внутриклеточной активности нормализованного варианта GAA на активность эталонного полипептида с указанной SEQ ID NO.

### **ПРИМЕР 12**

#### **Варианты GAA SEQ ID NO: 946**

В этом примере описаны эксперименты по эволюции и скринингу вариантов GAA, полученных из SEQ ID NO: 946, на улучшенную активность GAA после ряда провокаций. Библиотеки вариантных генов GAA, кодируемых на основе SEQ ID NO: 946, конструируют, высевают, выращивают и подвергают скринингу на активность GAA MUGlu («Неспровоцированная активность FIOPC»), а также после провокации плазмой («Стабильность плазмы и активность FIOPC»), как описано в примере 11. Варианты также тестируют на активность 4-MUGlu после лизиса фибробластов Помпе, обработанных в течение 24 часов («Активность лизата в результате продолжительной обработки фибробластов Помпе FIOPC»), или клеток C2C12 GAA<sup>-/-</sup> («Активность лизата при длительной обработке C2C12 GAA<sup>-/-</sup> FIOPC») или 6-часовой обработки («Активность лизата при быстрой обработке фибробластов Помпе FIOPC») или («Активность лизата при быстрой обработке C2C12 GAA<sup>-/-</sup> FIOPC»), как описано в примере 11. Результаты этих анализов представлены в таблице 12-1.

|   |
|---|
| <b>Таблица 12-1. Активность вариантов GAA относительно SEQ ID NO: 946<sup>1</sup></b> |
|---|

| SEQ ID NO:<br>(нт/ак) | Аминокислотные различия (относительно SEQ ID NO: 946) | Неспрощированная активность FIOPC | Стабильность и активность в плазме FIOPC | Активность от лизата при длительной обработке фибробластов Помпе FIOPC | Активность от лизата при длительной обработке C2C12 GAA-/FIOPC | Активность от лизата при быстрой обработке фибробластов Помпе FIOPC | Активность от лизата при быстрой обработке C2C12 GAA-/FIOPC |
|-----------------------|---|-----------------------------------|--|--|--|---|---|
| 945/946               |   | +                                 | +  | +  | +  | +   | +   |
| 1829/1830             | A62W/A89R/E188W/D489A/D500A/S727W/L823F               |                                   |  | +++  | ++   | +++   |   |
| 1831/1832             | S124V/D500A/S842G/R862Q                               | +                                 |  | ++   | ++   | ++  |   |
| 1833/1834             | W24R/D489A/D500A/S842G                                | +                                 | +  |  | ++   | +   | ++  |
| 1835/1836             | W24R/Q39H/D489A/R862Q                                 | ++                                | +  |  | ++   |   |   |
| 1837/1838             | W24R/P57L/L823F/R862Q                                 | +                                 | +  | +  | +  | ++  |   |

|               |  |   |   |     |    |     |  |
|---------------|--|---|---|-----|----|-----|--|
| 1839/18<br>40 | P57L   | + | + | ++  | +  | ++  |  |
| 1841/18<br>42 | W24R/A<br>89R/D48<br>9A                                    | + | + |     | +  |     |  |
| 1843/18<br>44 | W24R/A<br>89R/D48<br>9A/S727<br>W/R862<br>Q                | + | + | ++  | ++ | +   |  |
| 1845/18<br>46 | Q39H/P5<br>7L/A62<br>W/E188<br>W/D500<br>A/S842G           |   |   | +++ | ++ | +++ |  |
| 1847/18<br>48 | W24R/P5<br>7L/A62<br>W/A89R/<br>D489A/L<br>823F/R8<br>62Q  | + |   | ++  | ++ | ++  |  |
| 1849/18<br>50 | W24R/A<br>62W/A89<br>R/E188<br>W/L823<br>V/S842G<br>/R862Q |   |   | +   |    | ++  |  |
| 1851/18<br>52 | P57L/E1<br>88W/D48<br>9A/L823<br>F/R862Q                   |   |   | ++  | ++ | +++ |  |
| 1853/18<br>54 | Q39H/P5<br>7L/D500<br>A/R862Q                              | + | + | ++  | ++ | ++  |  |

|               |   |  |   |     |    |     |    |
|---------------|---|--|---|-----|----|-----|----|
| 1855/18<br>56 | A62W/S<br>124V/E1<br>88W/L82<br>3F/S842<br>G/R862Q          |  |   | ++  | ++ | +++ |    |
| 1857/18<br>58 | P57F/A6<br>2L/L305<br>F/D500A<br>/V913R/<br>S916G           |  |   | +++ | ++ | +++ |    |
| 1859/18<br>60 | P57F/E6<br>14Q/S91<br>6G/S932<br>A                          |  |   | ++  |    | ++  |    |
| 1861/18<br>62 | P57F/A6<br>2L/L305<br>F/V913R                               |  |   | ++  | +  | ++  | ++ |
| 1863/18<br>64 | P57F/A6<br>2L/A437<br>G/D500A<br>/L761F/P<br>914K/S9<br>16R |  | + | +++ | ++ | +   |    |
| 1865/18<br>66 | A62L/A4<br>37G/V91<br>3R/S916<br>R                          |  | + | ++  | ++ |     |    |
| 1867/18<br>68 | A62L/D4<br>89A/E61<br>4Q/S916<br>R                          |  |   | ++  | +  | ++  |    |
| 1869/18<br>70 | P57F/A6<br>2L/V913<br>R/S916R/<br>S932A                     |  |   | +++ | ++ | ++  |    |

|               |   |  |  |     |     |     |    |
|---------------|---|--|--|-----|-----|-----|----|
| 1871/18<br>72 | A62L/N5<br>27R/S72<br>7W/S916<br>G                                    |  |  | +++ |     |     |    |
| 1873/18<br>74 | P57F/A6<br>2W/L305<br>F/A437G<br>/D500A/<br>S727W/<br>V913R/S<br>916R |  |  | +++ | +++ | ++  |    |
| 1875/18<br>76 | P57F/A4<br>37G/D50<br>0A/E614<br>Q/S727<br>W/P914R                    |  |  | +++ | ++  |     |    |
| 1877/18<br>78 | D500A/S<br>727W/V9<br>13R/S91<br>6R                                   |  |  | +++ | ++  | +   |    |
| 1879/18<br>80 | E381V   |  |  | ++  | +   | +   |    |
| 1881/18<br>82 | S124V/T<br>148R/E3<br>81W/S72<br>7W/E858<br>W/E937<br>K               |  |  | +++ |     | ++  |    |
| 1883/18<br>84 | E381W/E<br>858C/E9<br>37K   |  |  | +++ | ++  | ++  |    |
| 1885/18<br>86 | A62F/E6<br>14R  |  |  | +++ | ++  | +++ | ++ |

|               |  |   |   |      |    |     |     |
|---------------|--|---|---|------|----|-----|-----|
| 1887/18<br>88 | A89R/T1<br>48R/P14<br>9R/E381<br>W                           | + |   | +++  | ++ | ++  | ++  |
| 1889/18<br>90 | A62F/P1<br>49R/E38<br>1V/E858<br>W/E937<br>K                 |   |   | +++  | ++ | +++ |     |
| 1891/18<br>92 | A62F/P1<br>49R/S72<br>7W                                     |   |   | +++  | ++ | +++ | ++  |
| 1893/18<br>94 | A89R/T1<br>48R/P14<br>9R                                     | + | + | +++  | ++ | +++ | +++ |
| 1895/18<br>96 | A62F/A8<br>9R/S124<br>V/T148R<br>/E381W/<br>E858W            |   |   | ++++ | ++ | +++ | ++  |
| 1897/18<br>98 | A62F/A8<br>9R/T148<br>R/E381V<br>/E614R/E<br>858W            |   |   | +++  | ++ | +++ | ++  |
| 1899/19<br>00 | A62W/S<br>124V/P1<br>49R/E38<br>1V/P832<br>R/E858C<br>/E937K |   |   | +++  | +  | ++  |     |
| 1901/19<br>02 | S124V/P<br>832R/E9<br>37K                                    |   |   | +++  | ++ | ++  | +   |



|               |  |   |   |      |    |     |    |
|---------------|--|---|---|------|----|-----|----|
| 1903/19<br>04 | A62W/A<br>89R/E38<br>1V                            | + | + | +++  | ++ | ++  | +  |
| 1905/19<br>06 | A62W/P<br>149R/E3<br>81W/E61<br>4R/E937<br>K       |   |   | +++  | ++ | +++ | +  |
| 1907/19<br>08 | S124V/E<br>381W/E6<br>14R                          |   |   | +++  | +  | ++  | +  |
| 1909/19<br>10 | A62F/E9<br>6K/E614<br>R                            |   |   | +++  | +  | ++  |    |
| 1911/19<br>12 | T148R/P<br>832R/E8<br>58W/E93<br>7K                |   |   | +++  | ++ | +++ |    |
| 1913/19<br>14 | A62F/A8<br>9R/E381<br>V/D923<br>W                  |   |   | +++  | +  | ++  | ++ |
| 1915/19<br>16 | A62F/E3<br>81V                                     |   |   | +++  | +  | +   |    |
| 1917/19<br>18 | A62W/T<br>148R/P1<br>49R/E38<br>1V/E858<br>C/E937K |   |   | ++++ | ++ | ++  | +  |
| 1919/19<br>20 | A62W/T<br>148R/E3<br>81W/E85<br>8C                 |   |   | +++  | ++ | ++  | ++ |

|               |  |   |   |      |    |    |     |
|---------------|--|---|---|------|----|----|-----|
| 1921/19<br>22 | A62F/A8<br>9R/P149<br>R/E381<br>W/P832R                |   |   | ++++ | ++ | ++ | +   |
| 1923/19<br>24 | A62W/A<br>89R/P14<br>9R/E381<br>W                      | + |   | +++  | ++ | ++ | +   |
| 1925/19<br>26 | D923W  |   |   | ++   |    |    |     |
| 1927/19<br>28 | A62W/A<br>89R/S12<br>4V/E381<br>W/E858<br>C            |   |   | +++  | ++ | ++ |     |
| 1929/19<br>30 | E381V/E<br>614R/P8<br>32R                              |   |   | +++  | +  | ++ | ++  |
| 1931/19<br>32 | A62W/A<br>89R/E38<br>1W/E858<br>C                      |   |   | +++  | +  | ++ | ++  |
| 1933/19<br>34 | A89R/E3<br>81W   | + | + | ++   | ++ | ++ |     |
| 1935/19<br>36 | A62W/S<br>124V/T1<br>48R/P14<br>9R/E381<br>W/E614<br>R |   |   | +++  | +  | ++ | +++ |
| 1937/19<br>38 | A62F/S1<br>24V/E38<br>1W/P832<br>R                     |   |   | +++  | +  | ++ |     |

|               |  |   |   |      |    |     |      |
|---------------|--|---|---|------|----|-----|------|
| 1939/19<br>40 | S19T/S1<br>24V/P14<br>9R/E381<br>V/S727<br>W           |   |   | +++  | +  | ++  |      |
| 1941/19<br>42 | A62W/T<br>148R/E3<br>81W/E61<br>4R/E937<br>K           |   |   | +++  | ++ | ++  | +    |
| 1943/19<br>44 | A62F/A8<br>9R/T148<br>R/D923<br>W                      |   |   | +++  | ++ | +++ | ++++ |
| 1945/19<br>46 | A62W/T<br>148R/E3<br>81W/S72<br>7W                     |   |   | ++++ | ++ | ++  | +++  |
| 1947/19<br>48 | A62W/E<br>381V   |   |   | ++   | +  |     |      |
| 1949/19<br>50 | A62F/A8<br>9R  | + | + | +++  | ++ | +   | ++   |
| 1951/19<br>52 | A62F/A8<br>9R/E858<br>C                                |   |   | +++  | ++ | ++  | ++   |
| 1953/19<br>54 | A62W/A<br>437G/D4<br>89A/E61<br>4Q/S727<br>W/V913<br>R |   |   | ++   | ++ | +   |      |

|               |   |  |   |     |     |     |    |
|---------------|---|--|---|-----|-----|-----|----|
| 1955/19<br>56 | A62L/A4<br>37G/D48<br>9A/N527<br>R/S727W<br>/V913R/<br>S932A                    |  |   | +++ | +++ | ++  | +  |
| 1957/19<br>58 | P57F/A6<br>2W/L305<br>F/D489A<br>/Q907K/<br>V913R/S<br>916G                     |  |   | +++ | ++  | +++ | ++ |
| 1959/19<br>60 | P57F/A6<br>2W/L305<br>F/S916R   |  |   | ++  | ++  | +++ | ++ |
| 1961/19<br>62 | P57F/A4<br>37G/D50<br>0A/N527<br>R/S727W<br>/S916R                              |  |   | +++ | +++ | ++  | ++ |
| 1963/19<br>64 | A62L/L3<br>05F/S727<br>W  |  |   | ++  |     | +++ | ++ |
| 1965/19<br>66 | P57F/A6<br>2L/L305<br>F/A437G<br>/E614Q/<br>A683S/V<br>913R/S9<br>16R/S93<br>2A |  |   | +++ | ++  | ++  | +  |
| 1967/19<br>68 | P57F/L3<br>05F  |  | + | ++  | +   | ++  | +  |

|               |   |   |    |      |     |    |    |
|---------------|---|---|----|------|-----|----|----|
| 1969/19<br>70 | D489A/E<br>614Q/S9<br>16G                         |   |    | ++   | +   | ++ |    |
| 1971/19<br>72 | D489A/D<br>500A                                   | + | ++ | ++   | ++  | ++ |    |
| 1973/19<br>74 | P57F/A6<br>2W/A437<br>G/V913R<br>/S916G           |   |    | ++   | ++  | ++ | ++ |
| 1975/19<br>76 | P57F/A6<br>2W/L305<br>F/D489A<br>/V913R/<br>S916G |   |    | +++  | ++  | ++ | ++ |
| 1977/19<br>78 | A62W/S<br>727W                                    |   |    | ++   |     | ++ | ++ |
| 1979/19<br>80 | A62L/N5<br>27R                                    |   |    | ++   | +   | ++ | +  |
| 1981/19<br>82 | P57F/L3<br>05F/A43<br>7G/S916<br>G                |   | +  | +++  | ++  |    |    |
| 1983/19<br>84 | A62L/A4<br>37G/N52<br>7R/S727<br>W                | + | +  | ++++ | +++ |    |    |
| 1985/19<br>86 | P57F/A6<br>2L/A437<br>G/N527R<br>/S727W           |   | +  | ++++ | +++ |    |    |

|               |   |   |    |      |     |    |     |
|---------------|---|---|----|------|-----|----|-----|
| 1987/19<br>88 | A62W/D<br>489A/N5<br>27R/S91<br>6R/S932<br>A                          |   |    | +++  | +++ |    |     |
| 1989/19<br>90 | A62L/D4<br>89A/D50<br>0A/S932<br>A                                    | + | ++ | ++   | ++  |    |     |
| 1991/19<br>92 | D500A/P<br>914R/S9<br>16G   |   | +  | +++  | ++  |    |     |
| 1993/19<br>94 | A62W/D<br>500A  |   | +  | ++   | ++  |    |     |
| 1995/19<br>96 | A62L/L3<br>05F/A43<br>7G/D500<br>A/S727<br>W/V913<br>R                |   |    | +++  | ++  | ++ |     |
| 1997/19<br>98 | A437G   | + | +  | +    | +   |    |     |
| 1999/20<br>00 | P57F/A6<br>2L/S916<br>G   | + | ++ | +++  | ++  |    |     |
| 2001/20<br>02 | P57F/A6<br>2L/L305<br>F/A437G<br>/D500A/<br>E614Q/S<br>727W/S9<br>16R |   |    | ++++ | +++ | ++ | +++ |

|  |   |   |    |     |     |    |    |
|--|---|---|----|-----|-----|----|----|
| 2003/20<br>04  | A437G/D<br>489A/P9<br>14R/S91<br>6R               | + | +  | ++  | ++  |    |    |
| 2005/20<br>06  | P57F/A6<br>2W/F120<br>I/N527R/<br>V913R/S<br>916R |   |    | ++  |     | ++ | ++ |
| 2007/20<br>08  | A62L/A4<br>37G/N52<br>7R/S916<br>G/S932A          |   | +  | +++ | ++  |    | ++ |
| 2009/20<br>10  | A437G/S<br>727W/P9<br>14K                         |   | +  | +++ | ++  |    |    |
| 2011/20<br>12  | P57F/A4<br>37G/V91<br>3R/P914<br>R                | + | ++ | ++  | +++ |    | ++ |
| 2013/20<br>14  | A62W/S<br>916G                                    | + | ++ | ++  | +   |    |    |
| 2015/20<br>16  | P57F/D4<br>89A/N52<br>7R/P914<br>R/S916G          |   |    | +++ | ++  |    |    |
| 2017/20<br>18  | A437G/P<br>914R/S9<br>16G                         |   | +  | ++  | ++  |    |    |
| <sup>1</sup> Всю активность определяют относительно эталонного полипептида с SEQ ID NO: 946.<br>Уровни повышенной активности определены следующим образом: «+»=0,9-1,1; «++»<br>>1,1; «+++» >2; и «++++» >3,5. |   |   |    |     |     |    |    |

**ПРИМЕР 13****Варианты GAA SEQ ID NO: 1956**

В этом примере описаны эксперименты по эволюции и скринингу вариантов GAA,

полученных из SEQ ID NO: 1956, на улучшенную активность GAA после ряда провокаций. Библиотеки вариантных генов GAA, кодируемых на основе SEQ ID NO: 1956, конструируют, высевают, выращивают и подвергают скринингу на активность GAA MU-Glu («Неспровоцированная активность FIOPC»), а также после провокации плазмой («Стабильность плазмы и активность FIOPC»), как описано в примере 11. Варианты также тестируют на активность 4-MUGlu после лизиса фибробластов Помпе, обработанных в течение 24 часов («Активность лизата в результате продолжительной обработки фибробластов Помпе FIOPC»), или клеток C2C12 GAA<sup>-/-</sup> («Активность лизата при длительной обработке C2C12 GAA<sup>-/-</sup> FIOPC») или 6-часовой обработки («Активность лизата при быстрой обработке фибробластов Помпе FIOPC») или («Активность лизата при быстрой обработке C2C12 GAA<sup>-/-</sup> FIOPC»), как описано в примере 11. Результаты этих анализов представлены в таблицах 13-1 и 13-2.

| <b>Таблица 13-1. Активность вариантов GAA относительно SEQ ID NO: 1956<sup>1</sup></b> |   |  |   |   |  |  |   |
|--|---|--|---|---|--|--|---|
| <b>SEQ ID NO:<br/>(нт/ак)</b>  | <b>Аминокислотные различия (относительно SEQ ID NO: 1956)</b> | <b>Неспровоцированная активность FIOPC</b> | <b>Стабильность и активность в плазме FIOPC</b> | <b>Активность от лизата при длительной обработке фибробластов Помпе FIOPC</b> | <b>Активность от лизата при длительной обработке C2C12 GAA<sup>-/-</sup> FIOPC</b> | <b>Активность от лизата при быстрой обработке фибробластов Помпе FIOPC</b> | <b>Активность от лизата при быстрой обработке C2C12 GAA<sup>-/-</sup> FIOPC</b> |
| 1955/1956  |   | +  | +   | +   | +  | +  | +   |
| 2019/2020  | Q795E   | +  |   | ++  | ++   | +  | ++  |
| 2021/2022  | P78E/S372T/L390Q  |  |   |   | ++   |  |   |
| 2023/2024  | D87E/T266N/S372T/T483S  |  | ++  | ++  | ++   |  | ++  |
| 2025/2026  | D87E/Q795E  | +  | +   | +++   | ++   | ++   | +++   |



|               |   |    |    |    |     |    |    |
|---------------|---|----|----|----|-----|----|----|
| 2027/20<br>28 | T266N/S37<br>2T/T924N                           |    | ++ | +  | ++  | ++ | ++ |
| 2029/20<br>30 | P78E  | +  | ++ | ++ | +   | +  |    |
| 2031/20<br>32 | P78E/D87<br>E/V536T                             | ++ | ++ | ++ | +++ |    |    |
| 2033/20<br>34 | D87E/T266<br>N/T483S                            | +  | ++ | ++ | +++ | +  | ++ |
| 2035/20<br>36 | D87E  | +  | +  | ++ | ++  | +  | ++ |
| 2037/20<br>38 | P78E/D87<br>E/K176T/T<br>266N/V536<br>T/Q615D   | +  | ++ | +  | ++  | +  | ++ |
| 2039/20<br>40 | P78E/D87<br>E/T266N/T<br>483S/T924<br>N         |    | ++ | ++ | +++ |    | ++ |
| 2041/20<br>42 | D87E/S372<br>T/S777G                            | +  |    | +  |     | ++ | +  |
| 2043/20<br>44 | T266N/S37<br>2T/V536T/<br>Q615D/T7<br>63L/S777G |    |    |    |     |    | +  |
| 2045/20<br>46 | P78E/V536<br>T/Q615D                            | +  |    | ++ |     |    |    |
| 2047/20<br>48 | P78E/T266<br>N/T483S/V<br>536T/Q615<br>D        | +  | +  |    | ++  |    |    |
| 2049/20<br>50 | T266N   | +  | ++ | ++ | +++ | +  | ++ |
| 2051/20<br>52 | D87E/Q61<br>5D                                  |    |    | ++ | +++ | ++ | +  |

|               |   |   |     |     |     |    |     |
|---------------|---|---|-----|-----|-----|----|-----|
| 2053/20<br>54 | P78E/T266<br>N/T763L                          | + | ++  | ++  | +++ |    |     |
| 2055/20<br>56 | P78E/D87<br>E/T266N/S<br>372T/A386<br>Y/S777G | + | +++ | ++  | ++  |    | +   |
| 2057/20<br>58 | D87E/V53<br>6T/S777G                          | + | +   | ++  |     | +  | +   |
| 2059/20<br>60 | L390Q/Q6<br>15D                               | + |     | +   |     | ++ |     |
| 2061/20<br>62 | P78E/T266<br>N/T483S/Q<br>795E                | + | +++ | ++  | +++ |    | ++  |
| 2063/20<br>64 | P78E/D87<br>E/T483S/S<br>777G                 | + | +   |     |     |    | ++  |
| 2065/20<br>66 | D87E/T266<br>N                                | + | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ |
| 2067/20<br>68 | P78E/L390<br>Q                                | + |     | ++  | +   |    |     |
| 2069/20<br>70 | T266N/V5<br>36T/Q615<br>D/Q795E               | + | +   | ++  | +++ | +  | +   |
| 2071/20<br>72 | D87E/T266<br>N/T924N                          |   | ++  | ++  | ++  |    | +   |
| 2073/20<br>74 | P78E/D87<br>E/T266N/S<br>372T/V536<br>T       | + | +++ | ++  | +++ | +  | ++  |
| 2075/20<br>76 | S202K   | + |     | ++  | +   | ++ | ++  |
| 2077/20<br>78 | T44G  | + |     | +   | ++  |    | ++  |
| 2079/20       | S446T   | + | +   | ++  |     | ++ | ++  |

|               |                       |    |    |    |    |    |     |
|---------------|-----------------------|----|----|----|----|----|-----|
| 80            |                       |    |    |    |    |    |     |
| 2081/20<br>82 | Q344M                 | +  | ++ | ++ | +  | ++ | +++ |
| 2083/20<br>84 | L41I/S53M             | +  | +  |    | ++ |    | ++  |
| 2085/20<br>86 | L488M                 | +  | +  | +  | ++ | +  | ++  |
| 2087/20<br>88 | Q615G                 |    |    | +  | ++ | +  | ++  |
| 2089/20<br>90 | P779E                 | +  |    | +  |    | ++ | ++  |
| 2091/20<br>92 | S777G                 | ++ | +  | ++ |    | ++ | ++  |
| 2093/20<br>94 | T141W                 | +  |    |    |    | +  | +   |
| 2095/20<br>96 | G65L                  | +  |    |    | +  | ++ | ++  |
| 2097/20<br>98 | L857T                 | +  |    |    |    | +  | +   |
| 2099/21<br>00 | P779R                 | +  | ++ | ++ | ++ | ++ | ++  |
| 2101/21<br>02 | S202N                 | +  |    | +  |    | ++ | ++  |
| 2103/21<br>04 | S678H                 | +  | ++ |    |    | +  | +   |
| 2105/21<br>06 | Q425R/S67<br>8I/G894C |    |    | ++ | +  | ++ | +++ |
| 2107/21<br>08 | T543C                 | +  |    | +  | +  | +  | +   |
| 2109/21<br>10 | T543S                 | +  | ++ | ++ | ++ | ++ | ++  |
| 2111/21<br>12 | V859Y                 |    |    |    |    | +  | +   |
| 2113/21       | P199V                 | +  | ++ | ++ | ++ | ++ | ++  |

|               |           |    |    |    |    |    |    |
|---------------|-----------|----|----|----|----|----|----|
| 14            |           |    |    |    |    |    |    |
| 2115/21<br>16 | G412Y     | +  |    |    |    | +  | +  |
| 2117/21<br>18 | L909F     | +  | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 2119/21<br>20 | F679W     | +  | +  |    |    |    |    |
| 2121/21<br>22 | G65V      | +  |    |    |    | +  | +  |
| 2123/21<br>24 | P503S     | +  | +  |    |    | ++ | ++ |
| 2125/21<br>26 | G56L      | +  | ++ | +  | ++ | ++ | +  |
| 2127/21<br>28 | G56A      | +  | +  | +  |    | ++ | +  |
| 2129/21<br>30 | L423V     | +  | +  |    |    | +  |    |
| 2131/21<br>32 | S777I     | +  |    | +  | +  | +  | +  |
| 2133/21<br>34 | V797L     |    |    |    | ++ |    | ++ |
| 2135/21<br>36 | S678Y     | ++ | ++ | +  | +  | +  | ++ |
| 2137/21<br>38 | N484L     |    |    |    |    |    | ++ |
| 2139/21<br>40 | Q768S     | +  |    | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 2141/21<br>42 | T145R     | +  | +  | ++ |    | ++ | ++ |
| 2143/21<br>44 | I156L     |    |    |    |    | +  | ++ |
| 2145/21<br>46 | V797M     |    |    |    | +  | +  | +  |
| 2147/21       | T44P/L347 |    |    |    |    | +  |    |

|               |       |    |    |    |    |    |    |
|---------------|-------|----|----|----|----|----|----|
| 48            | I     |    |    |    |    |    |    |
| 2149/21<br>50 | E773V | ++ |    | ++ |    | ++ | ++ |
| 2151/21<br>52 | A105T | +  | ++ |    | +  | +  | +  |
| 2153/21<br>54 | L530V |    |    |    |    | +  | ++ |
| 2155/21<br>56 | T543Q | ++ |    | ++ |    | ++ | +  |
| 2157/21<br>58 | T543V | +  |    | +  | ++ | ++ | ++ |
| 2159/21<br>60 | L488K | +  | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 2161/21<br>62 | T826G |    |    |    |    |    | +  |
| 2163/21<br>64 | V859T | +  |    | +  | +  | ++ | ++ |
| 2165/21<br>66 | T141S | ++ |    | ++ | +  | ++ | ++ |
| 2167/21<br>68 | S202L | +  |    | +  | ++ |    | ++ |
| 2169/21<br>70 | S202R | +  |    | +  | +  |    | +  |
| 2171/21<br>72 | A834H | +  |    |    |    |    | +  |
| 2173/21<br>74 | L488G |    | ++ |    |    |    |    |
| 2175/21<br>76 | S777R | +  |    | +  | +  |    | +  |
| 2177/21<br>78 | T44R  | ++ | ++ | ++ | +  | ++ | ++ |
| 2179/21<br>80 | S136G |    |    |    |    | +  | +  |
| 2181/21       | T44E  | ++ | +  | ++ | ++ | ++ | ++ |

|               |       |    |    |    |     |    |     |
|---------------|-------|----|----|----|-----|----|-----|
| 82            |       |    |    |    |     |    |     |
| 2183/21<br>84 | T145I | +  |    | +  | +   | ++ | ++  |
| 2185/21<br>86 | D726E |    |    |    |     |    | +   |
| 2187/21<br>88 | S202T | +  |    | +  | +   | +  | ++  |
| 2189/21<br>90 | P779H |    |    |    |     | ++ | +   |
| 2191/21<br>92 | A496G | +  |    | +  | +   |    | +   |
| 2193/21<br>94 | S678L | +  | ++ |    |     | ++ | +++ |
| 2195/21<br>96 | G56R  | +  | ++ | +  | ++  | ++ | +   |
| 2197/21<br>98 | D348G | +  |    | ++ | ++  | ++ | ++  |
| 2199/22<br>00 | Q344G |    | +  |    |     |    | +   |
| 2201/22<br>02 | S678T | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | ++  |
| 2203/22<br>04 | T44L  | ++ |    | ++ | +   | ++ | ++  |
| 2205/22<br>06 | L656V |    | +  |    | ++  |    | +   |
| 2207/22<br>08 | L693F |    |    |    |     |    | +   |
| 2209/22<br>10 | V710N |    |    |    |     |    | +   |
| 2211/22<br>12 | V710L |    | +  |    |     |    |     |
| 2213/22<br>14 | M663A |    |    |    |     |    | +   |
| 2215/22       | V710M | +  |    |    |     |    |     |

|               |                 |   |    |    |    |    |    |
|---------------|-----------------|---|----|----|----|----|----|
| 16            |                 |   |    |    |    |    |    |
| 2217/22<br>18 | L670I           | + |    | ++ | +  |    | +  |
| 2219/22<br>20 | L670F           | + | ++ | +  | ++ |    | +  |
| 2221/22<br>22 | L670R           | + | +  | ++ |    | +  | ++ |
| 2223/22<br>24 | V710S           |   |    |    |    |    | +  |
| 2225/22<br>26 | F588L           | + |    |    |    |    |    |
| 2227/22<br>28 | F705M           |   | +  |    |    |    | +  |
| 2229/22<br>30 | L670Q           | + | +  | +  | +  |    |    |
| 2231/22<br>32 | L670T           | + | ++ | +  | ++ |    | ++ |
| 2233/22<br>34 | K154R/F58<br>8L | + |    |    |    |    | +  |
| 2235/22<br>36 | L693Y           |   |    | +  |    |    |    |
| 2237/22<br>38 | V710K           |   | +  | +  |    |    | +  |
| 2239/22<br>40 | A708C           |   |    | +  | +  |    | ++ |
| 2241/22<br>42 | Y430F           |   |    | +  |    |    | +  |
| 2243/22<br>44 | I816L           |   |    | ++ |    |    |    |
| 2245/22<br>46 | L656M           |   |    | ++ |    |    |    |
| 2247/22<br>48 | L670W           |   |    | +  | +  | ++ | ++ |
| 2249/22       | L670V           | + |    |    |    | +  |    |

|               |                 |    |    |    |    |    |    |
|---------------|-----------------|----|----|----|----|----|----|
| 50            |                 |    |    |    |    |    |    |
| 2251/22<br>52 | L693I           |    |    | ++ | +  |    | ++ |
| 2253/22<br>54 | V589I/M66<br>3F | +  | +  |    | +  | ++ | ++ |
| 2255/22<br>56 | F588V           |    |    | ++ |    |    |    |
| 2257/22<br>58 | M663F           | +  | +  | ++ |    | +  | +  |
| 2259/22<br>60 | M687L           |    |    | ++ |    | +  | ++ |
| 2261/22<br>62 | L670E           | +  |    | +  |    |    | +  |
| 2263/22<br>64 | L670S           | ++ | ++ | ++ |    |    | +  |
| 2265/22<br>66 | L628M           | +  | +  | +  | ++ | +  | +  |
| 2267/22<br>68 | V580I           | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 2269/22<br>70 | V580L           | +  |    | +  |    |    |    |
| 2271/22<br>72 | R583L           | +  |    | +  |    | +  | +  |
| 2273/22<br>74 | W3L/L569<br>F   | +  | +  |    |    | +  | +  |
| 2275/22<br>76 | L629I           | +  |    |    |    | ++ | ++ |
| 2277/22<br>78 | T692L           | +  | +  | +  |    | +  |    |
| 2279/22<br>80 | A711C           |    |    |    |    |    | +  |
| 2281/22<br>82 | R577T           | +  |    |    |    |    |    |
| 2283/22       | H499Y/A7        |    |    |    |    | +  |    |



|               |       |   |    |    |    |  |    |
|---------------|-------|---|----|----|----|--|----|
| 84            | 11F   |   |    |    |    |  |    |
| 2285/22<br>86 | P503T | + | ++ |    |    |  | +  |
| 2287/22<br>88 | A690V |   |    | +  |    |  | ++ |
| 2289/22<br>90 | L628V |   |    |    |    |  | +  |
| 2291/22<br>92 | L569I | + | +  |    |    |  | +  |
| 2293/22<br>94 | L691V |   | ++ |    |    |  |    |
| 2295/22<br>96 | T692V |   | ++ | ++ |    |  |    |
| 2297/22<br>98 | L569Y | + | ++ | ++ | +  |  | ++ |
| 2299/23<br>00 | I573Q | + | ++ |    |    |  | ++ |
| 2301/23<br>02 | A711F |   | +  | +  | +  |  | +  |
| 2303/23<br>04 | T692Y | + | +  | +  | ++ |  | ++ |
| 2305/23<br>06 | L629C |   |    |    |    |  | +  |
| 2307/23<br>08 | T692I |   |    | +  |    |  |    |
| 2309/23<br>10 | L157S |   |    | +  |    |  |    |
| 2311/23<br>12 | S671A |   | +  |    |    |  | +  |
| 2313/23<br>14 | R577M |   | +  |    |    |  | +  |
| 2315/23<br>16 | L569S |   | ++ |    |    |  | +  |
| 2317/23       | I573M | + | ++ |    |    |  | +  |

|               |       |    |    |    |   |    |    |
|---------------|-------|----|----|----|---|----|----|
| 18            |       |    |    |    |   |    |    |
| 2319/23<br>20 | R577V | +  |    |    |   |    |    |
| 2321/23<br>22 | T692C | +  | +  |    |   |    |    |
| 2323/23<br>24 | I573H | +  |    |    |   |    |    |
| 2325/23<br>26 | S671T | ++ | ++ |    |   |    | ++ |
| 2327/23<br>28 | I573D | ++ |    |    |   |    |    |
| 2329/23<br>30 | S671M | +  | ++ |    |   |    |    |
| 2331/23<br>32 | R577D | +  | +  |    |   |    | +  |
| 2333/23<br>34 | L629A |    | +  |    |   | +  | +  |
| 2335/23<br>36 | T692G | +  | +  | +  |   | ++ | ++ |
| 2337/23<br>38 | A711R | +  | ++ | ++ | + |    | ++ |
| 2339/23<br>40 | R577A | +  | +  |    |   |    |    |
| 2341/23<br>42 | L628I | +  | ++ | ++ | + | +  | ++ |
| 2343/23<br>44 | T692F | +  | +  | +  |   |    | ++ |
| 2345/23<br>46 | R583G |    |    |    |   |    | +  |
| 2347/23<br>48 | R583K | +  | +  | +  |   |    | +  |
| 2349/23<br>50 | V580Y |    |    |    |   |    | +  |
| 2351/23       | A572G |    |    |    |   |    | +  |

|               |       |    |    |    |   |   |    |
|---------------|-------|----|----|----|---|---|----|
| 52            |       |    |    |    |   |   |    |
| 2353/23<br>54 | A711W |    |    | +  |   |   |    |
| 2355/23<br>56 | L629G |    |    |    |   |   | +  |
| 2357/23<br>58 | I573C | +  |    |    |   |   | +  |
| 2359/23<br>60 | L569V |    |    |    |   |   | +  |
| 2361/23<br>62 | L669R |    |    | ++ |   |   |    |
| 2363/23<br>64 | L579V |    |    |    |   |   | +  |
| 2365/23<br>66 | A572S | ++ | ++ | +  |   |   | ++ |
| 2367/23<br>68 | T692S | +  | ++ | ++ |   |   | +  |
| 2369/23<br>70 | T692R | +  | +  | ++ |   |   | ++ |
| 2371/23<br>72 | V580E | +  | +  | +  |   |   | ++ |
| 2373/23<br>74 | A574S |    | +  |    |   |   | +  |
| 2375/23<br>76 | V631I |    | +  | +  |   |   | +  |
| 2377/23<br>78 | A711H | +  | ++ |    |   | + | ++ |
| 2379/23<br>80 | L691F | +  |    | +  | + |   | ++ |
| 2381/23<br>82 | V580G | +  |    |    |   |   | +  |
| 2383/23<br>84 | V580W | +  |    |    |   |   |    |
| 2385/23       | R577E | ++ |    |    |   |   | +  |

|               |       |    |    |    |   |   |    |
|---------------|-------|----|----|----|---|---|----|
| 86            |       |    |    |    |   |   |    |
| 2387/23<br>88 | R583C |    |    |    |   |   | +  |
| 2389/23<br>90 | A711L | +  |    | +  |   |   |    |
| 2391/23<br>92 | S671G |    |    | +  |   |   |    |
| 2393/23<br>94 | A711G |    |    |    | + |   | +  |
| 2395/23<br>96 | V631L |    |    | ++ |   |   | +  |
| 2397/23<br>98 | L569T | +  | ++ | ++ | + |   | ++ |
| 2399/24<br>00 | L569H | ++ |    |    |   | + | +  |
| 2401/24<br>02 | L569Q | +  |    |    |   |   |    |
| 2403/24<br>04 | V631M |    |    | ++ |   |   | +  |
| 2405/24<br>06 | H709S | +  |    | +  |   |   | ++ |
| 2407/24<br>08 | T227A |    |    | +  |   |   | +  |
| 2409/24<br>10 | V878R | +  | +  | ++ | + |   |    |
| 2411/24<br>12 | A578S | +  |    |    |   |   |    |
| 2413/24<br>14 | T585L | +  |    | ++ | + | + | +  |
| 2415/24<br>16 | L871E | +  | +  | +  | + |   |    |
| 2417/24<br>18 | V222C | +  |    | ++ | + |   | +  |
| 2419/24       | K581Y |    |    |    |   |   | +  |

|               |       |   |    |    |    |   |    |
|---------------|-------|---|----|----|----|---|----|
| 20            |       |   |    |    |    |   |    |
| 2421/24<br>22 | V878G |   |    |    |    |   | ++ |
| 2423/24<br>24 | T585V |   | +  |    |    |   |    |
| 2425/24<br>26 | K581H |   |    |    |    |   | ++ |
| 2427/24<br>28 | I877L |   | +  | +  |    |   | +  |
| 2429/24<br>30 | V868L |   | +  |    |    |   | +  |
| 2431/24<br>32 | V878A | + | +  |    | ++ | + | +  |
| 2433/24<br>34 | R873Y |   | +  | +  | +  |   | +  |
| 2435/24<br>36 | H706V |   |    |    |    |   | +  |
| 2437/24<br>38 | K581G |   |    |    |    |   | +  |
| 2439/24<br>40 | V222P |   | +  |    |    |   | +  |
| 2441/24<br>42 | T585M |   |    | +  | +  |   | ++ |
| 2443/24<br>44 | T585Q |   | +  |    | +  |   | +  |
| 2445/24<br>46 | L633V |   |    | +  |    |   |    |
| 2447/24<br>48 | A229C |   |    | ++ |    |   |    |
| 2449/24<br>50 | L871R |   |    |    |    |   | +  |
| 2451/24<br>52 | V878L | + | ++ | +  |    |   | +  |
| 2453/24       | V868I |   | +  | ++ |    |   | +  |

|               |       |    |    |    |    |    |    |
|---------------|-------|----|----|----|----|----|----|
| 54            |       |    |    |    |    |    |    |
| 2455/24<br>56 | K581V |    |    |    |    |    | +  |
| 2457/24<br>58 | K581F |    |    |    |    |    | +  |
| 2459/24<br>60 | T585F |    | +  |    |    |    | +  |
| 2461/24<br>62 | V878K |    |    | ++ |    |    | +  |
| 2463/24<br>64 | R873A | +  | +  | +  |    |    |    |
| 2465/24<br>66 | K581L | +  | ++ |    |    |    | +  |
| 2467/24<br>68 | K581T | +  | +  |    |    |    |    |
| 2469/24<br>70 | I869L | +  | +  | ++ | +  |    | +  |
| 2471/24<br>72 | K581S | +  | ++ |    |    |    | +  |
| 2473/24<br>74 | V878S | ++ | ++ |    | ++ | ++ | ++ |
| 2475/24<br>76 | H706M |    | ++ |    |    |    | +  |
| 2477/24<br>78 | V878Q | ++ | ++ | ++ |    |    |    |
| 2479/24<br>80 | R873F |    |    | +  |    |    |    |
| 2481/24<br>82 | I877V | +  | ++ | +  |    |    |    |
| 2483/24<br>84 | V878F | ++ | ++ | +  | +  |    | +  |
| 2485/24<br>86 | I869S | +  | ++ | +  |    |    |    |
| 2487/24       | V878W | ++ | ++ |    |    |    | +  |

|               |                     |    |    |    |   |    |   |
|---------------|---------------------|----|----|----|---|----|---|
| 88            |                     |    |    |    |   |    |   |
| 2489/24<br>90 | H706F               | +  | +  | ++ |   |    |   |
| 2491/24<br>92 | N225D               |    | +  | ++ |   |    |   |
| 2493/24<br>94 | L871K               | ++ | ++ |    | + | ++ | + |
| 2495/24<br>96 | P78E/D87<br>E/T266N | +  | +  | +  | + | +  | + |

<sup>1</sup>Всю активность определяют относительно эталонного полипептида с SEQ ID NO: 1956. Уровни повышенной активности определены следующим образом: «+»=0,9-1,1; «++» >1,1; и «+++» >2.

**Таблица 13-2. Активность вариантов GAA относительно SEQ ID NO: 1956<sup>1</sup>**

| SEQ ID NO: (нт/ак) | Аминокислотные различия (относительно SEQ ID NO: 1956) | Неспроводящая активность FIOPC | Стабильность и активность в плазме FIOPC | Активность от лизата при длительной обработке фибробластов в Помпе FIOPC | Активность от лизата при длительной обработке C2C12 GAA-/- FIOPC |
|--------------------|--|--------------------------------|--|--|--|
| 2497/2<br>498      | A142G  | +                              |  | +  | +  |
| 2499/2<br>500      | P788N  |                                | +  |  | +  |
| 2501/2<br>502      | D493L  |                                | ++                                       | ++   | ++   |
| 2503/2<br>504      | P788L  |                                | ++                                       |  |  |
| 2505/2<br>506      | S612T  | +                              | ++                                       | +  | +  |
| 2507/2<br>508      | W265H  |                                |  |  | +  |
| 2509/2             | K129E  |                                |  |  | +  |

|               |       |    |     |    |    |
|---------------|-------|----|-----|----|----|
| 510           |       |    |     |    |    |
| 2511/2<br>512 | K752N | +  | +++ |    |    |
| 2513/2<br>514 | H499E | +  |     |    | ++ |
| 2515/2<br>516 | V185L |    | ++  |    |    |
| 2517/2<br>518 | L857E | +  |     |    |    |
| 2519/2<br>520 | K752S | +  | +   |    |    |
| 2521/2<br>522 | G56S  | ++ | +   | ++ | ++ |
| 2523/2<br>524 | T145L |    | ++  |    | +  |
| 2525/2<br>526 | T44F  | +  |     |    | +  |
| 2527/2<br>528 | T543K | +  |     |    | ++ |
| 2529/2<br>530 | P788T |    | +   |    | +  |
| 2531/2<br>532 | K176R | +  | ++  |    |    |
| 2533/2<br>534 | V859A | ++ | +   |    | +  |
| 2535/2<br>536 | K129V | ++ | ++  |    | ++ |
| 2537/2<br>538 | T44A  | ++ |     | ++ |    |
| 2539/2<br>540 | P779S | +  |     | ++ |    |
| 2541/2<br>542 | L857A | +  |     |    | ++ |
| 2543/2        | S202Q | +  | +   | +  |    |



|               |       |    |    |    |   |
|---------------|-------|----|----|----|---|
| 544           |       |    |    |    |   |
| 2545/2<br>546 | F354S | ++ | ++ |    |   |
| 2547/2<br>548 | H499I |    |    |    | + |
| 2549/2<br>550 | S446K | +  |    |    |   |
| 2551/2<br>552 | K752G | +  | ++ |    |   |
| 2553/2<br>554 | G65F  |    | +  |    |   |
| 2555/2<br>556 | P503N | +  | ++ |    | + |
| 2557/2<br>558 | T44W  | +  |    | ++ | + |
| 2559/2<br>560 | A834S | +  | +  | ++ | + |
| 2561/2<br>562 | S446D | +  |    |    |   |
| 2563/2<br>564 | Q615M | +  | +  | +  |   |
| 2565/2<br>566 | L857V | ++ |    |    |   |
| 2567/2<br>568 | F152W | +  | +  | +  |   |
| 2569/2<br>570 | F152S |    |    |    | + |
| 2571/2<br>572 | S136K |    | ++ |    |   |
| 2573/2<br>574 | K129S | +  | ++ |    |   |
| 2575/2<br>576 | T373S | +  | ++ |    |   |
| 2577/2        | G822R | +  | ++ |    | + |

|               |       |    |    |    |       |
|---------------|-------|----|----|----|-------|
| 578           |       |    |    |    |       |
| 2579/2<br>580 | T826M | +  |    |    |       |
| 2581/2<br>582 | G936S | +  |    |    | +++   |
| 2583/2<br>584 | F679Y | +  | ++ |    |       |
| 2585/2<br>586 | H63N  | ++ | +  |    |       |
| 2587/2<br>588 | V931L | +  | +  |    |       |
| 2589/2<br>590 | I156C | +  | ++ |    |       |
| 2591/2<br>592 | H499V |    |    |    | ++    |
| 2593/2<br>594 | P788A | +  | +  |    |       |
| 2595/2<br>596 | K752W |    |    |    | ++    |
| 2597/2<br>598 | W730L |    |    | ++ | +++++ |
| 2599/2<br>600 | P788Q |    | +  |    |       |
| 2601/2<br>602 | H499M | +  |    | ++ |       |
| 2603/2<br>604 | S202D | +  | ++ |    |       |
| 2605/2<br>606 | T543L | ++ | ++ | ++ |       |
| 2607/2<br>608 | P199A | ++ | +  | ++ |       |
| 2609/2<br>610 | S612G |    |    |    | +++   |
| 2611/2        | S856A | ++ |    | +  |       |

|               |       |    |    |    |      |
|---------------|-------|----|----|----|------|
| 612           |       |    |    |    |      |
| 2613/2<br>614 | K129W |    |    | ++ | ++   |
| 2615/2<br>616 | I156R | +  | +  |    |      |
| 2617/2<br>618 | S136V | ++ |    | ++ |      |
| 2619/2<br>620 | F354L | ++ |    | ++ |      |
| 2621/2<br>622 | P186H | +  |    |    |      |
| 2623/2<br>624 | Y677T | +  |    |    |      |
| 2625/2<br>626 | P199W | ++ |    | +  |      |
| 2627/2<br>628 | S136R | +  | ++ | +  |      |
| 2629/2<br>630 | K129T | ++ | ++ | +  |      |
| 2631/2<br>632 | P337H |    |    |    | +++  |
| 2633/2<br>634 | I469M | ++ |    | ++ |      |
| 2635/2<br>636 | H499A | +  |    |    | +++  |
| 2637/2<br>638 | Q344C |    |    | ++ | ++++ |
| 2639/2<br>640 | D177Q |    |    | +  | ++   |
| 2641/2<br>642 | S202Y |    | ++ |    |      |
| 2643/2<br>644 | A105V | +  | ++ |    |      |
| 2645/2        | E773P | ++ | ++ | ++ | ++   |

|               |       |    |     |    |    |
|---------------|-------|----|-----|----|----|
| 646           |       |    |     |    |    |
| 2647/2<br>648 | W730K |    |     |    | +  |
| 2649/2<br>650 | L857R | +  |     |    | +  |
| 2651/2<br>652 | A834W |    | ++  |    |    |
| 2653/2<br>654 | L488C | +  | +++ | +  | +  |
| 2655/2<br>656 | L860S | +  |     | ++ | ++ |
| 2657/2<br>658 | L488E | +  | +++ |    |    |
| 2659/2<br>660 | L649M |    | +   |    |    |
| 2661/2<br>662 | K267E |    |     |    | +  |
| 2663/2<br>664 | K752L | ++ | ++  |    |    |
| 2665/2<br>666 | S678R |    | +   |    |    |
| 2667/2<br>668 | E855G | +  |     |    |    |
| 2669/2<br>670 | N484A |    | ++  |    |    |
| 2671/2<br>672 | P788I | +  | +   |    | ++ |
| 2673/2<br>674 | D348E | ++ | ++  | +  |    |
| 2675/2<br>676 | L488S | ++ | +++ |    | +  |
| 2677/2<br>678 | Q615S | +  | +   |    |    |
| 2679/2        | V859G | ++ | ++  | +  | ++ |

|               |       |    |    |    |     |
|---------------|-------|----|----|----|-----|
| 680           |       |    |    |    |     |
| 2681/2<br>682 | T141K |    |    | +  |     |
| 2683/2<br>684 | Q768I |    | ++ | ++ | +++ |
| 2685/2<br>686 | V926T | +  | +  | +  |     |
| 2687/2<br>688 | P788H | +  | ++ | +  | +   |
| 2689/2<br>690 | S446C | +  | ++ | +  |     |
| 2691/2<br>692 | P779I | +  | ++ | +  |     |
| 2693/2<br>694 | V797F | +  | ++ | ++ |     |
| 2695/2<br>696 | S372D | +  |    |    | ++  |
| 2697/2<br>698 | V350F |    |    |    | +   |
| 2699/2<br>700 | Y765W |    |    |    | ++  |
| 2701/2<br>702 | T44V  | ++ |    | ++ | ++  |
| 2703/2<br>704 | T373A | +  |    |    |     |
| 2705/2<br>706 | G936N | ++ |    |    | +   |
| 2707/2<br>708 | S446I | +  |    |    |     |
| 2709/2<br>710 | S678Q | +  |    | +  | ++  |
| 2711/2<br>712 | P526L |    |    | ++ |     |
| 2713/2        | P199G | +  | ++ | +  |     |

|               |       |    |    |    |      |
|---------------|-------|----|----|----|------|
| 714           |       |    |    |    |      |
| 2715/2<br>716 | P199R | +  |    | +  |      |
| 2717/2<br>718 | L187I | +  |    | +  |      |
| 2719/2<br>720 | K267R | +  |    | ++ | ++   |
| 2721/2<br>722 | I469T | ++ |    |    |      |
| 2723/2<br>724 | T826I | ++ | ++ | ++ | +++  |
| 2725/2<br>726 | S856G | ++ | +  | ++ | +++  |
| 2727/2<br>728 | P503C | +  | ++ | ++ |      |
| 2729/2<br>730 | V797I | +  | ++ |    |      |
| 2731/2<br>732 | G412W | +  |    | +  | ++   |
| 2733/2<br>734 | S202A | ++ | ++ | ++ | +    |
| 2735/2<br>736 | T145A | +  | +  | +  |      |
| 2737/2<br>738 | S777W | +  |    | ++ | ++   |
| 2739/2<br>740 | G412R | +  |    | +  | ++   |
| 2741/2<br>742 | D348W |    |    |    | ++   |
| 2743/2<br>744 | P199T | ++ | +  | ++ | ++   |
| 2745/2<br>746 | W265D |    |    |    | +++  |
| 2747/2        | K267G |    |    | +  | ++++ |

|               |       |    |    |    |     |
|---------------|-------|----|----|----|-----|
| 748           |       |    |    |    |     |
| 2749/2<br>750 | W265F | +  | +  |    |     |
| 2751/2<br>752 | H499Q | ++ | +  |    | +   |
| 2753/2<br>754 | E855L | +  |    |    | ++  |
| 2755/2<br>756 | A496M | +  | +  | ++ | ++  |
| 2757/2<br>758 | S202G | ++ |    | ++ | ++  |
| 2759/2<br>760 | Q768V |    |    |    | ++  |
| 2761/2<br>762 | T543H | ++ | ++ | ++ | ++  |
| 2763/2<br>764 | Y125W |    | ++ |    |     |
| 2765/2<br>766 | N484K | +  | +  |    | ++  |
| 2767/2<br>768 | N484R |    |    |    | ++  |
| 2769/2<br>770 | Q768K |    |    | +  | ++  |
| 2771/2<br>772 | S612L |    |    |    | +++ |
| 2773/2<br>774 | A834V | +  |    |    | ++  |
| 2775/2<br>776 | S678V | +  | ++ | ++ | ++  |
| 2777/2<br>778 | V926M | +  | ++ | +  | ++  |
| 2779/2<br>780 | G139E |    |    |    | ++  |
| 2781/2        | Y125H |    |    | ++ | ++  |

|               |             |    |    |    |     |
|---------------|-------------|----|----|----|-----|
| 782           |             |    |    |    |     |
| 2783/2<br>784 | P503H       | +  |    | +  | ++  |
| 2785/2<br>786 | V797R       |    |    | +  | +++ |
| 2787/2<br>788 | F152L       | ++ |    | ++ |     |
| 2789/2<br>790 | W730R       |    |    | ++ | +   |
| 2791/2<br>792 | T924A       | +  |    | ++ | +   |
| 2793/2<br>794 | V797W       |    |    |    | ++  |
| 2795/2<br>796 | V797E       |    | ++ |    | +   |
| 2797/2<br>798 | T141R       | +  | +  | +  | ++  |
| 2799/2<br>800 | S678W       | ++ |    | ++ | ++  |
| 2801/2<br>802 | G65Y        | +  |    | ++ | +   |
| 2803/2<br>804 | G936R       | ++ |    |    |     |
| 2805/2<br>806 | T44Y        | ++ | +  | ++ | ++  |
| 2807/2<br>808 | P788S       | +  |    | +  |     |
| 2809/2<br>810 | P199V/L775I | ++ | +  | ++ | ++  |
| 2811/2<br>812 | S777M       |    | +  | ++ | ++  |
| 2813/2<br>814 | I156K       |    |    |    | ++  |
| 2815/2        | P526V       | +  | +  |    |     |



|               |       |    |    |    |     |
|---------------|-------|----|----|----|-----|
| 816           |       |    |    |    |     |
| 2817/2<br>818 | G56W  | ++ | ++ | ++ |     |
| 2819/2<br>820 | P199I | +  | +  | +  |     |
| 2821/2<br>822 | D401G | +  |    |    |     |
| 2823/2<br>824 | G412S | ++ |    | ++ |     |
| 2825/2<br>826 | A834G | +  |    | ++ | ++  |
| 2827/2<br>828 | P788Y | +  | ++ | +  | +++ |
| 2829/2<br>830 | S612R | +  |    |    | ++  |
| 2831/2<br>832 | S202H | +  | +  |    | +   |
| 2833/2<br>834 | K129I | +  | ++ |    | ++  |
| 2835/2<br>836 | D401S | +  |    |    | +   |
| 2837/2<br>838 | A496W |    | ++ |    | +   |
| 2839/2<br>840 | T543R | +  |    | +  | +++ |
| 2841/2<br>842 | S446G | +  |    |    | +   |
| 2843/2<br>844 | I156S |    | +  |    | ++  |
| 2845/2<br>846 | G65R  | +  | ++ | ++ | ++  |
| 2847/2<br>848 | G65A  | +  |    | +  | ++  |
| 2849/2        | P779M | ++ | +  | ++ | ++  |

|   |       |    |    |    |    |
|---|-------|----|----|----|----|
| 850   |       |    |    |    |    |
| 2851/2<br>852   | K752F | ++ | ++ |    |    |
| 2853/2<br>854   | D162T |    | +  |    |    |
| 2855/2<br>856   | I469V | ++ |    | +  | ++ |
| 2857/2<br>858   | S53I  | +  |    | +  | ++ |
| 2859/2<br>860   | A105W | ++ | +  | ++ | ++ |
| 2861/2<br>862   | L857S | +  |    |    |    |
| 2863/2<br>864   | T543G | ++ |    |    | ++ |
| 2865/2<br>866   | V350I | ++ |    | +  | ++ |
| <p><sup>1</sup>Всю активность определяют относительно эталонного полипептида с SEQ ID NO: 1956. Уровни повышенной активности определены следующим образом: «+»=0,9-1,1; «++» &gt;1,1; «+++» &gt;2; «++++» &gt;3,5; и «+++++» &gt;5.</p> |       |    |    |    |    |

#### ПРИМЕР 14

##### Варианты GAA SEQ ID NO: 2496

В этом примере описаны эксперименты по эволюции и скринингу вариантов GAA, полученных из SEQ ID NO: 2496, на улучшенную активность GAA после ряда провокаций. Библиотеки вариантных генов GAA, кодируемых на основе SEQ ID NO: 2496, конструируют, высевают, выращивают и подвергают скринингу на активность GAA MU-Glu («Неспровоцированная активность FIOPC»), а также после провокации плазмой («Стабильность плазмы и активность FIOPC»), как описано в примере 11. Варианты также тестируют на активность 4-MUGlu после лизиса фибробластов Помпе, обработанных в течение 24 часов («Активность лизата в результате продолжительной обработки фибробластов Помпе FIOPC»), или клеток C2C12 GAA<sup>-/-</sup> («Активность лизата при длительной обработке C2C12 GAA<sup>-/-</sup> FIOPC») или 6-часовой обработки («Активность лизата при быстрой обработке фибробластов Помпе FIOPC») или («Активность лизата при быстрой обработке C2C12 GAA<sup>-/-</sup> FIOPC»), как описано в примере 11. Результаты этих анализов представлены в таблицах 14-1 и 14-2.

**Таблица 14-1. Активность вариантов GAA относительно SEQ ID NO: 2496<sup>1</sup>**

| SEQ ID<br>NO:<br>(нт/ак) | Аминокислотные различия (относительно SEQ ID NO: 2496) | Неспроцированная активность FIOPC | Стабильность и активность в плазме FIOPC | Активность от лизата при длительной обработке фибробластов Помпе FIOPC | Активность от лизата при длительной обработке C2C12 GAA-/ FIOPC | Активность от лизата при быстрой обработке фибробластов Помпе FIOPC | Активность от лизата при быстрой обработке C2C12 GAA-/ FIOPC |
|--------------------------|--|-----------------------------------|--|--|---|---|--|
| 2495/2496                |  | +                                 | +  | +  | +   | +   | +  |
| 2867/2868                | L569T/L628M/T692Y                                      | ++                                | +  |  | ++  | ++  | +  |
| 2869/2870                | L569Y/L670T/A711H                                      | ++                                |  | +  | ++  | +   | +  |
| 2871/2872                | L569Y/L628M/L670T/T692Y/A711H/L871S                    | ++                                | +  | +  | ++  | ++  | +  |
| 2873/2874                | V589I/L670T/Q795E/L871S                                |                                   |  |  | +   | +   | +  |
| 2875/2876                | L628M/L670F  | +                                 |  | ++   | ++  | ++  | ++   |
| 2877/2878                | L569H/L628M/L670T                                      | ++                                | +  | +  | ++  | +   | ++   |

|               |   |    |    |    |    |    |    |
|---------------|---|----|----|----|----|----|----|
| 2879/28<br>80 | L569T/L<br>670T/A7<br>11H/L87<br>1E                           | ++ | +  |    | ++ | ++ | ++ |
| 2881/28<br>82 | L628M/L<br>670T/T6<br>92G/A71<br>1H/Q795<br>E                 | ++ |    | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 2883/28<br>84 | L569Y/L<br>628M/L6<br>70T/A71<br>1H                           | ++ | +  | +  | ++ | ++ | ++ |
| 2885/28<br>86 | L569Y/V<br>589I/L62<br>8M/T692<br>G/A711H<br>/Q795E           | +  | +  | +  | ++ | ++ | ++ |
| 2887/28<br>88 | L569H/T<br>692G   | +  |    |    | +  | +  | +  |
| 2889/28<br>90 | L569Y/V<br>589I/L67<br>0T/S678<br>T/T692G<br>/A711H/<br>Q795E | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 2891/28<br>92 | L569T/L<br>871K   | ++ | ++ | +  | ++ | ++ | ++ |
| 2893/28<br>94 | L569Y/V<br>589I/L62<br>8M/L670<br>T/T692Y<br>/A711H           | ++ | ++ | +  | +  | ++ | +  |
| 2895/28       | V589I/L8  | +  |    |    |    | +  |    |

|           |   |    |    |    |    |    |    |
|-----------|---|----|----|----|----|----|----|
| 96        | 71E   |    |    |    |    |    |    |
| 2897/2898 | L670T/S<br>678T/T6<br>92Y/L871S                     |    | +  | +  | +  | +  | ++ |
| 2899/2900 | L628M/<br>A711H/Q<br>795E                           | ++ |    | +  | ++ | ++ | ++ |
| 2901/2902 | T692G/A<br>711H                                     | +  |    | ++ | +  | ++ | ++ |
| 2903/2904 | V589I/L6<br>70T/T69<br>2G/Q795<br>E/L871K           |    |    | +  | +  | +  | ++ |
| 2905/2906 | L569Y/V<br>589I/A71<br>1H/L871<br>K                 | +  | +  |    | ++ | +  | ++ |
| 2907/2908 | L670T/T<br>692G/L8<br>71K                           | ++ |    | +  | ++ | ++ | +  |
| 2909/2910 | L569H/T<br>692Y                                     | +  |    |    | +  | +  | +  |
| 2911/2912 | L569H/L<br>628M/L6<br>70T/T69<br>2Y/A711<br>H/L871K | ++ | +  | ++ | ++ | ++ | +  |
| 2913/2914 | L670T/S<br>678T                                     | ++ |    | +  | ++ | ++ | ++ |
| 2915/2916 | L569T/L<br>670T/S67<br>8T/T692<br>G/L871K           | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |

|               |   |    |    |    |    |    |    |
|---------------|---|----|----|----|----|----|----|
| 2917/29<br>18 | V589I   |    |    |    |    |    | ++ |
| 2919/29<br>20 | L569H/V<br>589I/L62<br>8M/L670<br>T/S678T/<br>T692G/A<br>711H/Q7<br>95E/L87<br>1S | ++ | ++ | ++ | +  | ++ | ++ |
| 2921/29<br>22 | L569H/L<br>670F/S67<br>8T/T692<br>G/L871S   | +  | ++ | +  | +  | +  | ++ |
| 2923/29<br>24 | L569T/V<br>589I/L62<br>8M/L670<br>F/T692G/<br>A711H                               | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 2925/29<br>26 | L569H/L<br>670T/T6<br>92G   | ++ | +  |    |    |    | +  |
| 2927/29<br>28 | L569Y/L<br>871E   | ++ | +  |    |    |    | +  |
| 2929/29<br>30 | L569H/L<br>628M/L6<br>70F/S678<br>T   | ++ | +  | +  |    | +  | ++ |
| 2931/29<br>32 | L569Y/L<br>670F/S67<br>8T   | +  | ++ |    |    |    | ++ |
| 2933/29<br>34 | L569Y/V<br>589I/L67<br>0F   | ++ | ++ |    | +  | +  | ++ |

|               |   |    |    |    |    |    |    |
|---------------|---|----|----|----|----|----|----|
| 2935/29<br>36 | L569Y/V<br>589I/L67<br>0T/L871<br>K                 | ++ | ++ | +  | +  | +  | ++ |
| 2937/29<br>38 | L569T/L<br>871S                                     | +  | ++ |    |    | +  | +  |
| 2939/29<br>40 | L871K   | +  |    | +  |    | ++ | ++ |
| 2941/29<br>42 | L569Y/L<br>670T                                     |    |    |    | ++ | +  | ++ |
| 2943/29<br>44 | L569Y/T<br>692Y/A7<br>11H                           | ++ | ++ |    | +  |    | +  |
| 2945/29<br>46 | L871S   | +  |    |    |    | +  | ++ |
| 2947/29<br>48 | L569Y/A<br>711H                                     | ++ | ++ |    |    |    | ++ |
| 2949/29<br>50 | L628M/L<br>871S                                     | +  |    |    | +  | ++ | ++ |
| 2951/29<br>52 | L569T/V<br>589I/L87<br>1S                           | ++ | +  |    | +  | +  | ++ |
| 2953/29<br>54 | T692G/A<br>711H/I86<br>9L/V878<br>S                 | ++ |    | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 2955/29<br>56 | A572S/F<br>588L/S67<br>8T/T692<br>G/I869L/<br>V878A | +  |    |    | +  | +  | +  |
| 2957/29<br>58 | A711H   | ++ |    | +  | ++ | ++ | ++ |
| 2959/29       | T692G/I8  |    |    |    | +  | ++ | +  |

|               |                                     |    |   |   |    |    |    |
|---------------|-------------------------------------|----|---|---|----|----|----|
| 60            | 69S                                 |    |   |   |    |    |    |
| 2961/29<br>62 | A572S/T<br>692L/I86<br>9S/V878<br>S | +  | + | + | ++ | ++ | ++ |
| 2963/29<br>64 | L629I/I8<br>69L/V87<br>8S           |    |   | + |    | ++ | +  |
| 2965/29<br>66 | A572S/F<br>588L/Q7<br>95E           |    |   |   |    |    | +  |
| 2967/29<br>68 | A711H/I<br>869S/V8<br>78S           | +  |   |   |    | +  | +  |
| 2969/29<br>70 | V878S                               | ++ | + |   | ++ | +  | +  |
| 2971/29<br>72 | S678T/T<br>692G/A7<br>11H/I869<br>S | ++ | + | + | ++ | ++ | ++ |
| 2973/29<br>74 | A572S/T<br>692G/I86<br>9S/V878<br>S | +  |   |   |    | +  |    |
| 2975/29<br>76 | A572S/T<br>692G/V8<br>78S           | +  |   |   | +  | ++ | ++ |
| 2977/29<br>78 | A711H/Q<br>795E/I86<br>9S/V878<br>S | +  |   |   |    | +  | ++ |
| 2979/29<br>80 | Q795E/V<br>878S                     | +  | + |   |    | +  |    |
| 2981/29       | T692G/A                             | +  |   | + |    | +  | +  |



|               |   |    |    |  |    |    |    |
|---------------|---|----|----|--|----|----|----|
| 82            | 711H/Q7<br>95E/I869<br>S                            |    |    |  |    |    |    |
| 2983/29<br>84 | S678T/T<br>692G/Q7<br>95E/I869<br>S                 |    |    |  | +  | ++ | ++ |
| 2985/29<br>86 | T692G/A<br>711H/I86<br>9S/V878<br>A                 |    |    |  | +  | ++ |    |
| 2987/29<br>88 | L569T/A<br>711H                                     | ++ |    |  | +  | +  |    |
| 2989/29<br>90 | L569T/L<br>628M/S6<br>78T/A71<br>1H                 | +  | +  |  |    | +  | +  |
| 2991/29<br>92 | L569T/V<br>589I/T69<br>2G/Q795<br>E/L871K<br>/V878S | ++ | ++ |  | ++ | ++ |    |
| 2993/29<br>94 | L569T/V<br>589I/S67<br>8T/L871<br>K/V878S           | ++ | ++ |  | ++ | ++ | +  |
| 2995/29<br>96 | L569H/A<br>711H/I86<br>9S/V878<br>S                 | +  |    |  |    | ++ |    |
| 2997/29<br>98 | S678T/Q<br>795E/L8<br>71K/V87<br>8A                 | +  |    |  |    | +  | ++ |

|               |   |    |    |   |    |    |    |
|---------------|---|----|----|---|----|----|----|
| 2999/30<br>00 | L569H/S<br>678T/T6<br>92G/Q79<br>5E                 | +  |    |   | +  | +  |    |
| 3001/30<br>02 | F588L/V<br>589I/L62<br>8M/S678<br>T                 | ++ |    |   | +  | +  | +  |
| 3003/30<br>04 | T692Y   | ++ | +  | + | +  | ++ | +  |
| 3005/30<br>06 | L569T   | ++ | +  |   | +  | ++ | +  |
| 3007/30<br>08 | T692G/L<br>871K                                     | +  |    | + | +  | ++ |    |
| 3009/30<br>10 | L569T/F<br>588L/V8<br>78S                           | ++ | ++ | + | ++ | ++ | +  |
| 3011/30<br>12 | L569H/A<br>711H/L8<br>71K                           | ++ |    |   | ++ | +  |    |
| 3013/30<br>14 | L569T/F<br>588L/S67<br>8T/T692<br>Y                 | ++ | ++ |   | +  | +  | +  |
| 3015/30<br>16 | L569T/F<br>588L/A7<br>11H/I869<br>L/L871K<br>/V878S | +  |    |   | +  | ++ |    |
| 3017/30<br>18 | L569T/F<br>588L                                     | ++ | ++ |   |    | +  | ++ |
| 3019/30<br>20 | L569T/T<br>692Y                                     | +  | ++ | + | ++ | ++ | +  |
| 3021/30       | L569T/S   | ++ | +  |   | ++ | +  | ++ |

|               |   |    |    |   |    |    |    |
|---------------|---|----|----|---|----|----|----|
| 22            | 678T/I86<br>9S/V878<br>S                                      |    |    |   |    |    |    |
| 3023/30<br>24 | L628M/L<br>629I/T69<br>2Y/L871<br>S/V878S                     | +  |    |   | +  | ++ | +  |
| 3025/30<br>26 | L569T/S<br>678T/V8<br>78S                                     | ++ | ++ | + | ++ | ++ | ++ |
| 3027/30<br>28 | L569H/A<br>711H/Q7<br>95E/L87<br>1S/V878<br>S                 | ++ | ++ |   | +  | ++ | ++ |
| 3029/30<br>30 | A711H/L<br>871K   | ++ |    |   |    | +  | +  |
| 3031/30<br>32 | T692G/A<br>711H/Q7<br>95E/I869<br>L/L871K<br>/V878A           | +  |    |   | +  | ++ | +  |
| 3033/30<br>34 | L569T/F<br>588L/V5<br>89I/L628<br>M/L629I/<br>T692Y/A<br>711H |    | +  | + | +  |    | ++ |
| 3035/30<br>36 | S678T/T<br>692G/I86<br>9S                                     | ++ |    |   | +  | ++ | +  |
| 3037/30<br>38 | T692G/I8<br>69L/L87<br>1K/V878                                | +  |    |   | +  | ++ | +  |

|               |   |    |    |   |    |    |    |
|---------------|---|----|----|---|----|----|----|
|               | S/S916R   |    |    |   |    |    |    |
| 3039/30<br>40 | L569H/L<br>628M                                     | ++ | +  |   |    | +  | +  |
| 3041/30<br>42 | L628M/<br>V878S                                     | ++ |    |   | +  | +  | +  |
| 3043/30<br>44 | T692G/A<br>711H/L8<br>71S/V87<br>8A                 | ++ |    | + | ++ | ++ | ++ |
| 3045/30<br>46 | L569T/Q<br>795E                                     | ++ | ++ |   | +  | +  | ++ |
| 3047/30<br>48 | L569T/T<br>692Y/A7<br>11H/I869<br>L/L871K<br>/V878A | ++ | ++ | + | ++ | ++ | ++ |
| 3049/30<br>50 | S246T   | ++ |    |   | +  | +  | +  |
| 3051/30<br>52 | T585K   | ++ |    |   |    | +  | ++ |
| 3053/30<br>54 | G584E   | +  |    |   |    | +  |    |
| 3055/30<br>56 | A812E   | ++ | +  |   | +  | +  | +  |
| 3057/30<br>58 | V313L   | +  |    |   |    | +  |    |
| 3059/30<br>60 | L304M   | ++ |    |   | +  | ++ | ++ |
| 3061/30<br>62 | V313I   | ++ |    |   | +  | ++ | ++ |
| 3063/30<br>64 | A582T   | ++ |    |   | ++ | ++ | ++ |

<sup>1</sup>Всю активность определяют относительно эталонного полипептида с SEQ ID NO:

2496. Уровни повышенной активности определены следующим образом: «+»=0,9-1,1; и

| «++» >1,1.   |   |                                     |  |  |  |
|--|---|-------------------------------------|--|--|--|
| Таблица 14-2. Активность вариантов GAA относительно SEQ ID NO: 2496 <sup>1</sup> |   |                                     |  |  |  |
| SEQ ID NO:<br>(нт/ак)  | Аминокислотные различия<br>(относительно SEQ ID NO: 2496) | Неспровоцированная активность FIOPC | Стабильность и активность в плазме FIOPC | Активность от лизата при длительной обработке фибробластов Помпе FIOPC | Активность от лизата при длительной обработке C2C12 GAA-/- FIOPC |
| 2495/2496  |   | +                                   | +  | +  | +  |
| 3065/3066  | L810V   |                                     | ++                                       |  |  |
| 3067/3068  | A60V/V589A  |                                     |  |  | +  |
| 3069/3070  | S307T   |                                     |  |  | +  |
| 3071/3072  | V313T   |                                     |  | +  |  |
| 3073/3074  | G584C   |                                     |  |  | +  |

<sup>1</sup>Всю активность определяют относительно эталонного полипептида с SEQ ID NO: 2496. Уровни повышенной активности определены следующим образом: «+»=0,9-1,1; и «++» >1,1.

### ПРИМЕР 15

#### Варианты GAA SEQ ID NO: 2880

В этом примере описаны эксперименты по эволюции и скринингу вариантов GAA, полученных из SEQ ID NO: 2880, на улучшенную активность GAA после ряда провокаций. Библиотеки вариантных генов GAA, кодируемых на основе SEQ ID NO: 2880, конструируют, высевают, выращивают и подвергают скринингу на активность GAA MU-Glu («Неспровоцированная активность FIOPC»), а также после провокации плазмой («Стабильность плазмы и активность FIOPC»), как описано в примере 11. Варианты также тестируют на активность 4-MUGlu после лизиса клеток C2C12 GAA<sup>-/-</sup> («Активность лизата при длительной обработке C2C12 GAA-/- FIOPC») или 6-часовой обработки фибробластов Помпе («Активность лизата при быстрой обработке фибробластов Помпе FIOPC») или («Активность лизата при быстрой обработке C2C12 GAA-/- FIOPC»), как

описано в примере 11. Результаты этих анализов представлены в таблице 15-1.

| <b>Таблица 15-1. Активность вариантов GAA относительно SEQ ID NO: 2880<sup>1</sup></b> |   |   |   |   |  |  |
|--|---|---|---|---|--|--|
| <b>SEQ ID NO:<br/>(нт/ак)</b>  | <b>Аминокислотные различия (относительно SEQ ID NO: 2880)</b> | <b>Неспроводимая активность в FIOPC</b> | <b>Стабильность и активность в плазме FIOPC</b> | <b>Активность от лизата при длительной обработке C2C12 GAA-/- FIOPC</b> | <b>Активность от лизата при быстрой обработке фибробластов Помпе FIOPC</b> | <b>Активность от лизата при быстрой обработке C2C12 GAA-/- FIOPC</b> |
| 2879/2880  |   | +                                       | +   | +   | +  | +  |
| 3075/3076  | R527N/L736M/A932S   | ++                                      | ++  | +   | ++   | ++   |
| 3077/3078  | L109D/S678T/A812E   | ++                                      | ++  | ++  | +  | ++   |
| 3079/3080  | A89R/S842G/V878S  | ++                                      | +   | +   | +  | +  |
| 3081/3082  | R403H/R527N/S678T/T692G/L736M/A812E/S842G/L860F               | ++                                      | ++  | ++  | ++   | ++   |
| 3083/3084  | S678T/T692G/A812E   | ++                                      | ++  | +   | +  | ++   |
| 3085/3086  | L109D/W727S/L860F/V878S                                       | ++                                      | ++  | ++  | +  | ++   |
| 3087/3088  | A89R/R527N/W727S/A812E/L860F                                  | ++                                      | ++  | ++  | +  | ++   |

|               |  |    |    |    |    |    |
|---------------|--|----|----|----|----|----|
| 3089/30<br>90 | A89R/S678T/T<br>692G/L736M/<br>A932S                 | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 3091/30<br>92 | L109D/R527N/<br>S678T/A812E                          | ++ | ++ | +  | +  | ++ |
| 3093/30<br>94 | S678T/L860F/<br>V878S                                | ++ | ++ | ++ | +  | ++ |
| 3095/30<br>96 | L109D/A812E  | ++ | ++ | +  |    | ++ |
| 3097/30<br>98 | T692G/W727S<br>/L736M/S842<br>G/R913V                | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 3099/31<br>00 | A89R/L109D/<br>W727S/A932S                           | ++ | ++ | ++ | +  | ++ |
| 3101/31<br>02 | R527N/S678T/<br>T692G/W727S<br>/L736M/V878<br>S      | ++ | ++ | ++ | +  | ++ |
| 3103/31<br>04 | R527N/T692G/<br>W727S/L736M<br>/A812E                | ++ | ++ | ++ | +  | ++ |
| 3105/31<br>06 | A89R/R527N   | ++ | ++ | +  |    | +  |
| 3107/31<br>08 | A89R/L109D/<br>A932S                                 | ++ | ++ | +  |    | +  |
| 3109/31<br>10 | L109D/S842G  | +  |    | +  | +  | ++ |
| 3111/31<br>12 | S678T/R913V  | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 3113/31<br>14 | A89R/L109D/<br>S678T/W727S/<br>L736M/A812E<br>/V878S | ++ | ++ | ++ | +  | ++ |

|               |   |    |    |    |    |     |
|---------------|---|----|----|----|----|-----|
| 3115/31<br>16 | L109D/T692G/<br>W727S/A812E<br>/S842G/L860F           | ++ | ++ | ++ | ++ | ++  |
| 3117/31<br>18 | T692G/A812E   | ++ | +  | ++ | +  | +   |
| 3119/31<br>20 | S678T/A932S   | ++ | +  | ++ | +  | ++  |
| 3121/31<br>22 | L109D/S678T/<br>L736M/A812E<br>/V878S                 | ++ | ++ | ++ | ++ | ++  |
| 3123/31<br>24 | L109D/A932S   | ++ | ++ | ++ | +  | ++  |
| 3125/31<br>26 | R527N/T692G/<br>W727S/L736M<br>/S842G/L860F/<br>V878S | ++ | ++ | +  | +  | ++  |
| 3127/31<br>28 | R527N/W727S<br>/L736M                                 | ++ | ++ | +  |    | ++  |
| 3129/31<br>30 | L109D/S678T/<br>S842G/V878S                           | ++ | +  | +  | ++ | ++  |
| 3131/31<br>32 | L109D/S678T/<br>W727S/L860F                           | ++ | ++ | ++ | +  | ++  |
| 3133/31<br>34 | R527N/S678T/<br>T692G/A812E/<br>A932S                 | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ |
| 3135/31<br>36 | A89R/S678T/<br>A812E/V878S                            | ++ | +  | ++ | ++ | ++  |
| 3137/31<br>38 | R527N/A812E   | ++ | ++ | +  |    | ++  |
| 3139/31<br>40 | S678T/T692G/<br>W727S/A812E<br>/S842G                 | ++ | +  | +  |    | ++  |
| 3141/31<br>42 | L109D/L736M<br>/A932S                                 | ++ | ++ | ++ | ++ | ++  |



|               |  |    |    |    |    |     |
|---------------|--|----|----|----|----|-----|
| 3143/31<br>44 | A89R/L109D/<br>R527N/S678T/<br>W727S/S842G                 | ++ | ++ | ++ |    | ++  |
| 3145/31<br>46 | W727S  | ++ | +  | ++ | +  | ++  |
| 3147/31<br>48 | A89R/R527N/<br>S678T/A932S                                 | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ |
| 3149/31<br>50 | L109D/S678T/<br>T692G/S842G/<br>L860F/V878S/<br>A932S      | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ |
| 3151/31<br>52 | A89R/R527N/<br>S678T/T692G/<br>L736M/S842G<br>/V878S/A932S | ++ | +  | ++ | +  | ++  |
| 3153/31<br>54 | R527N  | ++ |    | +  |    | +   |
| 3155/31<br>56 | L109D/T692G/<br>W727S/L736M<br>/A812E                      | ++ | ++ | +  | +  | ++  |
| 3157/31<br>58 | W727S/A932S  | ++ | ++ | ++ | +  | ++  |
| 3159/31<br>60 | V878S/A932S  | ++ | ++ | ++ | +  | ++  |
| 3161/31<br>62 | S678T/A812E  | ++ | +  | ++ | ++ | +++ |

|               |   |    |    |   |  |    |
|---------------|---|----|----|---|--|----|
| 3163/31<br>64 | W24L/S28L/T<br>29L/Q39P/V50<br>Q/L62A/E78P/<br>E87D/Q135S/S<br>150T/N266T/K<br>267R/V522E/R<br>527N/A551V/<br>T670L/W727S/<br>P750A/K830Q/<br>S842G/E871L/<br>H883R/G894Q<br>/A932S | ++ | ++ | + |  | ++ |
| 3165/31<br>66 | S28L/V50Q/E7<br>8P/E87D/Q135<br>S/N266T/K267<br>R/G437A/E486<br>T/R527N/A551<br>V/T670L/W72<br>7S/P750A/K83<br>0Q/S842G/E87<br>1L/H883R/G89<br>4Q/R913V/A9<br>32S                   | ++ | ++ | + |  | +  |
| 3167/31<br>68 | W24L/S28L/Q<br>39P/V50Q/L62<br>A/E78P/E87D/<br>Q135S/S150T/<br>N266T/K267R/<br>V522E/R527N/<br>A551V/T569L/<br>W727S/K830Q<br>/S842G/E871L<br>/H883R/G894<br>Q/R913V                | ++ | +  |   |  | +  |

|           |  |    |    |    |  |    |
|-----------|--|----|----|----|--|----|
| 3169/3170 | T29L/Q39P/V50Q/L62A/G65R/E78P/E87D/Q135S/S150T/G437A/A551V/T569L/T670L/W727S/P750A/K830Q/S842G/H883R/G894Q/A932S                               | ++ | +  | ++ |  |    |
| 3171/3172 | W24L/V50Q/E78P/E87D/Q135S/S150T/K267R/E486T/V522E/R527N/A551V/T670L/W727S/P750A/K830Q/S842G/E871L/H883R/G894Q/R913V/A932S                      | ++ | ++ | ++ |  | ++ |
| 3173/3174 | W24L/T29L/Q39P/V50Q/L62A/E78P/E87D/Q135S/S150T/K267R/G437A/E486T/V522E/R527N/A551V/H711A/W727S/P750A/K830Q/S842G/E871L/H883R/G894Q/R913V/A932S | ++ | ++ | +  |  | ++ |

|               |   |    |    |    |    |    |
|---------------|---|----|----|----|----|----|
| 3175/31<br>76 | L62A/Q135S/<br>V522E/H711A<br>/W727S/P750<br>A/S842G/E871<br>L/G894Q                      | ++ | ++ | ++ | +  | ++ |
| 3177/31<br>78 | E87D/P750A  | +  | ++ | ++ |    | ++ |
| 3179/31<br>80 | Q135S/H711A/<br>P750A/A932S   | +  | +  | ++ | +  | ++ |
| 3181/31<br>82 | V522E/K830Q   | ++ | ++ | ++ |    | ++ |
| 3183/31<br>84 | S28L/G437A/<br>R527N/E871L  | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 3185/31<br>86 | L62A/G437A  | ++ | ++ | +  |    | ++ |
| 3187/31<br>88 | G437A/P750A/<br>K830Q/A932S   | ++ | ++ | +  | ++ | ++ |
| 3189/31<br>90 | T29L/E78P/Q1<br>35S/W727S/K<br>830Q   | ++ | ++ | ++ | +  | ++ |
| 3191/31<br>92 | L62A  | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 3193/31<br>94 | V50Q/H711A  | +  | +  | ++ | +  | ++ |
| 3195/31<br>96 | S150T/E871L/<br>A932S   | +  | ++ | +  | ++ | +  |
| 3197/31<br>98 | Q39P/V50Q   | +  | +  | ++ | +  | ++ |
| 3199/32<br>00 | E78P/E87D/E4<br>86T/R527N/T6<br>70L/W727S/P7<br>50A/K830Q/S8<br>42G/E871L/R9<br>13V/A932S | +  | +  | ++ |    | ++ |

|               |  |    |    |     |    |     |
|---------------|--|----|----|-----|----|-----|
| 3201/32<br>02 | W24L/R527N/<br>W727S/S842G<br>/E871L/H883R<br>/R913V/A932S                               | ++ | ++ | ++  |    | +++ |
| 3203/32<br>04 | W24L/T670L/<br>W727S/P750A<br>/S842G/E871L   | ++ | ++ | ++  | ++ | ++  |
| 3205/32<br>06 | V50Q/W727S/<br>P750A/H883R/<br>G894Q   | ++ | ++ | ++  | ++ | ++  |
| 3207/32<br>08 | T29L/Q135S/S<br>150T/R527N/T<br>670L/W727S/<br>H883R                                     | +  | +  | ++  | +  | ++  |
| 3209/32<br>10 | Q39P/W727S/<br>P750A/A932S   | ++ | ++ | ++  | +  | ++  |
| 3211/32<br>12 | S150T/H883R/<br>A932S  | +  | +  | +   | +  |     |
| 3213/32<br>14 | Q135S/T670L/<br>W727S  | +  | +  | +++ | ++ | ++  |
| 3215/32<br>16 | T29L/E78P/E8<br>7D/S150T/R52<br>7N/W727S   | +  | +  | +++ | ++ | ++  |
| 3217/32<br>18 | W24L/S28L/V<br>50Q/Q135S/S1<br>50T/G437A/V<br>522E/R527N/E<br>871L/H883R/G<br>894Q/A932S | ++ | ++ | +++ |    | ++  |
| 3219/32<br>20 | W24L/L62A/E<br>87D/E486T/W<br>727S   | +  | +  | +++ | +  | +   |

|               |  |    |    |     |    |     |
|---------------|--|----|----|-----|----|-----|
| 3221/32<br>22 | T29L/V522E/T<br>670L/H711A/E<br>871L                       | +  | +  | +++ |    | +   |
| 3223/32<br>24 | S28L/V522E/R<br>527N/T569L/H<br>711A/K830Q/<br>G894Q       | +  | +  | ++  |    |     |
| 3225/32<br>26 | S28L/W727S/<br>E871L                                       | +  | +  | +++ | ++ | +++ |
| 3227/32<br>28 | T670L/H711A/<br>E871L                                      |    |    | +++ | +  | ++  |
| 3229/32<br>30 | T29L/S150T/G<br>437A/W727S                                 | +  |    | ++  |    | +   |
| 3231/32<br>32 | K267R/R527N<br>/W727S                                      | ++ | +  | +++ | ++ | ++  |
| 3233/32<br>34 | S150T/R527N/<br>S842G/E871L/<br>R913V                      | +  | +  | +++ | ++ | ++  |
| 3235/32<br>36 | T29L/S150T/K<br>267R/W727S/P<br>750A/E871L/H<br>883R/A932S | +  | +  | ++  | ++ | ++  |
| 3237/32<br>38 | S28L/W727S   | +  |    | +++ | ++ | ++  |
| 3239/32<br>40 | T29L/E87D  | +  |    | +++ | ++ | ++  |
| 3241/32<br>42 | T29L/L62A/G<br>437A/R527N                                  | +  |    | ++  | +  | +   |
| 3243/32<br>44 | V50Q/Q135S/<br>S150T/A932S                                 | +  | +  | +++ | ++ | ++  |
| 3245/32<br>46 | V50Q/G437A/<br>V522E/R527N                                 | +  | +  | ++  |    | +   |
| 3247/32<br>48 | S28L/L62A  | ++ | ++ | ++  | ++ | ++  |

|               |   |     |     |    |     |    |
|---------------|---|-----|-----|----|-----|----|
| 3249/32<br>50 | S28L/L62A/K2<br>67R/A932S   | ++  | ++  | ++ | ++  | ++ |
| 3251/32<br>52 | W24L/V50Q/E<br>486T/R527N/H<br>711A/W727S                           | ++  | ++  | +  | +   | ++ |
| 3253/32<br>54 | L62A/E87D/S1<br>50T/W727S   | ++  | +++ | ++ | ++  | ++ |
| 3255/32<br>56 | S28L  | ++  | ++  | ++ | +++ | ++ |
| 3257/32<br>58 | W24L/L62A/<br>W727S/K830Q<br>/A932S                                 | +++ | +++ | ++ | ++  | ++ |
| 3259/32<br>60 | V522E/R527N/<br>T569L/W727S   | ++  | ++  | +  | +   | ++ |
| 3261/32<br>62 | T29L/T670L/A<br>932S  | ++  | ++  | ++ | ++  | ++ |
| 3263/32<br>64 | E871L   | ++  | +++ | ++ | +++ | ++ |
| 3265/32<br>66 | G437A/V522E<br>/R527N/T670L<br>/E871L                               | ++  | ++  | +  |     | +  |
| 3267/32<br>68 | V522E   | ++  | ++  | ++ | +   | ++ |
| 3269/32<br>70 | L62A/E87D/S1<br>50T   | ++  | ++  | ++ | ++  | ++ |
| 3271/32<br>72 | W24L/S28L/L<br>62A/V522E/T5<br>69L/A932S                            | ++  | ++  | ++ | ++  | +  |
| 3273/32<br>74 | W24L/E87D/Q<br>135S/V522E/T<br>670L/H711A/<br>K830Q/S842G/<br>R913V | ++  | +++ | ++ | ++  | ++ |

|  |  |     |     |    |    |    |
|--|--|-----|-----|----|----|----|
| 3275/32<br>76  | W24L/S150T/<br>V522E/R527N/<br>W727S/H883R<br>/G894Q | ++  | +++ | ++ | ++ | ++ |
| 3277/32<br>78  | T670L/K830Q/<br>E871L                                | ++  | +++ | ++ | +  | ++ |
| 3279/32<br>80  | L62A/G437A/<br>W727S                                 | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ |
| 3281/32<br>82  | S28L/V50Q/V<br>522E/R527N/H<br>711A/W727S/<br>E871L  | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ |
| 3283/32<br>84  | W24L/S28L/G<br>437A/E486T/R<br>527N                  | ++  | ++  | ++ | ++ | ++ |
| <sup>1</sup> Всю активность определяют относительно эталонного полипептида с SEQ ID NO: 2880.<br>Уровни повышенной активности определены следующим образом: «+»= 0,9-1,1; «++»<br>>1,1; «+++» >2; и «++++» >3,5. |  |     |     |    |    |    |

### ПРИМЕР 16

#### Варианты GAA SEQ ID NO: 3104

В этом примере описаны эксперименты по эволюции и скринингу вариантов GAA, полученных из SEQ ID NO: 3104, на улучшенную активность GAA после ряда провокаций. Библиотеки вариантных генов GAA, кодируемых на основе SEQ ID NO: 3104, конструируют, высевают, выращивают и подвергают скринингу на активность GAA MU-Glu («Неспровоцированная активность FIOPC»), а также после провокации плазмой («Стабильность плазмы и активность FIOPC»), как описано в примере 11. Варианты также тестируют на активность 4-MUGlu после лизиса фибробластов Помпе, обработанных в течение 20 часов («Активность лизата в результате продолжительной обработки фибробластов Помпе FIOPC»), или клеток C2C12 GAA<sup>-/-</sup> («Активность лизата при длительной обработке C2C12 GAA<sup>-/-</sup> FIOPC») или 4-часовой обработки («Активность лизата при быстрой обработке фибробластов Помпе FIOPC») или («Активность лизата при быстрой обработке C2C12 GAA<sup>-/-</sup> FIOPC»), как описано в примере 11. Результаты этих анализов представлены в таблице 16-1.

**Таблица 16-1. Активность вариантов GAA относительно SEQ ID NO: 3104<sup>1</sup>**



| <b>SEQ ID NO:<br/>(нт/ак)</b> | <b>Аминокислотные различия (относительно SEQ ID NO: 3104)</b> | <b>Неспровоцированная активность FIOPC</b> | <b>Стабильность и активность в плазме FIOPC</b> | <b>Активность от лизата при длительной обработке фибробластов Помпе FIOPC</b> | <b>Активность от лизата при быстрой обработке фибробластов Помпе FIOPC</b> | <b>Активность от лизата при длительной обработке C2C12 GAA-/ FIOPC</b> | <b>Активность от лизата при быстрой обработке C2C12 GAA-/ FIOPC</b> |
|-------------------------------|---|--|---|---|--|--|---|
| 3285/3286                     | L62A/L860F/A932S  | +  | +   | +   | +  | +  | ++  |
| 3287/3288                     | L62A/S678T/K830Q/L860F/V878S/A932S                            | +  | +   | +   | +  | +  | +++   |
| 3289/3290                     | L62A/K830Q/L860F/V878S/A932S                                  | +  | +   | +   | +  | +  | +   |
| 3291/3292                     | S678T/A932S   | +  | +   | +   | +  | +  | +   |
| 3293/3294                     | L62A/M833I/L860F/A932S  | +  | +   | +   | +  | +  | +   |
| 3295/3296                     | L62A/L860F/E871L/V878S  | +  | +   | +   | +  | +  | +   |

|               |  |   |   |   |   |   |    |
|---------------|--|---|---|---|---|---|----|
| 3297/32<br>98 | L62A/S6<br>78T/P785<br>Q                           | + | + | + | + | + | +  |
| 3299/33<br>00 | L62A/V8<br>78S/A93<br>2S                           | + | + | + | + | + | ++ |
| 3301/33<br>02 | L62A/K8<br>30Q/L86<br>0F/E871<br>L/R873H           | + | + | + | + | + | +  |
| 3303/33<br>04 | L62A/Y2<br>48H/S67<br>8T/K830<br>Q/V878S<br>/A932S | + | + | + | + | + | +  |
| 3305/33<br>06 | L62A/L8<br>60F/E871<br>L                           | + | + | + | + | + | +  |
| 3307/33<br>08 | S678T  | + | + | + | + | + | +  |
| 3309/33<br>10 | L62A/S6<br>78T/K83<br>0Q/E871<br>L/A932S           | + | + | + | + | + | +  |
| 3311/33<br>12 | L62A/S6<br>78T/L86<br>0F                           | + | + | + | + | + | ++ |
| 3313/33<br>14 | L62A/A8<br>9D/K830<br>Q                            | + | + | + | + | + | +  |
| 3315/33<br>16 | L62A/V8<br>78S                                     | + | + | + | + | + | +  |

|               |  |   |   |   |   |   |     |
|---------------|--|---|---|---|---|---|-----|
| 3317/33<br>18 | L62A/K8<br>30Q/A93<br>2S                 | + | + | + | + | + | +++ |
| 3319/33<br>20 | L62A/S6<br>78T/K83<br>0Q/L860<br>F/A932S | + | + | + | + | + | ++  |
| 3321/33<br>22 | L62A/A9<br>32S                           | + | + | + | + | + | ++  |
| 3323/33<br>24 | L62A/S6<br>78T/L86<br>0F/V878<br>S       | + | + | + | + | + | +   |
| 3325/33<br>26 | L62A/S6<br>78T/E87<br>1L                 | + | + | + | + | + | +++ |
| 3327/33<br>28 | L62A                                     | + | + | + | + | + | ++  |
| 3329/33<br>30 | L62A/S6<br>78T/K83<br>0Q/L860<br>F       | + | + | + | + | + | +++ |
| 3331/33<br>32 | L62A/K8<br>30Q/V87<br>8S                 | + | + | + | + | + | +   |
| 3333/33<br>34 | L62A/E8<br>71L/A93<br>2S                 | + | + | + | + | + | +++ |
| 3335/33<br>36 | L62A/K8<br>30Q/E87<br>1L/A932<br>S       | + | + | + | + | + | +   |

|               |  |   |   |   |   |   |     |
|---------------|--|---|---|---|---|---|-----|
| 3337/33<br>38 | L62A/S6<br>78T/K83<br>0Q/E871<br>L       | + | + | + | + | + | ++  |
| 3339/33<br>40 | L860F/A<br>932S                          | + | + | + | + | + | ++  |
| 3341/33<br>42 | L62A/S6<br>78T/V87<br>8S/A932<br>S       | + | + | + | + | + | +   |
| 3343/33<br>44 | L62A/S6<br>78T/K83<br>0Q                 | + | + | + | + | + | +   |
| 3345/33<br>46 | L62A/L8<br>60F                           | + | + | + | + | + | +++ |
| 3347/33<br>48 | L62A/S6<br>78T/V87<br>8S/A932<br>T       | + | + | + | + | + | +++ |
| 3349/33<br>50 | L62A/S6<br>78T/K83<br>0Q/L860<br>F/V878S | + | + | + | + | + | +   |
| 3351/33<br>52 | L62A/L8<br>60F/V87<br>8S/A932<br>S       | + | + | + | + | + | +   |
| 3353/33<br>54 | L62A/S6<br>78T/L86<br>0F/A932<br>S       | + | + | + | + | + | +   |
| 3355/33<br>56 | L62A/S6<br>78T                           | + | + | + | + | + | ++  |

|               |  |   |   |   |   |   |     |
|---------------|--|---|---|---|---|---|-----|
| 3357/33<br>58 | L62A/S6<br>78T/A93<br>2S                 | + | + | + | + | + | +   |
| 3359/33<br>60 | L62A/S6<br>78T/E87<br>1L/A932<br>S       | + | + | + | + | + | ++  |
| 3361/33<br>62 | L62A/K8<br>30Q/L86<br>0F/A932<br>S       | + | + | + | + | + | ++  |
| 3363/33<br>64 | L62A/S6<br>78T/K83<br>0Q/V878<br>S/A932S | + | + | + | + | + | +   |
| 3365/33<br>66 | L62A/E8<br>71L/V87<br>8S/A932<br>S       | + | + | + | + | + | +++ |
| 3367/33<br>68 | L62A/K8<br>30Q/L86<br>0F                 | + | + | + | + | + | ++  |
| 3369/33<br>70 | L62A/S6<br>78T/K83<br>0Q/A932<br>S       | + | + | + | + | + | ++  |
| 3371/33<br>72 | L62A/L8<br>60F/E871<br>L/A932S           | + | + | + | + | + | +   |

|  |  |   |   |   |   |   |     |
|--|--|---|---|---|---|---|-----|
| 3373/33<br>74  | L62A/S6<br>78T/K83<br>0Q/L860<br>F/E871L/<br>V878S/A<br>932S | + | + | + | + | + | +++ |
| 3375/33<br>76  | L62A/K8<br>30Q   | + | + | + | + | + | ++  |
| 3377/33<br>78  | S678T/K<br>830Q/A9<br>32S                                    | + | + | + | + | + | +   |
| <sup>1</sup> Всю активность определяют относительно эталонного полипептида с SEQ ID NO: 3104.<br>Уровни повышенной активности определены следующим образом: «+»=0,9-1,1; «++» >1,1; «+++» >2; и «++++» >3,5. |  |   |   |   |   |   |     |

### ПРИМЕР 17

#### Идентификация активных вариантов GAA со сниженной иммуногенностью

Предполагаемые Т-клеточные эпитопы в GAA WT (SEQ ID NO:6) идентифицируют с использованием инструментов базы данных иммунных эпитопов (IEDB; веб-сайт базы данных и ресурсов анализа иммунных эпитопов), известных в данной области техники, и собственных инструментов статистического анализа (см., например, [iedb.org](http://iedb.org) и Vita et al., Nucl. Acids Res., 38(Database issue): D854-62 [2010]. Epub 2009 Nov 11]). WT GAA разбирают на все возможные 15-мер рамки анализа, причем каждая рамка перекрывает последнюю на 14 аминокислот. 15-мер рамки анализа оценивают на иммуногенный потенциал путем подсчета их 9-мер коровых областей на предсказанное связывание с восемью распространенными аллелями HLA-DR класса II (DRB1\*0101, DRB1\*0301, DRB1\*0401, DRB1\*0701, DRB1\*0801, DRB1\*1101, DRB1\*1301 и DRB1\*1501), которые в совокупности охватывают почти 95% человеческой популяции (см., например, Southwood et al., J. Immunol., 160:3363-3373 [1998]), используя методы, рекомендованные на веб-сайте IEDB. Потенциальные кластеры эпитопов Т-клеток, содержащиеся в ферменте (т.е. субобласти, содержащиеся в GAA, обладающие необычно высоким потенциалом иммуногенности), идентифицируют с использованием инструментов статистического анализа, известных в данной области техники.

Варианты GAA, которые идентифицированы в примерах 3, 4, 6, 10 и 12-16 как активные в анализах, описанных в примерах 5 и 11, анализируют на предмет их уровней прогнозируемой иммуногенности путем оценки их связывания с восемью распространенными аллелями HLA-DR класса II. Для каждого варианта рассчитывают общую оценку иммуногенности и количество иммуногенных попаданий. Общая оценка иммуногенности (TIS) отражает общую прогнозируемую иммуногенность варианта (т.е.

более высокий балл указывает на более высокий уровень прогнозируемой иммуногенности). Иммуногенное «количество совпадений» (ИНС) указывает количество 15-мер рамок анализа с необычно высоким потенциалом иммуногенности (т.е. более высокий балл указывает на более высокий потенциал иммуногенности). Мутации, приводящие к снижению общей оценки иммуногенности и/или количества иммуногенных совпадений по сравнению с эталонной последовательностью, считаются потенциальными «деиммунизирующими мутациями» и показаны в таблицах 17-1, 17-2, 17-3, 17-4, 17-5, 17-6, 17-7, 17-8 и 17-9. Набор наиболее деиммунизирующих мутаций повторно объединяют для создания ряда вариантов, которые активны и, по прогнозам, значительно менее иммуногенны, чем WT GAA.

| <b>Таблица 17-1. Снижение общей оценки иммуногенности (TIS) и подсчет иммуногенных совпадений (ИНС) для вариантов GAA относительно SEQ ID NO: 2<sup>1</sup></b> |  |   |   |
|---|--|---|---|
| <b>SEQ ID NO:<br/>(нт/ак)</b>   | <b>Аминокислотные различия<br/>(относительно SEQ ID NO: 2)</b> | <b>Снижение TIS<br/>(относительно<br/>SEQ ID NO: 2)</b> | <b>Снижение ИНС<br/>(относительно<br/>SEQ ID NO: 2)</b> |
| 7/8   | T150S/T486E/A750P/R883H/Q894G                                  | +++   | ++++  |
| 101/102   | L871E  | +++   | +++   |
| 105/106   | M138A  | +   |   |
| 109/110   | Q107G  | ++  |   |
| 113/114   | Q110G  | ++  |   |
| 115/116   | Q110L  | +   |   |
| 123/124   | R403W  | +   |   |
| 125/126   | R414P  | +   |   |
| 137/138   | S135Q  | +   |   |
| 145/146   | T148G  | +   |   |
| 147/148   | T148Y  | +   |   |
| 149/150   | T150G  | +   |   |
| 155/156   | T692Q  | ++  | +   |
| 159/160   | V30G   | +++   | +++   |
| 161/162   | V30K   | ++  | +   |
| 163/164   | V30T   | +++   | +++   |
| 183/184   | L275M/A281V/S402A/M431V/<br>M507L/I518V/W610R/S668D            | ++  |   |

|         |   |      |      |
|---------|---|------|------|
| 185/186 | L275M/M507L/A547G/S668D/L669H/S671N             | +++  | +    |
| 187/188 | L275M/M431V/V638I                               | ++   |      |
| 189/190 | A281V/S402A/I518V/A547G/S668D                   | ++   |      |
| 193/194 | L275V/M431V/M507L/I518V/A547G/S668D/L669H/S671N | +++  | +    |
| 195/196 | S402A/M431V/I518V/W610R                         | +    |      |
| 197/198 | K106P/H191R/G280D/S402A/R414G/A444P/S727P       | ++   |      |
| 199/200 | M431V/M507L/I518V/L669H/S671N                   | ++   | +    |
| 201/202 | L275V/R377K/S402A/M507L/I518V/L669H/S671N/V715G | ++   | +    |
| 203/204 | H191R/R414G/E522V/G842S/C944S                   | +    |      |
| 207/208 | L275M/A281V/W610R/V638I/S668D/L669H             | ++   |      |
| 209/210 | A196V/S402A/M431V/A547G/W610R/V638I             | ++   |      |
| 211/212 | H191R/G280D/S402A/R414G/A444P/A489D/D500A/C944S | ++   |      |
| 213/214 | L275V/S402A/V638I/L669H/S671N                   | +    | +    |
| 215/216 | L29Q/L240I/A596P/S668D/I869L                    | ++++ | ++++ |
| 217/218 | K106P/G280D/S402A/R414G/A444P/A489D/S727P/C944S | +++  |      |
| 219/220 | L29Q/L240I/A596S/S668D/H700F/I744V/I869T        | ++++ | +++  |
| 221/222 | L218S/S668D/H700F/I869T                         | +++  | +    |
| 223/224 | M507L/A547G/W610R                               | +    |      |
| 225/226 | A281V/M431V/M507L/I518V/A547G/W610R/V638I/S668D | ++   |      |



|         |   |     |   |
|---------|---|-----|---|
| 227/228 | H191R/G280D/R414G/A444P/A<br>489D/E522V/S727P/C944S           | ++  |   |
| 229/230 | L275V/S402A/M431V/I518V/W<br>610R/V638I/L669H/S671N/P922<br>L | +   |   |
| 23/24   | A276Y   | +   |   |
| 231/232 | L29V/L218S/L240I/H700F/I869<br>T                              | ++  | + |
| 233/234 | A547G/V638I/S668D   | +++ | + |
| 235/236 | H191R/G280D/R414G/C944S                                       | +   |   |
| 237/238 | L275V/M431V/M507L/I518V/W<br>610R/L669H/S671N                 | +   | + |
| 239/240 | L275M/S402A/M431V/M507L/<br>A547G/S671N                       | +++ |   |
| 241/242 | S402A/M431V/A547G/V638I/S6<br>71N                             | +++ |   |
| 243/244 | A281V/S402A/M507L/A547G/V<br>638I/L669H/S671N                 | +   |   |
| 245/246 | L275M/A281V/M507L/A547G/L<br>669H/S671N                       | ++  |   |
| 247/248 | L275M/M431V/I518V/A547G/V<br>638I/S668D                       | +++ | + |
| 249/250 | A547G/W610R/V638I/S671N                                       | ++  |   |
| 25/26   | A418E/H499R   | +   |   |
| 251/252 | L275V/M431V/M507L/A547G/<br>W610R/V638I/S671N                 | ++  |   |
| 253/254 | L275M/S402A/M507L/A547G/<br>W610R/S671N                       | +++ |   |
| 255/256 | L275M/A281V/S402A/I518V/A5<br>47G/W610R/V638I/S671N           | ++  |   |
| 257/258 | A281V/S402A/I518V/A547G/W<br>610R/V638I/S668D/L669H           | ++  |   |
| 259/260 | L275M/A281V/S402A/A547G/<br>W610R/V638I/L669H/S671N           | ++  |   |

|         |   |     |     |
|---------|---|-----|-----|
| 261/262 | L275M/M431V/I518V/W610R/V<br>638I/L669H/S671N                 | ++  | +   |
| 263/264 | L29Q/L218S/L240I/S668D/H700<br>F/I744V/I869L                  | +++ | +   |
| 265/266 | A281V/S402A/M507L/I518V/A5<br>47G/W610R/V638I/L669H/S671<br>N | +   |     |
| 267/268 | S402A/M431V/I518V/A547G/S6<br>71N                             | +++ |     |
| 269/270 | L275V/A281V/S402A/M431V/I5<br>18V/A547G/W610R/L669H/S67<br>1N | +   |     |
| 271/272 | L224F/S402A/M507L/I518V/A5<br>47G/V638I/S668D                 | +++ | ++  |
| 273/274 | N180H/S402A/M507L/A547G/<br>W610R/S671N                       | ++  |     |
| 275/276 | L275M/A281V/S402A/M507L/I<br>518V/A547G/V638I/L669H/S67<br>1N | ++  |     |
| 277/278 | K106P/T150S/T486E/Q749E/E7<br>93K/R883H/Q894G                 | +++ | +++ |
| 279/280 | L275V/A281V/M431V/I518V/A<br>547G/V638I/L669H/S671N           | +   |     |
| 281/282 | L275V/S402A/A547G/W610R/V<br>638I/L669H/S671N                 | ++  | +   |
| 283/284 | L275M/S402A/A547G/V638I/L6<br>69H/S671N                       | +++ | +   |
| 285/286 | K106P/T150S/T486E/N527D/A7<br>50P/E793K                       | +   |     |
| 287/288 | S402A/M431V/I518V/A547G/W<br>610R/S668D                       | +++ | +   |
| 29/30   | A437S   | ++  | ++  |
| 291/292 | L275V/M507L/I518V/A547G/V<br>638I/L669H/S671N                 | ++  | +   |

|         |   |     |   |
|---------|---|-----|---|
| 293/294 | N180H/S402A/M431V/M507L/<br>A547G/W610R/L669H/S671N/E<br>793G | +++ |   |
| 295/296 | L275V/M507L/I518V/A547G/W<br>610R/V638I/S668D/L669H           | +++ | + |
| 297/298 | L275V/S402A/M507L/A547G/W<br>610R/V638I/S668D/L669H           | +++ | + |
| 299/300 | M507L/A547G/V638I/L669H/S6<br>71N                             | ++  | + |
| 303/304 | T150S/R414G/T486E/Q749E/A7<br>50P/E793K                       | ++  |   |
| 305/306 | K106P/T150S/L218S/R414G/T4<br>86E/L642F/A750P/E793K/R883<br>H | +++ |   |
| 307/308 | N180H/L275M/S402A/I518V/A5<br>47G/W610R/V638I/L669H/S671<br>N | +++ | + |
| 309/310 | T150S/L218S/R414G/Q749E/E7<br>93K                             | +   |   |
| 311/312 | L275V/M507L/A547G/W610R/<br>V638I/L669H/S671N                 | +   | + |
| 313/314 | T150S/R414G/T486E/N527D/A7<br>50P/Q894R                       | ++  |   |
| 315/316 | K106P/T150S/L218S/N527D/E7<br>93K/Q894G                       | ++  | + |
| 321/322 | K106P/T150S/R414G/Q749E/A7<br>50P/E793K/Q894R                 | ++  |   |
| 323/324 | K106P/T150S/N169S/N527D/Q7<br>49E/E793K/R883H                 | ++  |   |
| 325/326 | L275V/S402A/M507L/A547G/W<br>610R/V638I/L669H/S671N           | ++  | + |
| 329/330 | M431V/M507L/I518V/G541E/A<br>547G/V638I/L669H/S671N           | +++ | + |
| 331/332 | T150S/L218S/R414G/T486A/A7                                    | +   |   |

|         |   |     |   |
|---------|---|-----|---|
|         | 50P/E793K   |     |   |
| 335/336 | K106P/T150S/N169S/L218S/R4<br>14G/T486E/Q894R                       | +   |   |
| 337/338 | T150S/L218S/R414G/T486E/A7<br>50P/E793K/R883H                       | ++  |   |
| 339/340 | K106P/T150S/N169S/L218S/R4<br>14G/Q749E/E793K                       | +   |   |
| 341/342 | T269N/L275M/M431V/I518V/A<br>547G/V638I/S668D/L669H                 | +++ | + |
| 343/344 | K106P/T150S/R414G/Q749E/E7<br>93K/Q894R                             | ++  |   |
| 347/348 | K106P/T150S/N169S/Q749E/E7<br>93K/R883H/Q894R                       | ++  |   |
| 35/36   | A547G   | +   |   |
| 353/354 | K106P/T150S/L218S/R414G/T4<br>86E/A750P/E793K/Q894R                 | +   |   |
| 355/356 | K106P/T150S/N169S/L218S/R4<br>14G/T486E/Q749E/E793K/R883<br>H/Q894R | ++  |   |
| 357/358 | K106P/T150S/N169S/L218S/T48<br>6E/R883H                             | ++  | + |
| 359/360 | K106P/T150S/N169S/L218S/R4<br>14G/T486E/A750P/E793K/R883<br>H/Q894R | ++  |   |
| 361/362 | G36R/K106P/T150S/L218S/N52<br>7D/A750P/R883H/Q894R                  | +   |   |
| 363/364 | K106P/T150S/N169S/L218S/T48<br>6E/Q749E/R883H                       | ++  | + |
| 365/366 | K106P/N169S/V185G/L218S/R4<br>14G/Q749E/A750P/E793K                 | +   |   |
| 367/368 | K106P/T150S/P245S/E793K/R8<br>83H/Q894R                             | +   |   |
| 369/370 | K106P/T150S/N169S/L218S/R4<br>14G/Q749E/A750P/E793K/R883            | ++  |   |

|         | H   |     |   |
|---------|---|-----|---|
| 37/38   | A750P   | +   |   |
| 375/376 | T150S/L218S/R414G/Q749E/A750P/E793K/Q894R                   | +   |   |
| 377/378 | K106P/T150S/N169S/R414G/T486E/Q749E/A750P/R883H             | +++ | + |
| 379/380 | K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/T486E/E793K/R883H             | ++  |   |
| 381/382 | K106P/T150S/L218S/T486E/N527D/Q749E/Q894R                   | +   |   |
| 383/384 | K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/T486E/N527D/Q894R             | +   |   |
| 385/386 | T150S/L218S/R414G/T486E/Q749E/A750P                         | ++  |   |
| 387/388 | K106P/T150S/L218S/R414G/Q749E/E793K/R883H                   | ++  |   |
| 389/390 | K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/T486E/N527D/A750P/Q894R       | ++  |   |
| 39/40   | A753T   | +   |   |
| 391/392 | N169S/T486E/A750P/E793K/R883H                               | ++  |   |
| 393/394 | K106P/T150S/L218S/R414G/N527D/Q749E/A750P/R883H             | +++ | + |
| 395/396 | K106P/T150S/L218S/R414G/Q749E/A750P/E793K/R883H/Q894R       | ++  |   |
| 397/398 | K106P/T150S/N169S/L218S/R414G/Q749E/E793K/R883H             | ++  |   |
| 399/400 | K106P/T150S/L218S/T486E/E793K/R883H                         | +   |   |
| 401/402 | K106P/T150S/L218S/V331A/R414G/T486E/N527D/D733E/Q749E/E793K | ++  |   |

|         |   |     |    |
|---------|---|-----|----|
| 403/404 | L275M/A281V/S402A/I518V/A5<br>47G/W610R/S668D/L669H/E88<br>7D | +++ | +  |
| 405/406 | K106P/T150S/L218S/R414G/N5<br>27D/Q749E/E793K/R883H/Q894<br>G | +++ | ++ |
| 407/408 | K106P/T150S/Q749E/E793K/R8<br>83H                             | ++  |    |
| 409/410 | K106P/A112S/T150S/L218S/R4<br>14G/N527D/E793K/R883H           | ++  |    |
| 43/44   | C944G   | +   |    |
| 47/48   | D274G   | +   |    |
| 53/54   | F27P  | +   | +  |
| 55/56   | F27P/C944W  | +   | +  |
| 57/58   | F27R  | +   | +  |
| 61/62   | G820E   | +   |    |
| 63/64   | I375E   | +   |    |
| 65/66   | K471Q/A478S   | +   |    |
| 69/70   | K581G   | ++  | +  |
| 71/72   | K581T   | +   |    |
| 81/82   | L109G/G842E   | +   |    |
| 83/84   | L109P   | +   |    |
| 85/86   | L28P  | ++  | ++ |
| 89/90   | L28S  | ++  | ++ |
| 91/92   | L29T/A478T  | +++ | ++ |
| 95/96   | L642Q   | +   |    |
| 97/98   | L642S   | +   |    |
| 99/100  | L670N   | +++ | +  |

<sup>1</sup>Снижение TIS измеряют как снижение количества импульсов по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 2, и определяют следующим образом: «+»=1-10; «++» >10; «+++» > 20; и «++++» > 50. Снижение ИНС измеряют как снижение количества импульсов по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 2, и определяют следующим образом: «+»=1-3; «++» >3; «+++» >5; и «++++» >8.

**Таблица 17-2. Снижение общей оценки иммуногенности (TIS) и подсчет**

| <b>иммуногенных совпадений (ИНС) для вариантов ГАА относительно SEQ ID NO: 8<sup>1</sup></b> |  |   |   |
|--|--|---|---|
| <b>SEQ ID NO:<br/>(нт/ак)</b>  | <b>Аминокислотные различия<br/>(относительно SEQ ID NO: 8)</b> | <b>Снижение TIS<br/>(относительно<br/>SEQ ID NO: 8)</b> | <b>Снижение ИНС<br/>(относительно<br/>SEQ ID NO: 8)</b> |
| 13/14  | L28S/L29T/S135Q  | ++++  | +++   |
| 413/414  | A418E  | +++   | +   |
| 415/416  | A418E/A489R  | +++   | +   |
| 431/432  | K106P  | +++   | +   |
| 433/434  | K106P/A489R/S671N  | +++   | +   |
| 445/446  | K106P/V638I  | +++   | +   |
| 447/448  | L157M  | +++   | +   |
| 469/470  | L218S/V638I/S671N  | +++   |   |
| 509/510  | Q113S/A418E/A478T/A489R/K581T                                  | +++   |   |
| 511/512  | Q113S/A418E/R455V/A478T/K581T                                  | +++   |   |
| 519/520  | S135P/C944Y  | +++   | +   |
| 521/522  | S135Q  | +++   | +   |
| 523/524  | S135Q/A478T/A489R/K581T  | +++   |   |
| 531/532  | S671N/Q749E  | +++   | +   |
| 441/442  | K106P/M138A/L218S/M431V/S671N<br>/Q749E                        | +++   |   |
| 513/514  | Q113S/S135Q/A418E  | +++   | +   |
| 527/528  | S135Q/T148G/S150G/A418E  | +++   | +   |
| 429/430  | F27R   | +++   | +   |
| 425/426  | F27P/A418E/A478T   | +++   | +   |
| 501/502  | M507L/S668D  | +++   | +   |
| 495/496  | M138A/L218S/S668D/S671N  | +++   | +   |
| 499/500  | M431V/S668D/S671N  | ++++  | ++  |
| 471/472  | L28S   | +++   | ++  |
| 481/482  | L29T/A478T   | +++   | +++   |
| 483/484  | L29T/Q113S/M138A   | +++   | +++   |
| 485/486  | L29T/Q113S/P126Q/S135Q/H193Q                                   | +++   | +++   |
| 487/488  | L29T/Q113S/S135Q   | +++   | +++   |
| 489/490  | L29T/Q113S/S135Q/R455V   | +++   | +++   |

|         |                             |      |     |
|---------|-----------------------------|------|-----|
| 491/492 | L29T/T148G                  | +++  | +++ |
| 473/474 | L28S/L29T                   | +++  | +++ |
| 475/476 | L28S/L29T/A418E             | ++++ | +++ |
| 477/478 | L28S/L29T/Q113S/S135Q/A418E | ++++ | +++ |
| 479/480 | L28S/L29T/Q113S/S135Q/M138A | ++++ | +++ |

<sup>1</sup>Снижение TIS измеряют как снижение количества импульсов по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 8, и определяют следующим образом: «+»=1-10; «++» >10; «+++» >20; b «++++» >50. Снижение ИНС измеряют как снижение количества импульсов по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 8, и определяют следующим образом: «+»=1-3; «++» >5; b «+++» >8.

**Таблица 17-3. Снижение общей оценки иммуногенности (TIS) и подсчет иммуногенных совпадений (ИНС) для вариантов ГАА относительно SEQ ID NO: 18<sup>1</sup>**

| SEQ ID NO:<br>(нт/ак) | Аминокислотные различия<br>(относительно SEQ ID NO: 18) | Снижение TIS<br>(относительно SEQ ID NO: 18) | Снижение ИНС<br>(относительно SEQ ID NO: 18) |
|-----------------------|---|--|--|
| 19/20                 | P39Q/R267K/A489D/E522V/S612D/Q830K/G842S                | +  |  |
| 371/372               | P39D  | +  |  |
| 533/534               | V70A/R267K/K725E/C944S                                  | +  |  |
| 535/536               | R267K/A489D/D500A/K725E/Q830K/C930P                     | +  |  |
| 537/538               | L109P/E522V/Q830K/C944S                                 | +  |  |
| 539/540               | V70A/R267K/C930P/C944S                                  | +  |  |
| 543/544               | H734K   | +  |  |
| 553/554               | P39Q/V70A/L109P/Q830K/G842S                             | +  |  |
| 555/556               | P39Q/V70A/K725E   | +  |  |
| 557/558               | P39Q/R267K/A489D/Q830K/C944S                            | +  |  |
| 559/560               | C930P   | +  |  |
| 561/562               | D500A/C930P/C944S                                       | +  |  |
| 567/568               | P39Q/R267K  | +  |  |
| 575/576               | R267K/E522V/K725E                                       | +  |  |



|         |                                  |    |    |
|---------|----------------------------------|----|----|
| 577/578 | V70A/A489D/C930P                 | +  |    |
| 585/586 | P39Q                             | +  |    |
| 601/602 | S37F/N528S/I790V                 | +  |    |
| 611/612 | S37F/A62E                        | +  |    |
| 625/626 | S37F/A196T                       | +  |    |
| 627/628 | S37F/A62E/D523N                  | +  |    |
| 633/634 | S37F/A62E/N79S/A196T/A696S/R862Q | +  |    |
| 655/656 | L34D                             | +  |    |
| 657/658 | Y352K                            | +  |    |
| 667/668 | N875D                            | ++ | ++ |
| 673/674 | I22R                             | +  |    |
| 675/676 | L24W                             | ++ |    |
| 677/678 | L778Q                            | +  |    |
| 685/686 | Y352V                            | +  |    |
| 691/692 | F27K                             | +  |    |
| 695/696 | S932A                            | +  |    |
| 697/698 | L24R                             | +  |    |
| 699/700 | L24E                             | ++ |    |
| 709/710 | F27G                             | +  |    |
| 713/714 | L34M                             | +  |    |
| 731/732 | A774G                            | +  |    |
| 735/736 | F27W                             | +  |    |
| 745/746 | R385G                            | +  |    |
| 747/748 | F27G/M165I                       | +  |    |
| 749/750 | V30D                             | +  |    |
| 753/754 | V40W                             | +  |    |
| 761/762 | E33G                             | +  |    |
| 765/766 | L109D                            | +  |    |
| 793/794 | Q107G                            | ++ |    |
| 801/802 | F27R                             | +  |    |
| 803/804 | L934F                            | +  |    |
| 813/814 | Q217D                            | +  |    |
| 817/818 | L34T                             | +  |    |
| 821/822 | P673N                            | +  |    |

<sup>1</sup>Снижение TIS измеряют как снижение количества импульсов по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 18, и определяют следующим образом: «+»=1-10; «++» >10; «+++» >20; и «++++» >50. Снижение ИНС измеряют как снижение количества импульсов по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 18, и определяют следующим образом: «+»=1-2; «++» >2; и «+++» >5.

**Таблица 17-4. Снижение общей оценки иммуногенности (TIS) и подсчет иммуногенных совпадений (ИНС) для вариантов ГАА относительно SEQ ID NO: 20<sup>1</sup>**

| SEQ ID NO:<br>(нт/ак) | Аминокислотные различия<br>(относительно SEQ ID NO: 20) | Снижение TIS<br>(относительно SEQ ID NO: 20) | Снижение ИНС<br>(относительно SEQ ID NO: 20) |
|-----------------------|---|--|--|
| 829/830               | L24R/F27G/A89R/D500A/S842G                              | +  |  |
| 831/832               | L24R/F27G/D500A/S842G                                   | +  |  |
| 833/834               | D500A/S932A   | +  |  |
| 835/836               | L24R/Q39H/S842G/S932A                                   | +  |  |
| 839/840               | D500A/S842G   | +  |  |
| 841/842               | S842G/S932A   | +  |  |
| 843/844               | A89R/A97G/Q107G   | ++   |  |
| 847/848               | F27G/Q39H/Q49G/A97G/D500A/S842G                         | +  |  |
| 849/850               | R68N/A89R/A97G/S932A                                    | +  |  |
| 851/852               | A89R/S842G  | +  |  |
| 853/854               | L24R/Q39D/R68S/A89R/Q107G/D500A/S842G                   | ++   |  |
| 855/856               | L24R/F27G/D500A/S842G/S932A                             | +  |  |
| 857/858               | L24R/Q39H/Q49G/A89R/A97G/S842G/S932A                    | +  |  |
| 859/860               | L24R/S842G/S932A  | +  |  |
| 861/862               | L24R/A89R/D500A   | +  |  |
| 863/864               | L24R/Q39H/A89R/A97D/S842G/S932A                         | +  |  |
| 865/866               | L24R  | +  |  |
| 867/868               | F27G/Q49G/R68S/D500A/S842G                              | +  |  |
| 869/870               | Q107G/D500A/S842G                                       | ++   |  |

|         |   |     |  |
|---------|---|-----|--|
| 871/872 | L34T/Q39D/D500A/S932A                             | +   |  |
| 875/876 | L24W/L109D/D612S                                  | +++ |  |
| 877/878 | L24W/V70A/K267R/A774S                             | +   |  |
| 879/880 | I22R/L24W/D612S/K725E/C944R                       | +++ |  |
| 881/882 | L24W  | ++  |  |
| 883/884 | I22R/L24W/F27A/D489A                              | +++ |  |
| 887/888 | I22R/L24W/F27A/Q50V/Q107G/L109D/D489A/D612S/K725E | +++ |  |
| 889/890 | Q50V/D612S/C944S                                  | +   |  |
| 891/892 | D612S/K725E/C944S                                 | +   |  |
| 893/894 | L109D/D612S/A774S/C944S                           | +   |  |
| 895/896 | I22R/L24W/F27A/D612S/C944R                        | +++ |  |
| 899/900 | Q50V/L109D/D489A/D612S                            | +   |  |
| 901/902 | I22R/L24W/Q50V/L109D/K267R/D489A/A774S/C944R      | ++  |  |
| 903/904 | I22R/L24W   | ++  |  |
| 905/906 | L24W/Q50V/D489A/C944S                             | ++  |  |
| 907/908 | I22R/Q50V/L109D/K267R/D489A                       | +   |  |
| 909/910 | L24W/D489A/C944R                                  | ++  |  |
| 911/912 | L24W/K725E  | ++  |  |
| 913/914 | L24W/L109D/C944S                                  | ++  |  |
| 915/916 | D612S/P922E                                       | +   |  |
| 917/918 | L24W/K267R/K725E/C944S                            | +   |  |
| 919/920 | Q107G/L109D                                       | ++  |  |
| 923/924 | I22R/L24W/Q50V/K267R/D612S/P922E/C944R            | ++  |  |
| 925/926 | I22R/L24W/F27A/D489A/D612S/A774S                  | +++ |  |
| 927/928 | L24W/F27A/Q107G/K267R/D612S/C944S                 | +++ |  |
| 929/930 | L24W/F27A/K267R/C944R                             | ++  |  |
| 931/932 | I22R/L24W/D489A                                   | ++  |  |
| 933/934 | I22R/Q50V/Q107G/K267R/D489A/D612S/C944S           | ++  |  |
| 935/936 | L24W/V70A/Q107G/L109D/D489A/D612S/K725E           | +++ |  |

|           |  |     |     |
|-----------|--|-----|-----|
| 937/938   | I22R/L24W/Q107G/K267R/D489A/P922E              | +++ |     |
| 939/940   | L24W/Q107G/L109D/K267R/D489A/D612S/K725E/A774S | +++ |     |
| 941/942   | L24W/F27A/C944R                                | +++ |     |
| 943/944   | D612S  | +   |     |
| 945/946   | L24W/Q50V/D612S                                | ++  |     |
| 947/948   | I22R/K267R/D489A/D612S                         | +   |     |
| 949/950   | L24W/F27A/Q50V/Q107G/K267R/A774S/C944S         | +++ |     |
| 951/952   | L24W/C944S                                     | ++  |     |
| 1121/1122 | L818V  | +   |     |
| 1123/1124 | T148E  | +   |     |
| 1125/1126 | A741D  | ++  |     |
| 1129/1130 | L737M  | +   |     |
| 1141/1142 | G108S  | ++  |     |
| 1143/1144 | L259N  | +   |     |
| 1153/1154 | L238Q  | +++ | +++ |
| 1159/1160 | S916A  | ++  |     |
| 1167/1168 | M432C  | ++  | ++  |
| 1173/1174 | E188Q/R377Q                                    | +   |     |
| 1175/1176 | K106G  | +   |     |
| 1177/1178 | K106N  | +   |     |
| 1179/1180 | L244I  | +   |     |
| 1181/1182 | A319F  | +   | +   |
| 1183/1184 | I815M  | +   | ++  |
| 1189/1190 | P832E  | +   |     |
| 1191/1192 | A741T  | +   |     |
| 1207/1208 | S243R  | +   |     |
| 1215/1216 | S727T  | +   |     |
| 1217/1218 | L240I  | +   |     |
| 1231/1232 | V913A  | ++  |     |
| 965/966   | S916R  | +   |     |
| 1235/1236 | L940G  | +   |     |
| 967/968   | P914G  | ++  |     |

|           |       |     |     |
|-----------|-------|-----|-----|
| 1261/1262 | L305Y | +   | +   |
| 971/972   | D923W | +   |     |
| 1297/1298 | L305G | +++ | +++ |
| 981/982   | L742V | +   |     |
| 1307/1308 | I815A | +   |     |
| 991/992   | P914Q | +   |     |
| 1327/1328 | P914E | +   |     |
| 1335/1336 | S264C | +   |     |
| 1339/1340 | Y248A | +   |     |
| 1341/1342 | L305R | +   | +   |
| 1001/1002 | T148K | +   |     |
| 1349/1350 | L320M |     | +   |
| 1351/1352 | L736V | +   |     |
| 1353/1354 | A309C | ++  | +   |
| 1385/1386 | S727Q | +   |     |
| 1007/1008 | A112H | +   |     |
| 1395/1396 | L823A | +   |     |
| 1405/1406 | L736W | +   |     |
| 1409/1410 | S916I | +   |     |
| 1413/1414 | V913E | ++  |     |
| 1427/1428 | L305V | ++  | +   |
| 1435/1436 | Y248V | +   |     |
| 1439/1440 | L818T | ++  |     |
| 1441/1442 | A741C | ++  |     |
| 1445/1446 | F556S | ++  |     |
| 1013/1014 | P914T | +   |     |
| 1015/1016 | S916G | ++  |     |
| 1459/1460 | L748I | +   |     |
| 1461/1462 | M260W | +   |     |
| 1467/1468 | G108N | ++  |     |
| 1019/1020 | P914K | +   |     |
| 1471/1472 | I816V | +   | ++  |
| 1479/1480 | L748T | +   |     |
| 1023/1024 | V913W | ++  |     |

|           |             |     |    |
|-----------|-------------|-----|----|
| 1483/1484 | T148R/V772I | +   |    |
| 1485/1486 | K106T       | +   |    |
| 1487/1488 | L240W/A374T | ++  | +  |
| 1489/1490 | F556Y       | +   |    |
| 1499/1500 | G108V       | +   |    |
| 1515/1516 | S916V       | +   |    |
| 1033/1034 | L823F       | +   |    |
| 1527/1528 | E937Q       | +   |    |
| 1035/1036 | L305F       | +   | +  |
| 1539/1540 | P832G       | +   |    |
| 1541/1542 | V913H       | ++  |    |
| 1545/1546 | L252V       | +   |    |
| 1551/1552 | S243G       | ++  | +  |
| 1555/1556 | A741E       | ++  |    |
| 1557/1558 | S243V       | +   |    |
| 1037/1038 | P914S       | +   |    |
| 1039/1040 | S727W       | +   |    |
| 1041/1042 | L940Q       | +   |    |
| 1567/1568 | P279E       | +   |    |
| 1569/1570 | V913Q       | ++  |    |
| 1583/1584 | L259G       | +   |    |
| 1585/1586 | S243E       | +++ | ++ |
| 1059/1060 | S402N       | +   |    |
| 1599/1600 | A253G       | +   |    |
| 1601/1602 | L736M       | ++  |    |
| 1603/1604 | L940W       | +   |    |
| 1069/1070 | G108R       | +   |    |
| 1605/1606 | L823G       | +   |    |
| 1071/1072 | L748V       | +   |    |
| 1619/1620 | S727G       | +   |    |
| 1621/1622 | F556R       | ++  |    |
| 1623/1624 | L261E       | +   |    |
| 1625/1626 | A309G       | ++  |    |
| 1631/1632 | F556H       | ++  |    |

|           |             |     |     |
|-----------|-------------|-----|-----|
| 1633/1634 | K106A       | +   |     |
| 1635/1636 | S402G       | +   |     |
| 1641/1642 | S262P       | +   |     |
| 1643/1644 | P914H       | +   |     |
| 1079/1080 | I333L       | +   |     |
| 1651/1652 | L329F       | +   |     |
| 1653/1654 | S246G       | ++  | +   |
| 1081/1082 | V312A       | +++ | +++ |
| 1661/1662 | T148G       | +   |     |
| 1085/1086 | S916H       | ++  |     |
| 1683/1684 | A741G       | +   |     |
| 1691/1692 | S246A       | +   |     |
| 1693/1694 | L940T       | +   |     |
| 1703/1704 | H387L       | +   |     |
| 1717/1718 | L244V       | ++  | +   |
| 1733/1734 | T148H       | +   |     |
| 1735/1736 | Y248R       | +   |     |
| 1101/1102 | P914R       | +   |     |
| 1757/1758 | A253P       | +   |     |
| 1105/1106 | N911G       | ++  |     |
| 1769/1770 | I333V       | +   |     |
| 1771/1772 | A112P       | +   |     |
| 1779/1780 | V913L       | ++  |     |
| 1785/1786 | L259S       | +   |     |
| 1787/1788 | L823R       | +   |     |
| 1789/1790 | L240Y       | +   |     |
| 1797/1798 | I249V/S777N | +   |     |
| 1109/1110 | V913R       | +   |     |
| 1807/1808 | G108H       | +   |     |
| 1825/1826 | Q421P       | +   |     |
| 1117/1118 | V913G       | ++  |     |

<sup>1</sup>Снижение TIS измеряют как снижение количества импульсов по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 20, и определяют следующим образом: «+»=1-10; «++» >10; и «+++» >20. Снижение ИНС измеряют как снижение количества импульсов

по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 20, и определяют следующим образом: «+»=1-3; «++» >3; «+++» >5; и «++++» >8.

**Таблица 17-5. Снижение общей оценки иммуногенности (TIS) и подсчет иммуногенных совпадений (ИНС) для вариантов ГАА относительно SEQ ID NO: 946<sup>1</sup>**

| SEQ ID NO:<br>(нт/ак) | Аминокислотные различия<br>(относительно SEQ ID NO: 946) | Снижение TIS<br>(относительно SEQ ID NO:<br>946) | Снижение ИНС<br>(относительно<br>SEQ ID NO:<br>946) |
|-----------------------|--|--|---|
| 1829/1830             | A62W/A89R/E188W/D489A/D500A/S727W/L823F                  | +  |   |
| 1831/1832             | S124V/D500A/S842G/R862Q                                  | +  |   |
| 1851/1852             | P57L/E188W/D489A/L823F/R862Q                             | +  |   |
| 1855/1856             | A62W/S124V/E188W/L823F/S842G/R862Q                       | +  |   |
| 1859/1860             | P57F/E614Q/S916G/S932A                                   | +  |   |
| 1869/1870             | P57F/A62L/V913R/S916R/S932A                              | +  |   |
| 1871/1872             | A62L/N527R/S727W/S916G                                   | ++   |   |
| 1877/1878             | D500A/S727W/V913R/S916R                                  | +  |   |
| 1925/1926             | D923W  | +  |   |
| 1969/1970             | D489A/E614Q/S916G  | +  |   |
| 1977/1978             | A62W/S727W   | +  |   |
| 1987/1988             | A62W/D489A/N527R/S916R/S932A                             | +  |   |
| 1989/1990             | A62L/D489A/D500A/S932A                                   | +  |   |
| 1991/1992             | D500A/P914R/S916G  | +  |   |
| 1999/2000             | P57F/A62L/S916G  | ++   |   |
| 2005/2006             | P57F/A62W/F120I/N527R/V913R/S916R                        | +  |   |
| 2013/2014             | A62W/S916G   | ++   |   |
| 2015/2016             | P57F/D489A/N527R/P914R/S916G                             | +  |   |
| 1857/1858             | P57F/A62L/L305F/D500A/V913R/S916G                        | +++  | +   |
| 1861/1862             | P57F/A62L/L305F/V913R                                    | ++   | +   |
| 1863/1864             | P57F/A62L/A437G/D500A/L761F/P914K/S916R                  | +  | ++  |
| 1865/1866             | A62L/A437G/V913R/S916R                                   | +++  | ++  |



|   |   |     |    |
|---|---|-----|----|
| 1873/1874   | P57F/A62W/L305F/A437G/D500A/S727<br>W/V913R/S916R       | +++ | ++ |
| 1875/1876   | P57F/A437G/D500A/E614Q/S727W/P914<br>R                  | ++  | ++ |
| 1953/1954   | A62W/A437G/D489A/E614Q/S727W/V9<br>13R                  | ++  | ++ |
| 1955/1956   | A62L/A437G/D489A/N527R/S727W/V91<br>3R/S932A            | +++ | ++ |
| 1957/1958   | P57F/A62W/L305F/D489A/Q907K/V913<br>R/S916G             | ++  | +  |
| 1959/1960   | P57F/A62W/L305F/S916R                                   | ++  | +  |
| 1961/1962   | P57F/A437G/D500A/N527R/S727W/S916<br>R                  | +++ | ++ |
| 1963/1964   | A62L/L305F/S727W  | ++  | +  |
| 1965/1966   | P57F/A62L/L305F/A437G/E614Q/A683S/<br>V913R/S916R/S932A | +++ | ++ |
| 1967/1968   | P57F/L305F  | +   | +  |
| 1973/1974   | P57F/A62W/A437G/V913R/S916G                             | +++ | ++ |
| 1975/1976   | P57F/A62W/L305F/D489A/V913R/S916<br>G                   | +++ | +  |
| 1981/1982   | P57F/L305F/A437G/S916G                                  | +++ | ++ |
| 1983/1984   | A62L/A437G/N527R/S727W                                  | ++  | ++ |
| 1985/1986   | P57F/A62L/A437G/N527R/S727W                             | ++  | ++ |
| 1995/1996   | A62L/L305F/A437G/D500A/S727W/V91<br>3R                  | +++ | ++ |
| 1997/1998   | A437G   | ++  | ++ |
| 2001/2002   | P57F/A62L/L305F/A437G/D500A/E614Q<br>/S727W/S916R       | +++ | ++ |
| 2003/2004   | A437G/D489A/P914R/S916R                                 | ++  | ++ |
| 2007/2008   | A62L/A437G/N527R/S916G/S932A                            | +++ | ++ |
| 2009/2010   | A437G/S727W/P914K                                       | +++ | ++ |
| 2011/2012   | P57F/A437G/V913R/P914R                                  | ++  | ++ |
| 2017/2018   | A437G/P914R/S916G                                       | +++ | ++ |
| <sup>1</sup> Снижение TIS измеряют как снижение количества импульсов по сравнению с |   |     |    |

эталонным полипептидом SEQ ID NO: 946, и определяют следующим образом: «+»=1-10; «++» >10; «+++» >20; и «++++» >50. Снижение ИНС измеряют как снижение количества импульсов по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 946, и определяют следующим образом: «+»=1-3; «++» >3; «+++» >5; и «++++» >8.

**Таблица 17-6. Снижение общей оценки иммуногенности (TIS) и подсчет иммуногенных совпадений (ИНС) для вариантов ГАА относительно SEQ ID NO: 1956<sup>1</sup>**

| SEQ ID NO:<br>(нт/ак) | Аминокислотные различия<br>(относительно SEQ ID NO: 1956) | Снижение TIS<br>(относительно SEQ ID NO:<br>1956) | Снижение ИНС<br>(относительно SEQ ID NO:<br>1956) |
|-----------------------|---|---|---|
| 2021/2022             | P78E/S372T/L390Q  | +   |   |
| 2023/2024             | D87E/T266N/S372T/T483S                                    | +   |   |
| 2027/2028             | T266N/S372T/T924N   | +   |   |
| 2037/2038             | P78E/D87E/K176T/T266N/V536T/Q615D                         | +   |   |
| 2041/2042             | D87E/S372T/S777G  | +   |   |
| 2043/2044             | T266N/S372T/V536T/Q615D/T763L/S777G                       | +   |   |
| 2053/2054             | P78E/T266N/T763L  | +   |   |
| 2055/2056             | P78E/D87E/T266N/S372T/A386Y/S777G                         | +   |   |
| 2073/2074             | P78E/D87E/T266N/S372T/V536T                               | +   |   |
| 2497/2498             | A142G   | +   |   |
| 2501/2502             | D493L   | +   |   |
| 2509/2510             | K129E   | +   |   |
| 2513/2514             | H499E   | +   |   |
| 2517/2518             | L857E   | +   |   |
| 2089/2090             | P779E   | +   |   |
| 2541/2542             | L857A   | +   |   |
| 2547/2548             | H499I   | +   |   |
| 2559/2560             | A834S   | +   |   |
| 2565/2566             | L857V   | +   |   |
| 2567/2568             | F152W   | +   |   |
| 2097/2098             | L857T   | +   |   |
| 2569/2570             | F152S   | +   |   |

|           |       |    |  |
|-----------|-------|----|--|
| 2571/2572 | S136K | +  |  |
| 2573/2574 | K129S | +  |  |
| 2589/2590 | I156C | +  |  |
| 2601/2602 | H499M | +  |  |
| 2617/2618 | S136V | +  |  |
| 2117/2118 | L909F | +  |  |
| 2133/2134 | V797L | +  |  |
| 2143/2144 | I156L | +  |  |
| 2145/2146 | V797M | +  |  |
| 2651/2652 | A834W | +  |  |
| 2661/2662 | K267E | +  |  |
| 2667/2668 | E855G | +  |  |
| 2151/2152 | A105T | ++ |  |
| 2683/2684 | Q768I | +  |  |
| 2685/2686 | V926T | ++ |  |
| 2693/2694 | V797F | +  |  |
| 2695/2696 | S372D | +  |  |
| 2699/2700 | Y765W | +  |  |
| 2161/2162 | T826G | +  |  |
| 2725/2726 | S856G | +  |  |
| 2729/2730 | V797I | ++ |  |
| 2165/2166 | T141S | +  |  |
| 2751/2752 | H499Q | +  |  |
| 2171/2172 | A834H | +  |  |
| 2763/2764 | Y125W | +  |  |
| 2777/2778 | V926M | +  |  |
| 2779/2780 | G139E | +  |  |
| 2791/2792 | T924A | +  |  |
| 2179/2180 | S136G | +  |  |
| 2793/2794 | V797W | ++ |  |
| 2795/2796 | V797E | ++ |  |
| 2191/2192 | A496G | +  |  |
| 2821/2822 | D401G | +  |  |
| 2825/2826 | A834G | +  |  |

|           |             |     |    |
|-----------|-------------|-----|----|
| 2859/2860 | A105W       | +   |    |
| 2861/2862 | L857S       | +   |    |
| 2207/2208 | L693F       | +   | +  |
| 2209/2210 | V710N       | ++  | ++ |
| 2211/2212 | V710L       | +   |    |
| 2213/2214 | M663A       | ++  | +  |
| 2215/2216 | V710M       | +++ | ++ |
| 2217/2218 | L670I       | +   |    |
| 2219/2220 | L670F       | +   |    |
| 2221/2222 | L670R       | +   | +  |
| 2223/2224 | V710S       | +   | +  |
| 2225/2226 | F588L       | ++  | +  |
| 2229/2230 | L670Q       | +++ | +  |
| 2231/2232 | L670T       | +   | +  |
| 2233/2234 | K154R/F588L | +   | +  |
| 2235/2236 | L693Y       | +   | +  |
| 2237/2238 | V710K       | +   | ++ |
| 2239/2240 | A708C       | +++ | ++ |
| 2247/2248 | L670W       | ++  | +  |
| 2249/2250 | L670V       | +   |    |
| 2251/2252 | L693I       | ++  | +  |
| 2253/2254 | V589I/M663F | +   |    |
| 2255/2256 | F588V       | ++  | +  |
| 2257/2258 | M663F       | +   |    |
| 2261/2262 | L670E       | +++ | +  |
| 2263/2264 | L670S       | +   | +  |
| 2275/2276 | L629I       | ++  | +  |
| 2277/2278 | T692L       | +   | +  |
| 2279/2280 | A711C       | +   | ++ |
| 2281/2282 | R577T       | +   | +  |
| 2289/2290 | L628V       | +   |    |
| 2293/2294 | L691V       | +   |    |
| 2297/2298 | L569Y       | +   |    |
| 2299/2300 | I573Q       | ++  | +  |

|           |       |     |     |
|-----------|-------|-----|-----|
| 2303/2304 | T692Y | ++  | +   |
| 2305/2306 | L629C | +++ | ++  |
| 2307/2308 | T692I | +   | +   |
| 2311/2312 | S671A | +   |     |
| 2315/2316 | L569S | +   | +   |
| 2317/2318 | I573M | +   | +   |
| 2321/2322 | T692C | +++ | +++ |
| 2323/2324 | I573H | ++  | +   |
| 2325/2326 | S671T | +   |     |
| 2327/2328 | I573D | +++ | +   |
| 2331/2332 | R577D | +++ | ++  |
| 2333/2334 | L629A | ++  | +   |
| 2335/2336 | T692G | ++  | +   |
| 2339/2340 | R577A | +   | +   |
| 2343/2344 | T692F | ++  | ++  |
| 2345/2346 | R583G | +++ | +   |
| 2351/2352 | A572G | +++ | +   |
| 2353/2354 | A711W |     | ++  |
| 2355/2356 | L629G | +++ | ++  |
| 2357/2358 | I573C | +++ | +   |
| 2359/2360 | L569V |     | +   |
| 2361/2362 | L669R | +   |     |
| 2363/2364 | L579V | ++  | +   |
| 2365/2366 | A572S | +   |     |
| 2371/2372 | V580E | +++ | +   |
| 2373/2374 | A574S | +   | +   |
| 2375/2376 | V631I | +   | +   |
| 2377/2378 | A711H | +   | ++  |
| 2381/2382 | V580G | +++ | +   |
| 2383/2384 | V580W | ++  | +   |
| 2385/2386 | R577E | +++ | ++  |
| 2387/2388 | R583C | ++  | +   |
| 2391/2392 | S671G | +   |     |
| 2393/2394 | A711G | +   | ++  |

|           |       |     |     |
|-----------|-------|-----|-----|
| 2395/2396 | V631L | ++  | +   |
| 2397/2398 | L569T | ++  | +   |
| 2399/2400 | L569H | ++  | +   |
| 2401/2402 | L569Q | ++  | +   |
| 2403/2404 | V631M | +   | +   |
| 2407/2408 | T227A | +   | +   |
| 2415/2416 | L871E | +++ | +++ |
| 2417/2418 | V222C | ++  | ++  |
| 2421/2422 | V878G | +   | +   |
| 2425/2426 | K581H | +   | +   |
| 2431/2432 | V878A | +   |     |
| 2433/2434 | R873Y | +   |     |
| 2437/2438 | K581G | ++  | +   |
| 2439/2440 | V222P | +++ | ++  |
| 2443/2444 | T585Q | ++  | +   |
| 2447/2448 | A229C | +   | +   |
| 2461/2462 | V878K |     | +   |
| 2463/2464 | R873A | +   |     |
| 2467/2468 | K581T | +   |     |
| 2469/2470 | I869L | +   |     |
| 2473/2474 | V878S | +   | +   |
| 2477/2478 | V878Q | +   | +   |
| 2479/2480 | R873F | +   |     |
| 2485/2486 | I869S | +++ | ++  |
| 2487/2488 | V878W | +   | +   |
| 2489/2490 | H706F | +   |     |
| 2491/2492 | N225D | +   | ++  |
| 2493/2494 | L871K | +   | +   |

<sup>1</sup>Снижение TIS измеряют как снижение количества импульсов по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 1956, и определяют следующим образом: «+»=1-10; «++» >10; «+++» >20; и «++++» >50. Снижение ИНС измеряют как снижение количества импульсов по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 1956, и определяют следующим образом: «+»=1-3; «++» >3; «+++» >5; и «++++» >8.

**Таблица 17-7. Снижение общей оценки иммуногенности (TIS) и подсчет**

| <b>иммуногенных совпадений (ИНС) для вариантов ГАА относительно SEQ ID NO: 2496<sup>1</sup></b> |   |  |  |
|---|---|--|--|
| <b>SEQ ID NO:<br/>(нт/ак)</b>   | <b>Аминокислотные различия<br/>(относительно SEQ ID NO: 2496)</b> | <b>Снижение TIS<br/>(относительно SEQ ID NO: 2496)</b> | <b>Снижение ИНС<br/>(относительно SEQ ID NO: 2496)</b> |
| 2867/2868   | L569T/L628M/T692Y   | +++  | +++  |
| 2869/2870   | L569Y/L670T/A711H   | ++   | +++  |
| 2871/2872   | L569Y/L628M/L670T/T692Y/A711H/L871S                               | +++  | ++++   |
| 2873/2874   | V589I/L670T/Q795E/L871S   | +++  | ++   |
| 2875/2876   | L628M/L670F   | +  |  |
| 2877/2878   | L569H/L628M/L670T   | +++  | ++   |
| 2879/2880   | L569T/L670T/A711H/L871E   | ++++   | ++++   |
| 2881/2882   | L628M/L670T/T692G/A711H/Q795E                                     | +++  | ++++   |
| 2883/2884   | L569Y/L628M/L670T/A711H   | ++   | +++  |
| 2885/2886   | L569Y/V589I/L628M/T692G/A711H/Q795E                               | +++  | +++  |
| 2887/2888   | L569H/T692G   | +++  | +++  |
| 2889/2890   | L569Y/V589I/L670T/S678T/T692G/A711H/Q795E                         | +++  | ++++   |
| 2891/2892   | L569T/L871K   | ++   | ++   |
| 2893/2894   | L569Y/V589I/L628M/L670T/T692Y/A711H                               | +++  | ++++   |
| 2895/2896   | V589I/L871E   | +++  | +++  |
| 2897/2898   | L670T/S678T/T692Y/L871S   | +++  | +++  |
| 2899/2900   | L628M/A711H/Q795E   | +  | ++   |
| 2901/2902   | T692G/A711H   | +++  | +++  |
| 2903/2904   | V589I/L670T/T692G/Q795E/L871K                                     | +++  | +++  |
| 2905/2906   | L569Y/V589I/A711H/L871K   | ++   | ++   |
| 2907/2908   | L670T/T692G/L871K   | +++  | +++  |
| 2909/2910   | L569H/T692Y   | +++  | +++  |
| 2911/2912   | L569H/L628M/L670T/T692Y/A711H/L871K                               | +++  | ++++   |

|           | K   |      |      |
|-----------|---|------|------|
| 2913/2914 | L670T/S678T   | +    | +    |
| 2915/2916 | L569T/L670T/S678T/T692G/L871K                         | +++  | ++++ |
| 2917/2918 | V589I   | +    |      |
| 2919/2920 | L569H/V589I/L628M/L670T/S678T/T692G/A711H/Q795E/L871S | ++++ | ++++ |
| 2921/2922 | L569H/L670F/S678T/T692G/L871S                         | ++++ | +++  |
| 2923/2924 | L569T/V589I/L628M/L670F/T692G/A711H                   | ++++ | ++++ |
| 2925/2926 | L569H/L670T/T692G                                     | +++  | +++  |
| 2927/2928 | L569Y/L871E   | +++  | +++  |
| 2929/2930 | L569H/L628M/L670F/S678T                               | ++   | +    |
| 2931/2932 | L569Y/L670F/S678T                                     | +    |      |
| 2933/2934 | L569Y/V589I/L670F                                     | ++   |      |
| 2935/2936 | L569Y/V589I/L670T/L871K                               | ++   | +    |
| 2937/2938 | L569T/L871S   | +++  | ++   |
| 2939/2940 | L871K   | +    | +    |
| 2941/2942 | L569Y/L670T   | +    | +    |
| 2943/2944 | L569Y/T692Y/A711H                                     | ++   | +++  |
| 2945/2946 | L871S   | ++   | +    |
| 2947/2948 | L569Y/A711H   | +    | ++   |
| 2949/2950 | L628M/L871S   | ++   | +    |
| 2951/2952 | L569T/V589I/L871S                                     | +++  | ++   |
| 2953/2954 | T692G/A711H/I869L/V878S                               | +++  | +++  |
| 2955/2956 | A572S/F588L/S678T/T692G/I869L/V878A                   | +++  | ++   |
| 2957/2958 | A711H   | +    | ++   |
| 2959/2960 | T692G/I869S   | +++  | +++  |
| 2961/2962 | A572S/T692L/I869S/V878S                               | +++  | +++  |
| 2963/2964 | L629I/I869L/V878S                                     | ++   | +    |
| 2965/2966 | A572S/F588L/Q795E                                     | +++  | +    |
| 2967/2968 | A711H/I869S/V878S                                     | +++  | ++++ |
| 2969/2970 | V878S   | +    | +    |
| 2971/2972 | S678T/T692G/A711H/I869S                               | +++  | ++++ |
| 2973/2974 | A572S/T692G/I869S/V878S                               | ++++ | ++++ |



|           |   |      |      |
|-----------|---|------|------|
| 2975/2976 | A572S/T692G/V878S                             | +++  | ++   |
| 2977/2978 | A711H/Q795E/I869S/V878S                       | +++  | ++++ |
| 2979/2980 | Q795E/V878S                                   | +    | +    |
| 2981/2982 | T692G/A711H/Q795E/I869S                       | +++  | ++++ |
| 2983/2984 | S678T/T692G/Q795E/I869S                       | +++  | +++  |
| 2985/2986 | T692G/A711H/I869S/V878A                       | ++++ | ++++ |
| 2987/2988 | L569T/A711H                                   | ++   | +++  |
| 2989/2990 | L569T/L628M/S678T/A711H                       | ++   | +++  |
| 2991/2992 | L569T/V589I/T692G/Q795E/L871K/V878S           | +++  | +++  |
| 2993/2994 | L569T/V589I/S678T/L871K/V878S                 | +++  | ++   |
| 2995/2996 | L569H/A711H/I869S/V878S                       | ++++ | ++++ |
| 2997/2998 | S678T/Q795E/L871K/V878A                       | +    | +    |
| 2999/3000 | L569H/S678T/T692G/Q795E                       | +++  | +++  |
| 3001/3002 | F588L/V589I/L628M/S678T                       | +    |      |
| 3003/3004 | T692Y   | ++   | +    |
| 3005/3006 | L569T   | ++   | +    |
| 3007/3008 | T692G/L871K                                   | +++  | ++   |
| 3009/3010 | L569T/F588L/V878S                             | +++  | ++   |
| 3011/3012 | L569H/A711H/L871K                             | +++  | +++  |
| 3013/3014 | L569T/F588L/S678T/T692Y                       | +++  | +++  |
| 3015/3016 | L569T/F588L/A711H/I869L/L871K/V878S           | +++  | ++++ |
| 3017/3018 | L569T/F588L                                   | +++  | ++   |
| 3019/3020 | L569T/T692Y                                   | +++  | +++  |
| 3021/3022 | L569T/S678T/I869S/V878S                       | +++  | ++++ |
| 3023/3024 | L628M/L629I/T692Y/L871S/V878S                 | +++  | +++  |
| 3025/3026 | L569T/S678T/V878S                             | ++   | ++   |
| 3027/3028 | L569H/A711H/Q795E/L871S/V878S                 | +++  | ++++ |
| 3029/3030 | A711H/L871K                                   | +    | ++   |
| 3031/3032 | T692G/A711H/Q795E/I869L/L871K/V878<br>A       | +++  | +++  |
| 3033/3034 | L569T/F588L/V589I/L628M/L629I/T692Y/<br>A711H | +++  | ++++ |
| 3035/3036 | S678T/T692G/I869S                             | +++  | +++  |
| 3037/3038 | T692G/I869L/L871K/V878S/S916R                 | +++  | ++   |

|           |                                     |     |      |
|-----------|-------------------------------------|-----|------|
| 3039/3040 | L569H/L628M                         | ++  | +    |
| 3041/3042 | L628M/V878S                         | +   | +    |
| 3043/3044 | T692G/A711H/L871S/V878A             | +++ | ++++ |
| 3045/3046 | L569T/Q795E                         | ++  | +    |
| 3047/3048 | L569T/T692Y/A711H/I869L/L871K/V878A | +++ | ++++ |
| 3065/3066 | L810V                               | +   | ++   |
| 3049/3050 | S246T                               | ++  | +    |
| 3067/3068 | A60V/V589A                          | +++ | +    |
| 3051/3052 | T585K                               | +   | +    |
| 3069/3070 | S307T                               |     | +    |
| 3053/3054 | G584E                               | +   | +    |
| 3055/3056 | A812E                               | ++  | ++   |
| 3057/3058 | V313L                               | +   | +++  |
| 3059/3060 | L304M                               |     | +    |
| 3071/3072 | V313T                               | ++  | +++  |
| 3061/3062 | V313I                               | +   | ++   |
| 3073/3074 | G584C                               | +   | +    |
| 3063/3064 | A582T                               | +   | +    |

<sup>1</sup>Снижение TIS измеряют как снижение количества импульсов по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 2496, и определяют следующим образом: «+»=1-10; «++» >10; «+++» >20; и «++++» >50. Снижение ИНС измеряют как снижение количества импульсов по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 2496, и определяют следующим образом: «+»=1-3; «++» >3; «+++» >5; и «++++» >8.

**Таблица 17-8. Снижение общей оценки иммуногенности (TIS) и подсчет иммуногенных совпадений (ИНС) для вариантов ГАА относительно SEQ ID NO: 2880<sup>1</sup>**

| SEQ ID NO:<br>(нт/ак) | Аминокислотные различия<br>(относительно SEQ ID NO: 2880) | Снижение TIS<br>(относительно SEQ ID NO: 2880) | Снижение ИНС<br>(относительно SEQ ID NO: 2880) |
|-----------------------|---|--|--|
| 3075/3076             | R527N/L736M/A932S   | +  |  |
| 3107/3108             | A89R/L109D/A932S  | +  |  |

|           |   |     |     |
|-----------|---|-----|-----|
| 3109/3110 | L109D/S842G   | +   |     |
| 3123/3124 | L109D/A932S   | +   |     |
| 3127/3128 | R527N/W727S/L736M                                   | +   |     |
| 3141/3142 | L109D/L736M/A932S                                   | ++  |     |
| 3143/3144 | A89R/L109D/R527N/S678T/W727S/S842G                  | +   |     |
| 3181/3182 | V522E/K830Q   | +   |     |
| 3269/3270 | L62A/E87D/S150T                                     | +   |     |
| 3077/3078 | L109D/S678T/A812E                                   | ++  | ++  |
| 3081/3082 | R403H/R527N/S678T/T692G/L736M/A812<br>E/S842G/L860F | +++ | +++ |
| 3083/3084 | S678T/T692G/A812E                                   | +++ | +++ |
| 3087/3088 | A89R/R527N/W727S/A812E/L860F                        | ++  | ++  |
| 3089/3090 | A89R/S678T/T692G/L736M/A932S                        | +++ | +   |
| 3091/3092 | L109D/R527N/S678T/A812E                             | ++  | ++  |
| 3095/3096 | L109D/A812E   | ++  | ++  |
| 3097/3098 | T692G/W727S/L736M/S842G/R913V                       | +++ | +   |
| 3101/3102 | R527N/S678T/T692G/W727S/L736M/V878<br>S             | +++ | +   |
| 3103/3104 | R527N/T692G/W727S/L736M/A812E                       | +++ | +++ |
| 3113/3114 | A89R/L109D/S678T/W727S/L736M/A812<br>E/V878S        | ++  | ++  |
| 3115/3116 | L109D/T692G/W727S/A812E/S842G/L860<br>F             | +++ | +++ |
| 3117/3118 | T692G/A812E   | +++ | +++ |
| 3121/3122 | L109D/S678T/L736M/A812E/V878S                       | +++ | ++  |
| 3125/3126 | R527N/T692G/W727S/L736M/S842G/L860<br>F/V878S       | +++ | +   |
| 3133/3134 | R527N/S678T/T692G/A812E/A932S                       | +++ | +++ |
| 3135/3136 | A89R/S678T/A812E/V878S                              | +   | ++  |
| 3137/3138 | R527N/A812E   | ++  | ++  |
| 3139/3140 | S678T/T692G/W727S/A812E/S842G                       | +++ | +++ |
| 3149/3150 | L109D/S678T/T692G/S842G/L860F/V878S<br>/A932S       | ++  | +   |
| 3151/3152 | A89R/R527N/S678T/T692G/L736M/S842G                  | +++ | +   |

|  | /V878S/A932S  |  |     |
|--|---|--|-----|
| 3155/3156  | L109D/T692G/W727S/L736M/A812E                             | +++  | +++ |
| 3161/3162  | S678T/A812E   | ++   | ++  |
| <p><sup>1</sup>Снижение TIS измеряют как снижение количества импульсов по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 2880, и определяют следующим образом: «+»=1-10; «++» &gt;10; «+++» &gt;20; и «++++» &gt;50. Снижение ИНС измеряют как снижение количества импульсов по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 2880, и определяют следующим образом: «+»=1-3; «++» &gt;3; «+++» &gt;5; и «++++» &gt;8.</p> |   |  |     |
| <p><b>Таблица 17-9. Снижение общей оценки иммуногенности (TIS) и подсчет иммуногенных совпадений (ИНС) для вариантов GAA относительно SEQ ID NO: 3104<sup>1</sup></b></p>  |   |  |     |
| SEQ ID NO:<br>(нт/ак)  | Аминокислотные различия<br>(относительно SEQ ID NO: 3104) | Снижение TIS<br>(относительно SEQ ID NO: 3104) |     |
| 3313/3314  | L62A/A89D/K830Q   | +  |     |
| 3317/3318  | L62A/K830Q/A932S  | +  |     |
| 3361/3362  | L62A/K830Q/L860F/A932S                                    | +  |     |
| 3367/3368  | L62A/K830Q/L860F  | +  |     |
| 3375/3376  | L62A/K830Q  | +  |     |
| <p><sup>1</sup>Снижение TIS измеряют как снижение количества импульсов по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 3104, и определяют следующим образом: «+»=1-10.</p>  |   |  |     |

Несмотря на то, что изобретение было описано со ссылкой на конкретные варианты осуществления, могут быть внесены различные изменения и могут быть заменены эквивалентами для адаптации к конкретной ситуации, материалу, составу вещества, процессу, стадии или стадиям процесса, тем самым достигая преимуществ изобретения, не выходя за объем заявленного.

Для всех целей в Соединенных Штатах Америки каждая и любая публикация и патентный документ, цитируемые в этом описании, включены в настоящий документ посредством ссылки, как если бы каждая такая публикация или документ были конкретно и отдельно указаны для включения в настоящий документ посредством ссылки. Ссылки на публикации и патентные документы не предназначены для указания на то, что любой такой документ относится к известному уровню техники, а также не является признанием его содержания или даты.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза и/или биологически активный фрагмент рекомбинантной кислой альфа-глюкозидазы, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 93%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 946, 1956, 2496, 2880 и/или 3104.

2. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по п.1, отличающаяся тем, что указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит полипептидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2 или ее функциональным фрагментом, и где указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из 27, 27/944, 28, 29/478, 30, 88, 107, 109, 109/842, 110, 113, 135, 137, 138, 148, 150, 247, 274, 276, 278, 375, 403, 414, 418, 418/499, 421, 426, 437, 444, 455, 463, 471, 471/478, 476, 489, 527, 547, 581, 610, 642, 668, 670, 692, 725/732, 750, 753, 786, 820, 862, 871, 895, 897, 930, 934 и 944, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2.

3. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по п. 1, отличающаяся тем, что указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит полипептидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2 или ее функциональным фрагментом, и где указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из 29/218/240/668/700/744/869, 29/218/240/700/869, 29/240/596/668/700/744/869, 29/240/596/668/869, 36/106/150/218/527/750/883/894, 106/112/150/218/414/527/793/883, 106/150/169/218/414/486/527/750/894, 106/150/169/218/414/486/527/894, 106/150/169/218/414/486/749/793/883/894, 106/150/169/218/414/486/750/793/883/894, 106/150/169/218/414/486/793/883, 106/150/169/218/414/486/894, 106/150/169/218/414/749/750/793/883, 106/150/169/218/414/749/793, 106/150/169/218/414/749/793/883, 106/150/169/218/486/527/749/793/894, 106/150/169/218/486/749/883, 106/150/169/218/486/883, 106/150/169/218/749/800, 106/150/169/414/486/749/750/883, 106/150/169/527/749/793/883, 106/150/169/749/793/883/894, 106/150/218/331/414/486/527/733/749/793, 106/150/218/414/486/642/750/793/883, 106/150/218/414/486/750/793/894, 106/150/218/414/527/749/750/883, 106/150/218/414/527/749/793/883/894,

106/150/218/414/749/750/793/883/894, 106/150/218/414/749/793/883,  
 106/150/218/486/527/749/894, 106/150/218/486/793/883, 106/150/218/527/749/750/793,  
 106/150/218/527/793/894, 106/150/218/749/750/793, 106/150/218/793, 106/150/218/793/894,  
 106/150/245/793/883/894, 106/150/414/749/750/793/894, 106/150/414/749/793/894,  
 106/150/486/527/750/793, 106/150/486/749/793/883/894, 106/150/749/793/883,  
 106/169/185/218/414/749/750/793, 106/191/280/402/414/444/727,  
 106/191/414/444/522/928/944, 106/191/414/489/928/944, 106/280/402/414/444/489/727/944,  
 150/169/218/414/527/793, 150/218/414/486/749/750, 150/218/414/486/750/793,  
 150/218/414/486/750/793/883, 150/218/414/749/750/793/894, 150/218/414/749/793,  
 150/218/527/749/793, 150/218/749/750/793, 150/218/749/793, 150/414/486/527/750/894,  
 150/414/486/749/750/793, 150/486/750/883/894, 169/486/750/793/883,  
 180/275/402/518/547/610/638/669/671, 180/402/431/507/547/610/669/671/793,  
 180/402/507/547/610/671, 191/280/402/414/444/465/842/928,  
 191/280/402/414/444/489/500/944, 191/280/414/444/489/500/522/842/928/944,  
 191/280/414/444/489/522/727/944, 191/280/414/489/842/928/944, 191/280/414/944,  
 191/414/522/842/944, 196/402/431/547/610/638, 218/668/700/869,  
 224/402/507/518/547/638/668, 269/275/431/518/547/638/668/669,  
 275/281/402/431/507/518/610/668, 275/281/402/431/518/547/610/669/671,  
 275/281/402/507/518/547/638/669/671, 275/281/402/518/547/610/638/671,  
 275/281/402/518/547/610/668/669/887, 275/281/402/547/610/638/669/671,  
 275/281/431/518/547/638/669/671, 275/281/507/547/669/671, 275/281/610/638/668/669,  
 275/281/671, 275/377/402/507/518/669/671/715, 275/402/431/507/547/671,  
 275/402/431/518/610/638/669/671/922, 275/402/507/547/610/638/668/669,  
 275/402/507/547/610/638/669/671, 275/402/507/547/610/671, 275/402/547/610/638/669/671,  
 275/402/547/638/669/671, 275/402/638/669/671, 275/431/507/518/547/668/669/671,  
 275/431/507/518/610/669/671, 275/431/507/547/610/638/671, 275/431/518/547/638/668,  
 275/431/518/610/638/669/671, 275/431/638, 275/507/518/547/610/638/668/669,  
 275/507/518/547/638/669/671, 275/507/547/610/638/669/671, 275/507/547/668/669/671,  
 275/518/671, 280/402/536/928, 281/402/507/518/547/610/638/669/671,  
 281/402/507/547/638/669/671, 281/402/518/547/610/638/668/669, 281/402/518/547/668,  
 281/431/507/518/547/610/638/668, 402/431/518/547/610/668, 402/431/518/547/671,  
 402/431/518/610, 402/431/547/638/671, 431/507/518/541/547/638/669/671,  
 431/507/518/669/671, 507/547/610, 507/547/638/669/671, 547/610/638/671 и 547/638/668, где  
 аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2.

4. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по п. 1, отличающаяся тем, что указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит полипептидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2 или ее функциональным фрагментом, и где указанная рекомбинантная

кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в  
 одном или нескольких положениях, выбранных из 27, 27/944, 28,  
 29/218/240/668/700/744/869, 29/218/240/700/869, 29/240/596/668/700/744/869,  
 29/240/596/668/869, 29/478, 30, 36/106/150/218/527/750/883/894,  
 106/112/150/218/414/527/793/883, 106/150/169/218/414/486/527/750/894,  
 106/150/169/218/414/486/527/894, 106/150/169/218/414/486/749/793/883/894,  
 106/150/169/218/414/486/750/793/883/894, 106/150/169/218/414/486/793/883,  
 106/150/169/218/414/486/894, 106/150/169/218/414/749/750/793/883,  
 106/150/169/218/414/749/793, 106/150/169/218/414/749/793/883,  
 106/150/169/218/486/749/883, 106/150/169/218/486/883, 106/150/169/414/486/749/750/883,  
 106/150/169/527/749/793/883, 106/150/169/749/793/883/894,  
 106/150/218/331/414/486/527/733/749/793, 106/150/218/414/486/642/750/793/883,  
 106/150/218/414/486/750/793/894, 106/150/218/414/527/749/750/883,  
 106/150/218/414/527/749/793/883/894, 106/150/218/414/749/750/793/883/894,  
 106/150/218/414/749/793/883, 106/150/218/486/527/749/894, 106/150/218/486/793/883,  
 106/150/218/527/793/894, 106/150/245/793/883/894, 106/150/414/749/750/793/894,  
 106/150/414/749/793/894, 106/150/486/527/750/793, 106/150/486/749/793/883/894,  
 106/150/749/793/883, 106/169/185/218/414/749/750/793, 106/191/280/402/414/444/727,  
 106/280/402/414/444/489/727/944, 107, 109, 109/842, 110, 135, 138, 148, 150,  
 150/218/414/486/749/750, 150/218/414/486/750/793, 150/218/414/486/750/793/883,  
 150/218/414/749/750/793/894, 150/218/414/749/793, 150/414/486/527/750/894,  
 150/414/486/749/750/793, 150/486/750/883/894, 169/486/750/793/883,  
 180/275/402/518/547/610/638/669/671, 180/402/431/507/547/610/669/671/793,  
 180/402/507/547/610/671, 191/280/402/414/444/489/500/944,  
 191/280/414/444/489/522/727/944, 191/280/414/944, 191/414/522/842/944,  
 196/402/431/547/610/638, 218/668/700/869, 224/402/507/518/547/638/668,  
 269/275/431/518/547/638/668/669, 274, 275/281/402/431/507/518/610/668,  
 275/281/402/431/518/547/610/669/671, 275/281/402/507/518/547/638/669/671,  
 275/281/402/518/547/610/638/671, 275/281/402/518/547/610/668/669/887,  
 275/281/402/547/610/638/669/671, 275/281/431/518/547/638/669/671,  
 275/281/507/547/669/671, 275/281/610/638/668/669, 275/377/402/507/518/669/671/715,  
 275/402/431/507/547/671, 275/402/431/518/610/638/669/671/922,  
 275/402/507/547/610/638/668/669, 275/402/507/547/610/638/669/671,  
 275/402/507/547/610/671, 275/402/547/610/638/669/671, 275/402/547/638/669/671,  
 275/402/638/669/671, 275/431/507/518/547/668/669/671, 275/431/507/518/610/669/671,  
 275/431/507/547/610/638/671, 275/431/518/547/638/668, 275/431/518/610/638/669/671,  
 275/431/638, 275/507/518/547/610/638/668/669, 275/507/518/547/638/669/671,  
 275/507/547/610/638/669/671, 275/507/547/668/669/671, 276,  
 281/402/507/518/547/610/638/669/671, 281/402/507/547/638/669/671,  
 281/402/518/547/610/638/668/669, 281/402/518/547/668, 281/431/507/518/547/610/638/668,

375, 402/431/518/547/610/668, 402/431/518/547/671, 402/431/518/610, 402/431/547/638/671, 403, 414, 418/499, 431/507/518/541/547/638/669/671, 431/507/518/669/671, 437, 471/478, 507/547/610, 507/547/638/669/671, 547, 547/610/638/671, 547/638/668, 581, 642, 670, 692, 750, 753, 820, 871 и 944, где аминокислота положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2.

5. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по п.1, отличающаяся тем, что указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит полипептидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6 или ее функциональным фрагментом, и где указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из 27, 27/944, 28, 29/218/240/668/700/744/869, 29/218/240/700/869, 29/240/596/668/700/744/869, 29/240/596/668/869, 29/478, 30, 36/106/150/218/527/750/883/894, 88, 106/112/150/218/414/527/793/883, 106/150/169/218/414/486/527/750/894, 106/150/169/218/414/486/527/894, 106/150/169/218/414/486/749/793/883/894, 106/150/169/218/414/486/750/793/883/894, 106/150/169/218/414/486/793/883, 106/150/169/218/414/486/894, 106/150/169/218/414/749/750/793/883, 106/150/169/218/414/749/793, 106/150/169/218/414/749/793/883, 106/150/169/218/486/527/749/793/894, 106/150/169/218/486/749/883, 106/150/169/218/486/883, 106/150/169/218/749/800, 106/150/169/414/486/749/750/883, 106/150/169/527/749/793/883, 106/150/169/749/793/883/894, 106/150/218/331/414/486/527/733/749/793, 106/150/218/414/486/642/750/793/883, 106/150/218/414/486/750/793/894, 106/150/218/414/527/749/750/883, 106/150/218/414/527/749/793/883/894, 106/150/218/414/749/793/883, 106/150/218/486/527/749/894, 106/150/218/486/793/883, 106/150/218/527/749/750/793, 106/150/218/527/793/894, 106/150/218/749/750/793, 106/150/218/793, 106/150/218/793/894, 106/150/245/793/883/894, 106/150/414/749/750/793/894, 106/150/414/749/793/894, 106/150/486/527/750/793, 106/150/486/749/793/883/894, 106/150/749/793/883, 106/169/185/218/414/749/750/793, 106/191/280/402/414/444/727, 106/191/414/444/522/928/944, 106/191/414/489/928/944, 106/280/402/414/444/489/727/944, 107, 109, 109/842, 110, 113, 135, 137, 138, 148, 150, 150/169/218/414/527/793, 150/218/414/486/749/750, 150/218/414/486/750/793, 150/218/414/486/750/793/883, 150/218/414/749/750/793/894, 150/218/414/749/793, 150/218/527/749/793, 150/218/749/750/793, 150/218/749/793, 150/414/486/527/750/894, 150/414/486/749/750/793, 150/486/750/883/894, 169/486/750/793/883, 180/275/402/518/547/610/638/669/671, 180/402/431/507/547/610/669/671/793, 180/402/507/547/610/671, 191/280/402/414/444/465/842/928, 191/280/402/414/444/489/500/944, 191/280/414/444/489/500/522/842/928/944, 191/280/414/444/489/522/727/944, 191/280/414/489/842/928/944, 191/280/414/944,



191/414/522/842/944, 196/402/431/547/610/638, 218/668/700/869,  
 224/402/507/518/547/638/668, 247, 269/275/431/518/547/638/668/669, 274,  
 275/281/402/431/507/518/610/668, 275/281/402/431/518/547/610/669/671,  
 275/281/402/507/518/547/638/669/671, 275/281/402/518/547/610/638/671,  
 275/281/402/518/547/610/668/669/887, 275/281/402/547/610/638/669/671,  
 275/281/431/518/547/638/669/671, 275/281/507/547/669/671, 275/281/610/638/668/669,  
 275/281/671, 275/377/402/507/518/669/671/715, 275/402/431/507/547/671,  
 275/402/431/518/610/638/669/671/922, 275/402/507/547/610/638/668/669,  
 275/402/507/547/610/638/669/671, 275/402/507/547/610/671, 275/402/547/610/638/669/671,  
 275/402/547/638/669/671, 275/402/638/669/671, 275/431/507/518/547/668/669/671,  
 275/431/507/518/610/669/671, 275/431/507/547/610/638/671, 275/431/518/547/638/668,  
 275/431/518/610/638/669/671, 275/431/638, 275/507/518/547/610/638/668/669,  
 275/507/518/547/638/669/671, 275/507/547/610/638/669/671, 275/507/547/668/669/671,  
 275/518/671, 276, 278, 280/402/536/928, 281/402/507/518/547/610/638/669/671,  
 281/402/507/547/638/669/671, 281/402/518/547/610/638/668/669, 281/402/518/547/668,  
 281/431/507/518/547/610/638/668, 375, 402/431/518/547/610/668, 402/431/518/547/671,  
 402/431/518/610, 402/431/547/638/671, 403, 414, 418, 418/499, 421, 426,  
 431/507/518/541/547/638/669/671, 431/507/518/669/671, 437, 444, 455, 463, 471, 471/478,  
 476, 489, 507/547/610, 507/547/638/669/671, 527, 547, 547/610/638/671, 547/638/668, 581,  
 610, 642, 668, 670, 692, 725/732, 750, 753, 786, 820, 862, 871, 895, 897, 934 и 944, где  
 аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности  
 пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 6.

6. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по п.1, отличающаяся тем, что  
 указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит полипептидную  
 последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%,  
 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с  
 SEQ ID NO: 8 или ее функциональным фрагментом, и где указанная рекомбинантная  
 кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в  
 одном или нескольких положениях, выбранных из 4, 27, 27/28/489, 27/418/478, 28, 28/29,  
 28/29/113/135/138, 28/29/113/135/418, 28/29/135, 28/29/418, 29/113/126/135/193, 29/113/135,  
 29/113/135/455, 29/113/138, 29/148, 29/478, 106, 106/138/218/431/671/749, 106/218/281,  
 106/218/455, 106/218/455/507/749, 106/489/671, 106/638, 106/671/934, 113, 113/135/418,  
 113/418/455/478/581, 113/418/478/489/581, 135, 135/148/150/418, 135/478/489/581, 135/489,  
 135/944, 138/218/668/671, 138/218/749/934, 138/671/749/934, 157, 218, 218/281, 218/281/431,  
 218/281/671, 218/431, 218/431/489/507/749/934, 218/455, 218/507/749, 218/507/934,  
 218/638/671, 218/749, 281/431/489/668, 345/934, 418, 418/489, 431/668/671, 489/638/934,  
 489/671/934, 489/749, 489/934, 507/668, 507/671/934, 671/749, 671/934 и 749/784, где  
 аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности  
 пронумерованы со ссылкой до SEQ ID NO: 8.

7. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по п.1, отличающаяся тем, что

указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит полипептидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 8 или ее функциональным фрагментом, и где указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из 27, 27/418/478, 28, 28/29, 28/29/113/135/138, 28/29/113/135/418, 28/29/135, 28/29/418, 29/113/126/135/193, 29/113/135, 29/113/135/455, 29/113/138, 29/148, 29/478, 106, 106/138/218/431/671/749, 106/489/671, 106/638, 113/135/418, 113/418/455/478/581, 113/418/478/489/581, 135, 135/148/150/418, 135/478/489/581, 135/944, 138/218/668/671, 157, 218/638/671, 418, 418/489, 431/668/671, 507/668 и 671/749, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 8.

8. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по п.1, отличающаяся тем, что указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит полипептидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 12 или ее функциональным фрагментом, и где указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из 4, 27, 27/28/489, 27/418/478, 28, 28/29, 28/29/113/135/138, 28/29/113/135/418, 28/29/135, 28/29/418, 29/113/126/135/193, 29/113/135, 29/113/135/455, 29/113/138, 29/148, 29/478, 106, 106/138/218/431/671/749, 106/218/281, 106/218/455, 106/218/455/507/749, 106/489/671, 106/638, 106/671/934, 113, 113/135/418, 113/418/455/478/581, 113/418/478/489/581, 135, 135/148/150/418, 135/478/489/581, 135/489, 135/944, 138/218/668/671, 138/218/749/934, 138/671/749/934, 157, 218, 218/281/431, 218/281/671, 218/431, 218/455, 218/507/749, 218/638/671, 218/749, 281/431/489/668, 345/934, 418, 418/489, 431/668/671, 489/638/934, 489/671/934, 489/749, 489/934, 507/668, 507/671/934, 671/749, 671/934 и 749/784, где аминокислотные положения в указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 12.

9. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по п.1, отличающаяся тем, что указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит полипептидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 14 или ее функциональным фрагментом, и где указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из 22, 24, 27, 27/165, 30, 33, 34, 37/62, 37/62/79/196/696/862, 37/62/523, 37/62/523/793, 37/64/66/79/154/523/681/793/862, 37/79/154/793, 37/196, 37/528/696/793, 37/528/790, 37/528/790/793/862, 37/790/793, 39, 39/58/489/725/830/842/930/944, 39/70/109/830/842, 39/70/489/612, 39/70/725, 39/267, 39/267/489/522/612/830/842, 39/267/489/830/944, 39/489/500/612, 39/500/612, 40, 44/157, 47, 49, 50, 55, 60/500/612, 62/79/154/862, 62/79/196/681/862, 62/79/523/528/790, 62/79/790/793,

62/79/862, 62/92, 62/92/790/793, 62/106/523/528/696/793/862, 62/154/696/793/862, 62/793/862, 68, 70, 70/267/725/944, 70/267/930/944, 70/489/930, 70/725/830/860/930/944, 77, 79/154/681, 79/154/793/862, 79/862, 89, 97, 106/154, 107, 109, 109/522/612/725, 109/522/830/944, 109/612, 118, 149, 157, 158, 178, 179, 196/528/681/790/793, 207, 208, 217, 267/489/500/725/830/930, 267/522/725, 352, 385, 424, 448, 463, 489/830/944, 500, 500/612/830/860, 500/860/930, 500/930/944, 522/725, 523, 523/790/793, 528/681, 528/793, 528/862, 672, 673, 725, 734, 740, 753, 774, 778, 793, 830, 844, 862, 875, 880, 892, 902, 922, 925, 930, 932, 934, 938 и 944, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 14.

10. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по п.1, отличающаяся тем, что указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит полипептидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 18 или ее функциональным фрагментом, и где указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из 22, 24, 27, 27/165, 30, 33, 34, 37/62, 37/62/79/196/696/862, 37/62/523, 37/196, 37/528/790, 39, 39/70/109/830/842, 39/70/725, 39/267, 39/267/489/522/612/830/842, 39/267/489/830/944, 40, 70/267/725/944, 70/267/930/944, 70/489/930, 107, 109, 109/522/830/944, 217, 267/489/500/725/830/930, 267/522/725, 352, 385, 500/930/944, 673, 734, 774, 778, 875, 930, 932 и 934, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 18.

11. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по п.1, отличающаяся тем, что указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 20 или ее функциональным фрагментом, и где указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из 22/24, 22/24/27/50/107/109/489/612/725, 22/24/27/489, 22/24/27/489/612/774, 22/24/27/612/944, 22/24/50/109/267/489/774/944, 22/24/50/267/612/922/944, 22/24/107/267/489/922, 22/24/489, 22/24/612/725/944, 22/50/107/267/489/612/944, 22/50/109/267/489, 22/267/489/612, 24, 24/27/50/107/267/774/944, 24/27/89/500/842, 24/27/107/267/612/944, 24/27/267/944, 24/27/500/842, 24/27/500/842/932, 24/27/944, 24/39/49/89/97/842/932, 24/39/68/89/107/500/842, 24/39/89/97/842/932, 24/39/842/932, 24/50/489/944, 24/50/612, 24/70/107/109/489/612/725, 24/70/267/774, 24/89/500, 24/107/109/267/489/612/725/774, 24/109/612, 24/109/944, 24/267/725/944, 24/489/944, 24/725, 24/842/932, 24/944, 27/39/49/97/500/842, 27/49/68/500/842, 34/39/500/932, 39/89/97/500, 42, 48, 50/109/489/612, 50/489/774, 50/612/944, 57, 62, 68, 68/89/97/932, 71, 88, 89/97/107, 89/97/500, 89/842, 107/109, 107/500/842, 108, 109/612/774/944, 112, 123, 124, 148, 188, 193, 197, 204, 253, 264,

305, 312, 333, 381, 402, 402/781, 489, 489/944, 500/842, 500/932, 523, 527, 612, 612/725/944, 612/922, 614, 727, 742, 748, 820, 823, 832, 842/932, 858, 862, 911, 913, 914, 916, 923, 937 и 940, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 20.

12. Рекombинантная кислая альфа-глюкозидаза по п.1, отличающаяся тем, что указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 20 или ее функциональным фрагментом, и где указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из 22/24, 22/24/27/50/107/109/489/612/725, 22/24/27/489, 22/24/27/489/612/774, 22/24/27/612/944, 22/24/50/109/267/489/774/944, 22/24/50/267/612/922/944, 22/24/107/267/489/922, 22/24/489, 22/24/612/725/944, 22/50/107/267/489/612/944, 22/50/109/267/489, 22/267/489/612, 24, 24/27/50/107/267/774/944, 24/27/89/500/842, 24/27/107/267/612/944, 24/27/267/944, 24/27/500/842, 24/27/500/842/932, 24/27/944, 24/39/49/89/97/842/932, 24/39/68/89/107/500/842, 24/39/89/97/842/932, 24/39/842/932, 24/50/489/944, 24/50/612, 24/70/107/109/489/612/725, 24/70/267/774, 24/89/500, 24/107/109/267/489/612/725/774, 24/109/612, 24/109/944, 24/267/725/944, 24/489/944, 24/725, 24/842/932, 24/944, 27/39/49/97/500/842, 27/49/68/500/842, 34/39/500/932, 50/109/489/612, 50/612/944, 68/89/97/932, 89/97/107, 89/842, 106, 107/109, 107/500/842, 108, 109/612/774/944, 112, 148, 148/772, 188/377, 238, 240, 240/374, 243, 244, 246, 248, 249/777, 252, 253, 259, 260, 261, 262, 264, 279, 305, 309, 312, 319, 320, 329, 333, 387, 402, 421, 432, 500/842, 500/932, 556, 612, 612/725/944, 612/922, 727, 736, 737, 741, 742, 748, 815, 816, 818, 823, 832, 842/932, 911, 913, 914, 916, 923, 937 и 940, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 20.

13. Рекombинантная кислая альфа-глюкозидаза по п.1, отличающаяся тем, что указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит полипептидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 20 или ее функциональным фрагментом, и где указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из 29, 42, 45, 48, 57, 61, 62, 63, 71, 88, 91, 106, 108, 112, 123, 124, 127/914, 148, 148/772, 154, 186, 188, 188/377, 193, 195, 197, 204, 205, 237, 238, 240, 240/374, 243, 244, 246, 248, 249, 249/777, 251, 252, 253, 255, 259, 260, 261, 262, 264, 279, 298/421, 305, 309, 312, 319, 320, 323, 325, 329, 333, 381, 387, 402, 421, 432, 445, 455, 523, 527, 556, 614, 682, 727, 736, 737, 741, 748, 815, 816, 818, 820, 823, 832, 858, 862, 911, 913, 914, 916, 937 и 940, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой является следствием SEQ ID NO: 20.

14. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по п.1, отличающаяся тем, что указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит полипептидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 946 или ее функциональным фрагментом, и где указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из 19/124/149/381/727, 24/39/489/862, 24/57/62/89/489/823/862, 24/57/823/862, 24/62/89/188/823/842/862, 24/89/489, 24/89/489/727/862, 24/489/500/842, 39/57/62/188/500/842, 39/57/500/862, 57, 57/62/120/527/913/916, 57/62/305/437/500/614/727/916, 57/62/305/437/500/727/913/916, 57/62/305/437/614/683/913/916/932, 57/62/305/489/907/913/916, 57/62/305/489/913/916, 57/62/305/500/913/916, 57/62/305/913, 57/62/305/916, 57/62/437/500/761/914/916, 57/62/437/527/727, 57/62/437/913/916, 57/62/913/916/932, 57/62/916, 57/188/489/823/862, 57/305, 57/305/437/916, 57/437/500/527/727/916, 57/437/500/614/727/914, 57/437/913/914, 57/489/527/914/916, 57/614/916/932, 62/89, 62/89/124/148/381/858, 62/89/124/381/858, 62/89/148/381/614/858, 62/89/148/923, 62/89/149/381, 62/89/149/381/832, 62/89/188/489/500/727/823, 62/89/381, 62/89/381/858, 62/89/381/923, 62/89/858, 62/96/614, 62/124/148/149/381/614, 62/124/149/381/832/858/937, 62/124/188/823/842/862, 62/124/381/832, 62/148/149/381/858/937, 62/148/381/614/937, 62/148/381/727, 62/148/381/858, 62/149/381/614/937, 62/149/381/858/937, 62/149/727, 62/305/437/500/727/913, 62/305/727, 62/381, 62/437/489/527/727/913/932, 62/437/489/614/727/913, 62/437/527/727, 62/437/527/916/932, 62/437/913/916, 62/489/500/932, 62/489/527/916/932, 62/489/614/916, 62/500, 62/527, 62/527/727/916, 62/614, 62/727, 62/916, 89/148/149, 89/148/149/381, 89/381, 124/148/381/727/858/937, 124/381/614, 124/500/842/862, 124/832/937, 148/832/858/937, 381, 381/614/832, 381/858/937, 437, 437/489/914/916, 437/727/914, 437/914/916, 489/500, 489/614/916, 500/727/913/916, 500/914/916 и 923, где аминокислотные положения в указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 946.

15. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по п.1, отличающаяся тем, что указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит полипептидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 946 или ее функциональным фрагментом, и где указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из 57/62/120/527/913/916, 57/62/305/437/500/614/727/916, 57/62/305/437/500/727/913/916, 57/62/305/437/614/683/913/916/932, 57/62/305/489/907/913/916, 57/62/305/489/913/916, 57/62/305/500/913/916, 57/62/305/913, 57/62/305/916, 57/62/437/500/761/914/916, 57/62/437/527/727, 57/62/437/913/916, 57/62/913/916/932, 57/62/916, 57/188/489/823/862, 57/305, 57/305/437/916, 57/437/500/527/727/916, 57/437/500/614/727/914, 57/437/913/914,

57/489/527/914/916, 57/614/916/932, 62/89/188/489/500/727/823, 62/124/188/823/842/862, 62/305/437/500/727/913, 62/305/727, 62/437/489/527/727/913/932, 62/437/489/614/727/913, 62/437/527/727, 62/437/527/916/932, 62/437/913/916, 62/489/500/932, 62/489/527/916/932, 62/527/727/916, 62/727, 62/916, 124/500/842/862, 437, 437/489/914/916, 437/727/914, 437/914/916, 489/614/916, 500/727/913/916, 500/914/916 и 923, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 946.

16. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по п.1, отличающаяся тем, что указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит полипептидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1956 или ее функциональным фрагментом, и где указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из 3/569, 41/53, 44, 44/347, 56, 65, 78, 78/87/176/266/536/615, 78/87/266, 78/87/266/372/386/777, 78/87/266/372/536, 78/87/266/483/924, 78/87/483/777, 78/87/536, 78/266/483/536/615, 78/266/483/795, 78/266/763, 78/372/390, 78/390, 78/536/615, 87, 87/266, 87/266/372/483, 87/266/483, 87/266/924, 87/372/777, 87/536/777, 87/615, 87/795, 105, 136, 141, 145, 154/588, 156, 157, 199, 202, 222, 225, 227, 229, 266, 266/372/536/615/763/777, 266/372/924, 266/536/615/795, 344, 348, 390/615, 412, 423, 425/678/894, 430, 446, 484, 488, 496, 499/711, 503, 530, 543, 569, 572, 573, 574, 577, 578, 579, 580, 581, 583, 585, 588, 589/663, 615, 628, 629, 631, 633, 656, 663, 669, 670, 671, 678, 679, 687, 690, 691, 692, 693, 705, 706, 708, 709, 710, 711, 726, 768, 773, 777, 779, 795, 797, 816, 826, 834, 857, 859, 868, 869, 871, 873, 877, 878 и 909, где аминокислотные положения в указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 1956.

17. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по п.1, отличающаяся тем, что указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит полипептидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1956 или ее функциональным фрагментом, и где указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из 44, 53, 56, 63, 65, 105, 125, 129, 136, 139, 141, 142, 145, 152, 156, 162, 176, 177, 185, 186, 187, 199, 199/775, 202, 265, 267, 337, 344, 348, 350, 354, 372, 373, 401, 412, 446, 469, 484, 488, 493, 496, 499, 503, 526, 543, 612, 615, 649, 677, 678, 679, 730, 752, 765, 768, 773, 777, 779, 788, 797, 822, 826, 834, 855, 856, 857, 859, 860, 924, 926, 931 и 936, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 1956.

18. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по п.1, отличающаяся тем, что указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит полипептидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%,

92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1956 или ее функциональным фрагментом, и где указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из 78/87/176/266/536/615, 78/87/266/372/386/777, 78/87/266/372/536, 78/266/763, 78/372/390, 87/266/372/483, 87/372/777, 105, 125, 129, 136, 139, 141, 142, 152, 154/588, 156, 222, 225, 227, 229, 266/372/536/615/763/777, 266/372/924, 267, 372, 401, 493, 496, 499, 569, 572, 573, 574, 577, 579, 580, 581, 583, 585, 588, 589/663, 628, 629, 631, 663, 669, 670, 671, 691, 692, 693, 706, 708, 710, 711, 765, 768, 779, 797, 826, 834, 855, 856, 857, 869, 871, 873, 878, 909, 924 и 926, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности являются нулевыми. объединен со ссылкой на SEQ ID NO: 1956.

19. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по п.1, отличающаяся тем, что указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит полипептидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2496 или ее функциональным фрагментом, и где указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из 246, 304, 313, 569, 569/588, 569/588/589/628/629/692/711, 569/588/678/692, 569/588/711/869/871/878, 569/588/878, 569/589/628/670/678/692/711/795/871, 569/589/628/670/692/711, 569/589/628/692/711/795, 569/589/670, 569/589/670/678/692/711/795, 569/589/670/871, 569/589/678/871/878, 569/589/692/795/871/878, 569/589/711/871, 569/589/871, 569/628, 569/628/670, 569/628/670/678, 569/628/670/692/711/871, 569/628/670/711, 569/628/678/711, 569/628/692, 569/670, 569/670/678, 569/670/678/692/871, 569/670/692, 569/670/711, 569/670/711/871, 569/678/692/795, 569/678/869/878, 569/678/878, 569/692, 569/692/711, 569/692/711/869/871/878, 569/711, 569/711/795/871/878, 569/711/869/878, 569/711/871, 569/795, 569/871, 572/588/678/692/869/878, 572/588/795, 572/692/869/878, 572/692/878, 582, 584, 585, 588/589/628/678, 589, 589/670/692/795/871, 589/670/795/871, 589/871, 628/629/692/871/878, 628/670, 628/670/692/711/795, 628/711/795, 628/871, 628/878, 629/869/878, 670/678, 670/678/692/871, 670/692/871, 678/692/711/869, 678/692/795/869, 678/692/869, 678/795/871/878, 692, 692/711, 692/711/795/869, 692/711/795/869/871/878, 692/711/869/878, 692/711/871/878, 692/869, 692/869/871/878/916, 692/871, 711, 711/795/869/878, 711/869/878, 711/871, 795/878, 812, 871 и 878, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2496.

20. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по п.1, отличающаяся тем, что указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2496 или ее функциональным фрагментом, и где указанная рекомбинантная

кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или замену установлен в одном или нескольких положениях, выбранных из 60/589, 307, 313, 584 и 810, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2496.

21. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по п.1, отличающаяся тем, что указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит полипептидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2496 или ее функциональным фрагментом, и где указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из 60/589, 246, 304, 307, 313, 569, 569/588, 569/588/589/628/629/692/711, 569/588/678/692, 569/588/711/869/871/878, 569/588/878, 569/589/628/670/678/692/711/795/871, 569/589/628/670/692/711, 569/589/628/692/711/795, 569/589/670, 569/589/670/678/692/711/795, 569/589/670/871, 569/589/678/871/878, 569/589/692/795/871/878, 569/589/711/871, 569/589/871, 569/628, 569/628/670, 569/628/670/678, 569/628/670/692/711/871, 569/628/670/711, 569/628/678/711, 569/628/692, 569/670, 569/670/678, 569/670/678/692/871, 569/670/692, 569/670/711, 569/670/711/871, 569/678/692/795, 569/678/869/878, 569/678/878, 569/692, 569/692/711, 569/692/711/869/871/878, 569/711, 569/711/795/871/878, 569/711/869/878, 569/711/871, 569/795, 569/871, 572/588/678/692/869/878, 572/588/795, 572/692/869/878, 572/692/878, 582, 584, 585, 588/589/628/678, 589, 589/670/692/795/871, 589/670/795/871, 589/871, 628/629/692/871/878, 628/670, 628/670/692/711/795, 628/711/795, 628/871, 628/878, 629/869/878, 670/678, 670/678/692/871, 670/692/871, 678/692/711/869, 678/692/795/869, 678/692/869, 678/795/871/878, 692, 692/711, 692/711/795/869, 692/711/795/869/871/878, 692/711/869/878, 692/711/871/878, 692/869, 692/869/871/878/916, 692/871, 711, 711/795/869/878, 711/869/878, 711/871, 795/878, 810, 812, 871 и 878, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2496.

22. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по п.1, отличающаяся тем, что указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит полипептидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2880 или ее функциональным фрагментом, и где указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в одном или нескольких положениях, выбранных из 24/28/29/39/50/62/78/87/135/150/266/267/522/527/551/670/727/750/830/842/871/883/894/932, 24/28/39/50/62/78/87/135/150/266/267/522/527/551/569/727/830/842/871/883/894/913, 24/28/50/135/150/437/522/527/871/883/894/932, 24/28/62/522/569/932, 24/28/437/486/527, 24/29/39/50/62/78/87/135/150/267/437/486/522/527/551/711/727/750/830/842/871/883/894/913/932, 24/50/78/87/135/150/267/486/522/527/551/670/727/750/830/842/871/883/894/913/932,



24/50/486/527/711/727, 24/62/87/486/727, 24/62/727/830/932,  
 24/87/135/522/670/711/830/842/913, 24/150/522/527/727/883/894,  
 24/527/727/842/871/883/913/932, 24/670/727/750/842/871, 28,  
 28/50/78/87/135/266/267/437/486/527/551/670/727/750/830/842/871/883/894/913/932,  
 28/50/522/527/711/727/871, 28/62, 28/62/267/932, 28/437/527/871,  
 28/522/527/569/711/830/894, 28/727, 28/727/871,  
 29/39/50/62/65/78/87/135/150/437/551/569/670/727/750/830/842/883/894/932, 29/62/437/527,  
 29/78/87/150/527/727, 29/78/135/727/830, 29/87, 29/135/150/527/670/727/883,  
 29/150/267/727/750/871/883/932, 29/150/437/727, 29/522/670/711/871, 29/670/932, 39/50,  
 39/727/750/932, 50/135/150/932, 50/437/522/527, 50/711, 50/727/750/883/894, 62, 62/87/150,  
 62/87/150/727, 62/135/522/711/727/750/842/871/894, 62/437, 62/437/727,  
 78/87/486/527/670/727/750/830/842/871/913/932, 87/750, 89/109/527/678/727/842,  
 89/109/678/727/736/812/878, 89/109/727/932, 89/109/932, 89/527,  
 89/527/678/692/736/842/878/932, 89/527/678/932, 89/527/727/812/860, 89/678/692/736/932,  
 89/678/812/878, 89/842/878, 109/527/678/812, 109/678/692/842/860/878/932, 109/678/727/860,  
 109/678/736/812/878, 109/678/812, 109/678/842/878, 109/692/727/736/812,  
 109/692/727/812/842/860, 109/727/860/878, 109/736/932, 109/812, 109/842, 109/932,  
 135/670/727, 135/711/750/932, 150/527/842/871/913, 150/871/932, 150/883/932, 267/527/727,  
 403/527/678/692/736/812/842/860, 437/522/527/670/871, 437/750/830/932, 522,  
 522/527/569/727, 522/830, 527, 527/678/692/727/736/878, 527/678/692/812/932,  
 527/692/727/736/812, 527/692/727/736/842/860/878, 527/727/736, 527/736/932, 527/812,  
 670/711/871, 670/830/871, 678/692/727/812/842, 678/692/812, 678/812, 678/860/878, 678/913,  
 678/932, 692/727/736/842/913, 692/812, 727, 727/932, 871 и 878/932, где аминокислотные  
 положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на  
 SEQ ID NO: 2880.

23. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по п.1, отличающаяся тем, что  
 указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит полипептидную  
 последовательность, имеющую по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%,  
 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с  
 SEQ ID NO: 2880 или ее функциональным фрагментом, и где указанная рекомбинантная  
 кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или ряд замен в  
 одном или нескольких положениях, выбранных из 62/87/150, 89/109/527/678/727/842,  
 89/109/678/727/736/812/878, 89/109/932, 89/527/678/692/736/842/878/932,  
 89/527/727/812/860, 89/678/692/736/932, 89/678/812/878, 109/527/678/812,  
 109/678/692/842/860/878/932, 109/678/736/812/878, 109/678/812, 109/692/727/736/812,  
 109/692/727/812/842/860, 109/736/932, 109/812, 109/842, 109/932,  
 403/527/678/692/736/812/842/860, 522/830, 527/678/692/727/736/878, 527/678/692/812/932,  
 527/692/727/736/812, 527/692/727/736/842/860/878, 527/727/736, 527/736/932, 527/812,  
 678/692/727/812/842, 678/692/812, 678/812, 692/727/736/842/913 и 692/812, где  
 аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности

пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2880.

24. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по п.1, отличающаяся тем, что указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит полипептидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 3104 или ее функциональным фрагментом, и где указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или набор замещений в одной или нескольких позициях, выбранных из 62, 62/89/830, 62/248/678/830/878/932, 62/678, 62/678/785, 62/678/830, 62/678/830/860, 62/678/830/860/871/878/932, 62/678/830/860/878, 62/678/830/860/878/932, 62/678/830/860/932, 62/678/830/871, 62/678/830/871/932, 62/678/830/878/932, 62/678/830/932, 62/678/860, 62/678/860/878, 62/678/860/932, 62/678/871, 62/678/871/932, 62/678/878/932, 62/678/932, 62/830, 62/830/860, 62/830/860/871/873, 62/830/860/878/932, 62/830/860/932, 62/830/871/932, 62/830/878, 62/830/932, 62/833/860/932, 62/860, 62/860/871, 62/860/871/878, 62/860/871/932, 62/860/878/932, 62/860/932, 62/871/878/932, 62/871/932, 62/878, 62/878/932, 62/932, 678, 678/830/932, 678/932 и 860/932, где аминокислотные положения в указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 3104.

25. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по п.1, отличающаяся тем, что указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит полипептидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 3104 или ее функциональным фрагментом, и где указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну замену или набор замен в одном или нескольких положениях, выбранных из 62/89/830, 62/830, 62/830/860, 62/830/860/932 и 62/830/932, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности являются пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 3104.

26. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по п.1, отличающаяся тем, что указанная кислая альфа-глюкозидаза содержит, по меньшей мере, одну мутацию по меньшей мере, в одном положении, как указано в таблицах 3-1, 3-2, 4-1, 6-1, 10-1, 10-2, 12-1, 13-1, 13-2, 14-1, 14-2, 15-1, 16-1, 17-1, 17-2, 17-3, 17-4, 17-5, 17-6, 17-7, 17-8 и/или 17-9.

27. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по любому из пп.1-26, отличающаяся тем, что указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза получена из кислой альфа-глюкозидазы человека.

28. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза, содержащая полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 946, 1956, 2496, 2880 и/или 3104.

29. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по любому из пп. 1-28, отличающаяся тем, что указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза является более термостабильной, чем кислая альфа-глюкозидаза SEQ ID NO: 2, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 946, 1956, 2496, 2880 и/или 3104.

30. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по любому из пп. 1-29,

отличающаяся тем, что указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза более стабильна при рН 7, чем кислая альфа-глюкозидаза SEQ ID NO: 2, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 946, 1956, 2496, 2880 и/или 3104.

31. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по любому из пп. 1-30, отличающаяся тем, что указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза более стабильна при рН 4, чем кислая альфа-глюкозидаза SEQ ID NO: 2, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 946, 1956, 2496, 2880 и/или 3104.

32. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по любому из пп. 1-31, отличающаяся тем, что указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза демонстрирует более высокую экспрессию, чем кислая альфа-глюкозидаза SEQ ID NO: 2, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 946, 1956, 2496, 2880 и/или 3104.

33. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по любому из пп. 1-32, отличающаяся тем, что указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза является более лизосомально стабильной, чем кислая альфа-глюкозидаза SEQ ID NO: 2, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 946, 1956, 2496, 2880 и/или 3104.

34. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по любому из пп. 1-33, отличающаяся тем, что указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза легче поглощается клетками, чем кислая альфа-глюкозидаза SEQ ID NO: 2, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 946, 1956, 2496, 2880 и/или 3104.

35. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по любому из пп. 1-34, отличающаяся тем, что указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза проявляет более высокую ферментативную активность в клеточных лизатах, чем кислая альфа-глюкозидаза SEQ ID NO: 2, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 946, 1956, 2496, 2880 и/или 3104.

36. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по любому из пп. 1-35, отличающаяся тем, что указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза проявляет пониженную иммуногенность по сравнению с кислой альфа-глюкозидазой SEQ ID NO: 2, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 946, 1956, 2496, 2880 и/или 3104.

37. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по любому из пп.1-36, отличающаяся тем, что указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза является очищенной.

38. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по любому из пп.1-37, отличающаяся тем, что указанная рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза проявляет по меньшей мере, одно улучшенное свойство, выбранное из: i) повышенной каталитической активности; ii) повышенной толерантности к рН 7; iii) повышенной толерантности к рН 4; iv) повышенной экспрессии; v) повышенного поглощения клетками; vi) повышенной ферментативной активности в клеточных лизатах; vii) сниженной иммуногенности; или комбинации любого из i), ii), iii), iv), v), v) и/или vii) по сравнению с эталонной последовательностью.

39. Рекомбинантная кислая альфа-глюкозидаза по п.38, отличающаяся тем, что указанная эталонная последовательность выбрана из SEQ ID NO: 2, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20,

946, 1956, 2496, 2880 и/или 3104.

40. Композиция, содержащая по меньшей мере, одну рекомбинантную кислую альфа-глюкозидазу по любому из пп. 1-39 .

41. Рекомбинантная полинуклеотидная последовательность, кодирующая, по меньшей мере, одну рекомбинантную кислую альфа-глюкозидазу по любому из пп. 1-40.

42. Рекомбинантная полинуклеотидная последовательность по п.41, отличающаяся тем, что указанная полинуклеотидная последовательность выбрана из ДНК, РНК и мРНК.

43. Рекомбинантная полинуклеотидная последовательность по п.41 и/или 42, отличающаяся тем, что указанная полинуклеотидная последовательность является кодон-оптимизированной.

44. Вектор экспрессии, содержащий рекомбинантную полинуклеотидную последовательность по пп. 41, 42 и/или 43.

45. Вектор экспрессии по п.44, отличающийся тем, что указанная рекомбинантная полинуклеотидная последовательность функционально связана с контрольной последовательностью.

46. Вектор экспрессии по п.45, отличающийся тем, что указанная контрольная последовательность представляет собой промотор.

47. Вектор экспрессии по п.46, отличающийся тем, что указанный промотор является гетерологичным промотором.

48. Вектор экспрессии рДН.

49. Вектор экспрессии рДН по п.48, отличающийся тем, что указанный вектор экспрессии содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3379 или SEQ ID NO: 3380.

50. Вектор экспрессии по п.48, отличающийся тем, что указанный вектор экспрессии содержит полинуклеотидную последовательность любой из нечетных последовательностей SEQ ID NO: 7-3377.

51. Клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по любому из пп.44-50.

52. Клетка-хозяин по п.51, отличающаяся тем, что указанная клетка-хозяин выбрана из эукариотов и прокариотов.

53. Клетка-хозяин по п.51 и/или 52, отличающаяся тем, что указанная клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего.

54. Способ получения варианта рекомбинантной кислой альфа-глюкозидазы, включающий культивирование указанной клетки-хозяина по любому из пп. 52-53 в условиях, при которых продуцируется указанная кислая альфа-глюкозидаза, кодируемая указанным рекомбинантным полинуклеотидом.

55. Способ по п.54, дополнительно включающий стадию восстановления указанной кислой альфа-глюкозидазы.

56. Способ по п.55, дополнительно включающий стадию очистки указанной кислой альфа-глюкозидазы.

57. Вариант рекомбинантной кислой альфа-глюкозидазы, полученный в

соответствии со способом по любому из пп.54-56.

58. Композиция, содержащая рекомбинантную кислую альфа-глюкозидазу по п.57.

59. Композиция, содержащая по меньшей мере, один полинуклеотид по любому из пп.41-43.

60. Фармацевтическая композиция для лечения болезни Помпе, содержащая композицию по пп. 40, 58 и/или 59.

61. Фармацевтическая композиция для лечения болезни Помпе, содержащая композицию по п.40 и/или 58.

62. Фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантный полинуклеотид по любому из пп.41-43.

63. Фармацевтическая композиция по любому из пп.60-62, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент.

64. Фармацевтическая композиция по любому из пп.60-63, где указанная композиция пригодна для парентеральной инъекции или инфузии человеку.

65. Способ лечения и/или предотвращения симптомов болезни Помпе у субъекта, включающий предоставление субъекта, страдающего болезнью Помпе, и предоставление фармацевтической композиции и/или композиции по любому из пп. 40, 58, 59, 60, 61, 62, 63 и/или 64 указанному субъекту.

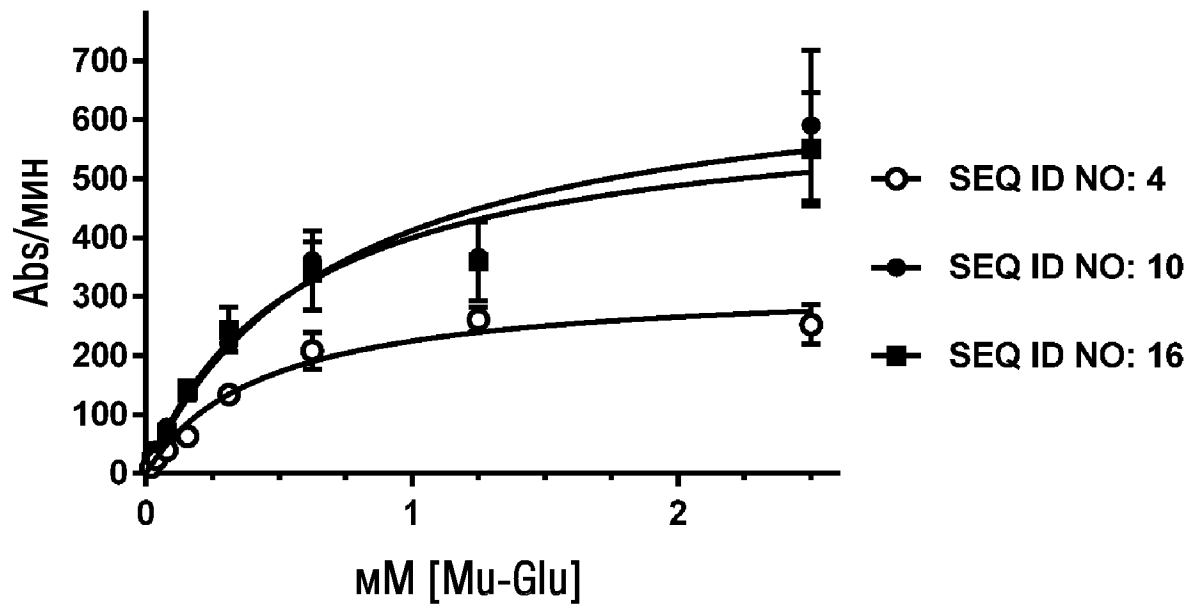
66. Способ по п.65, отличающийся тем, что указанные симптомы болезни Помпе облегчаются.

67. Способ по любому из пп.65-66, отличающийся тем, что указанный субъект является младенцем или ребенком.

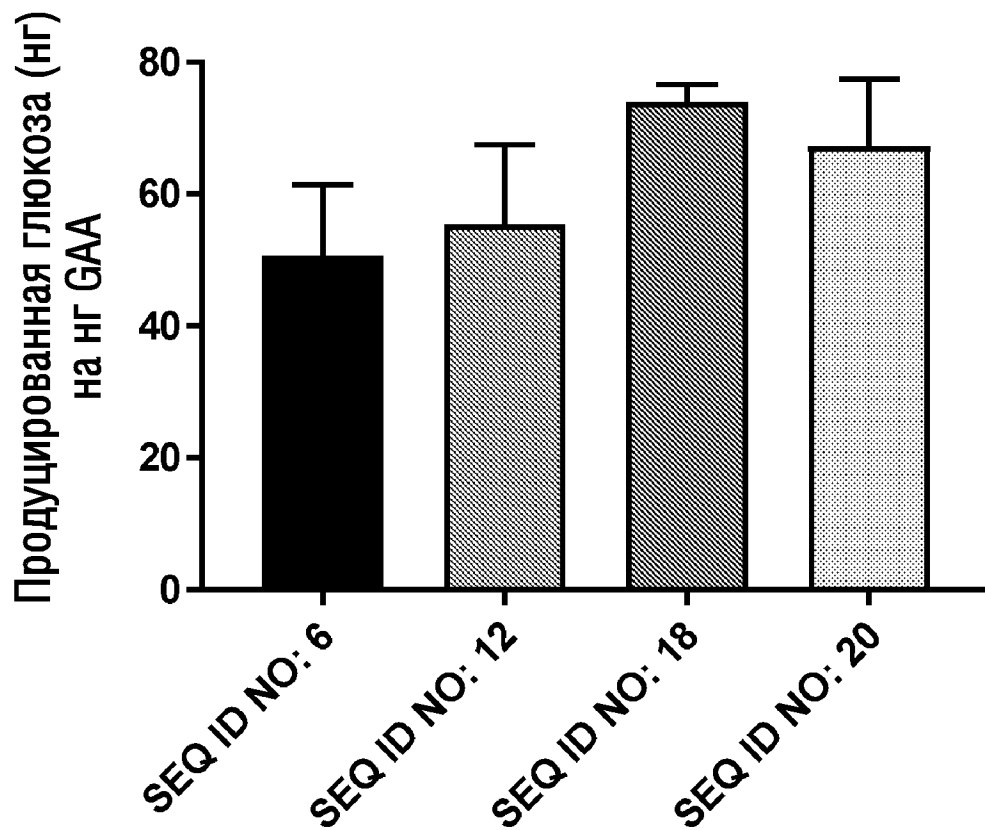
68. Способ по любому из пп.65-67, отличающийся тем, что указанный субъект является взрослым или молодым человеком.

69. Применение композиций по любому из пп.40 и 58-64.

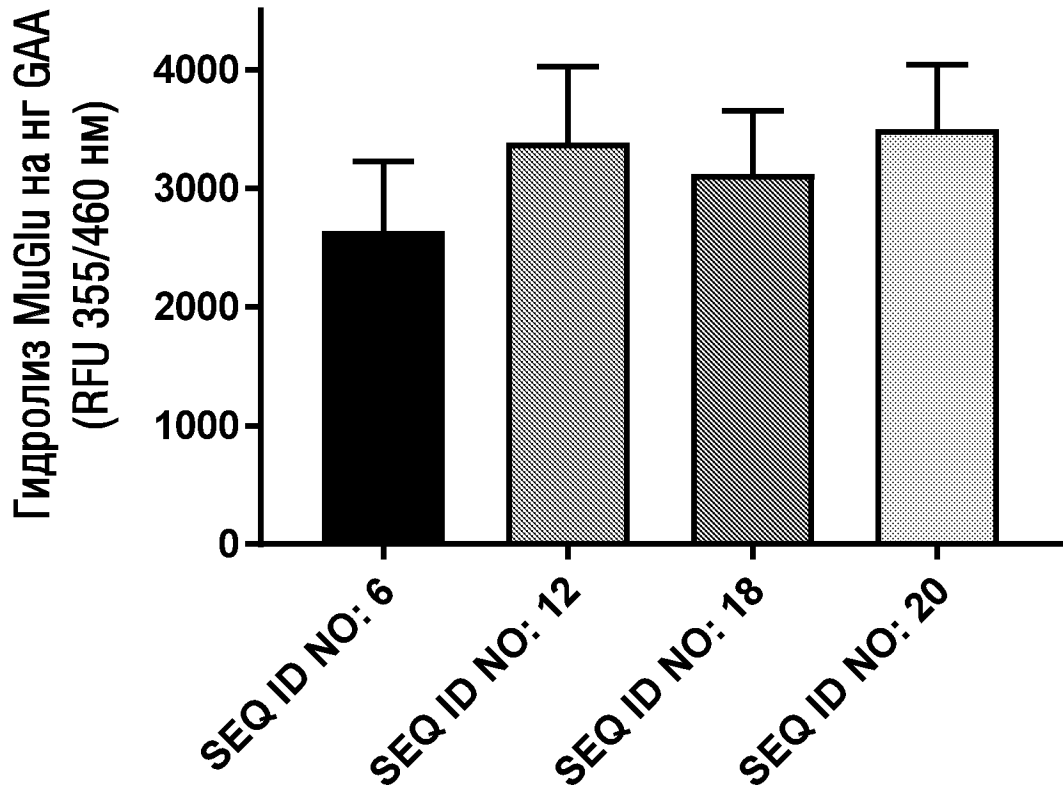
ФИГ.1



ФИГ.2

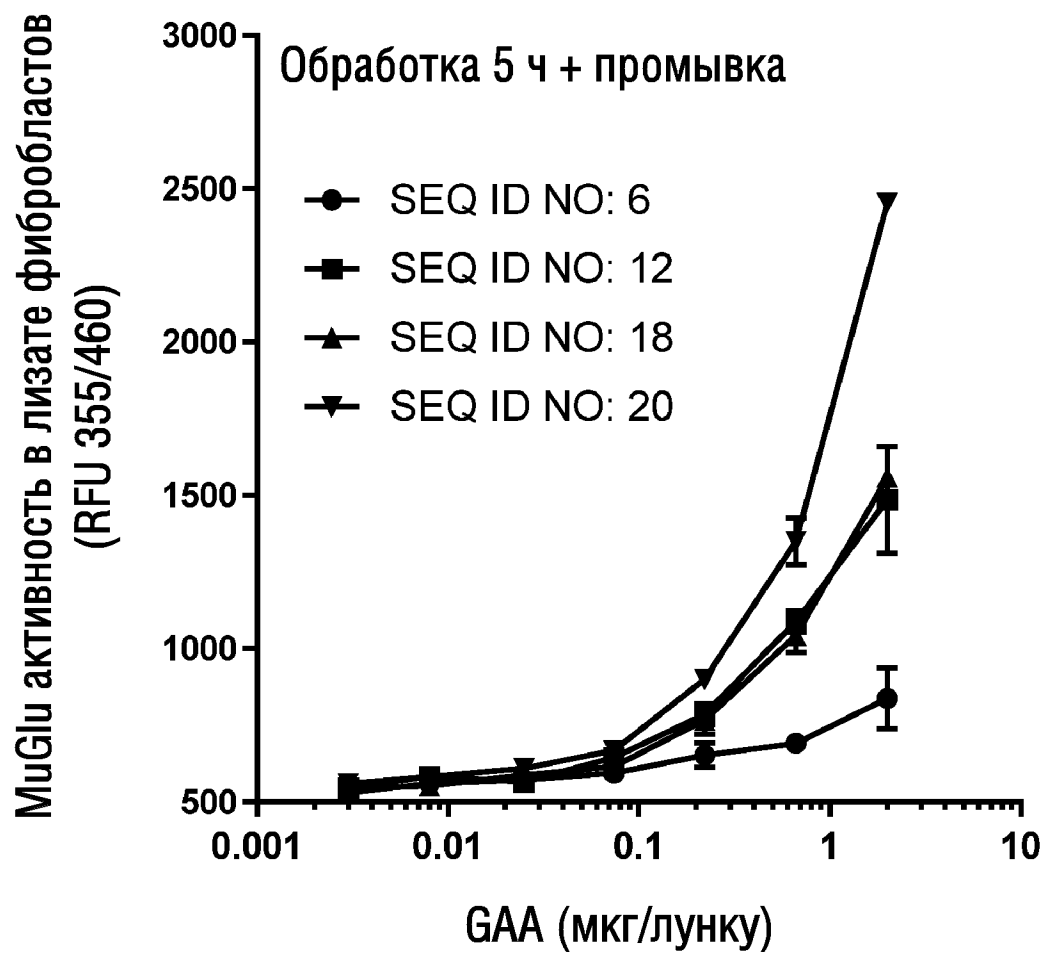


ФІГ.3

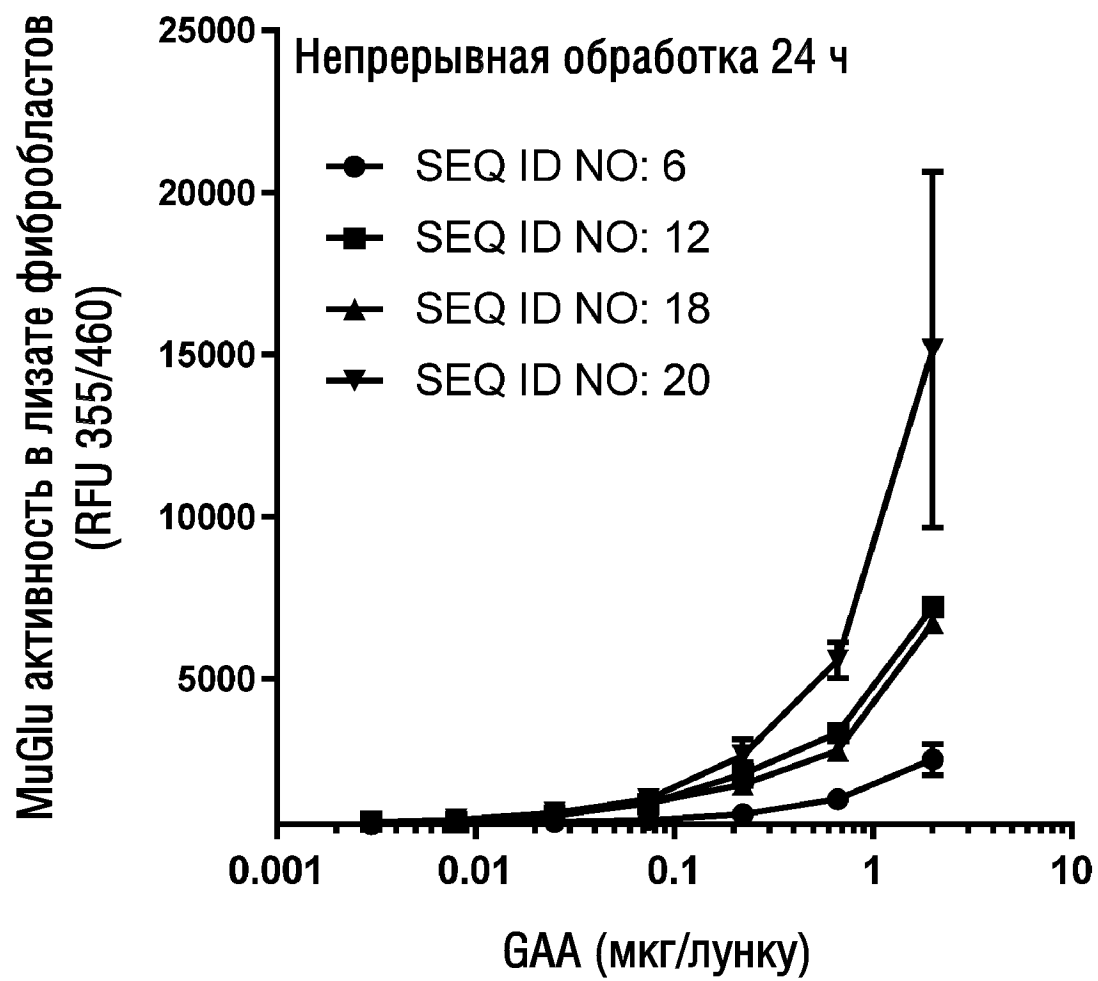




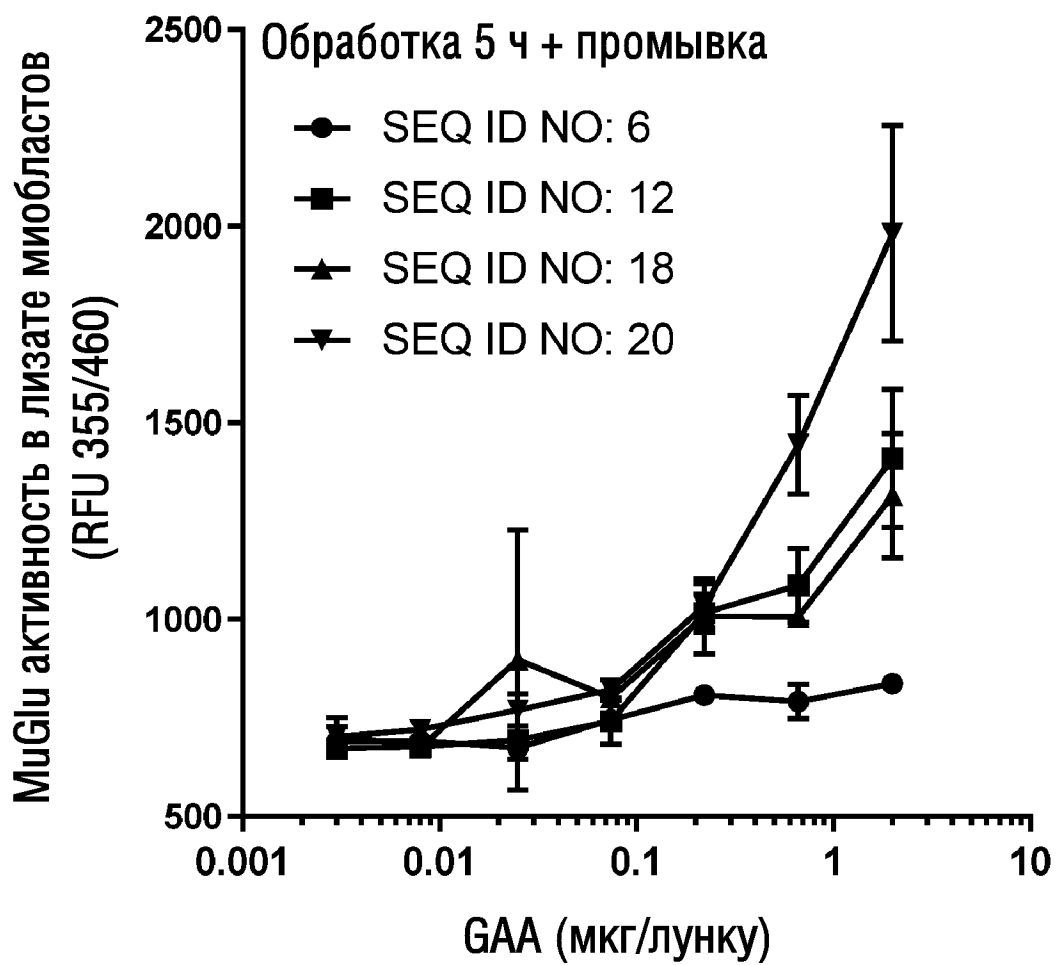
ФИГ.4



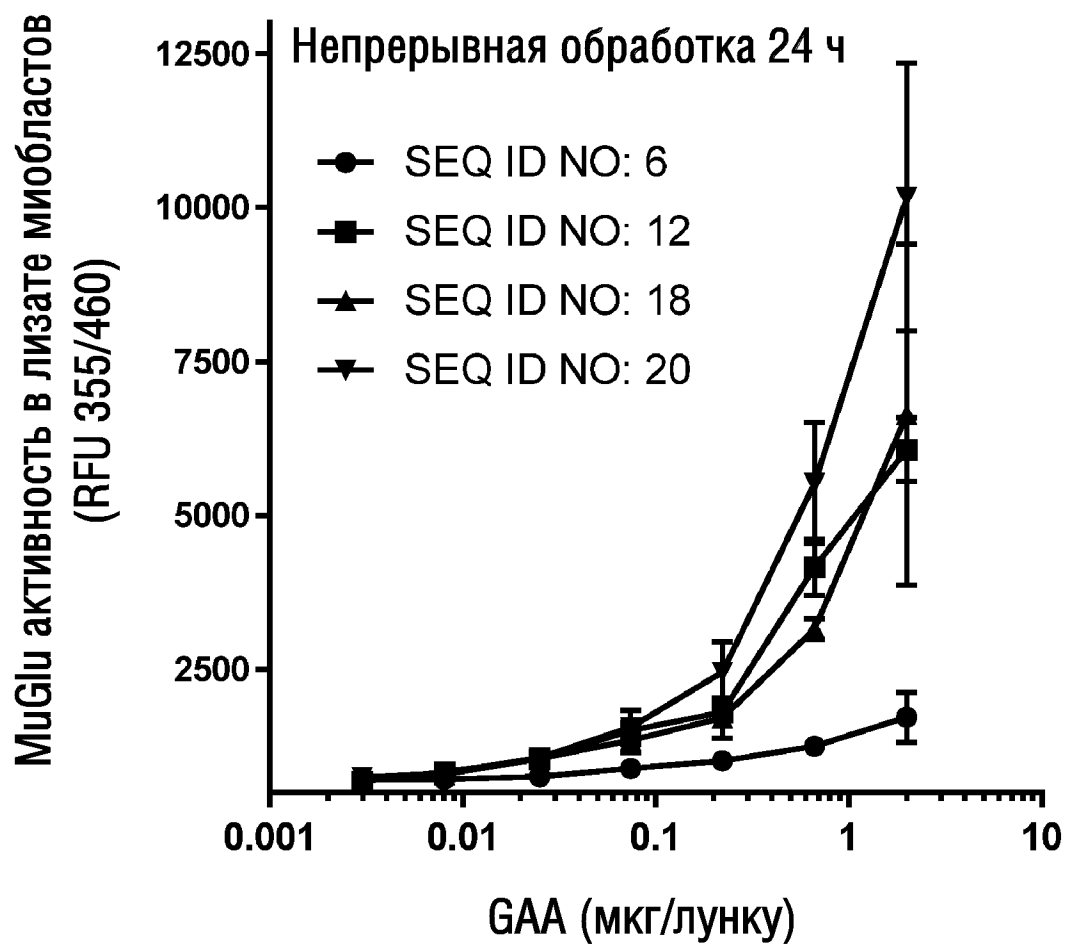
ФИГ.5



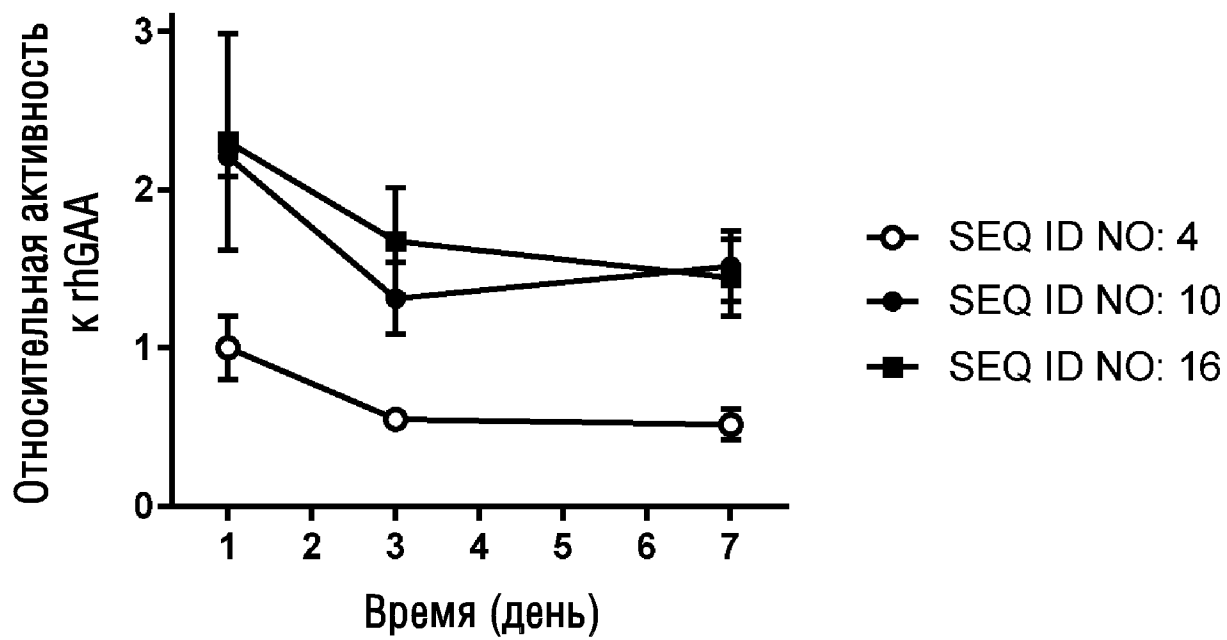
ФИГ.6



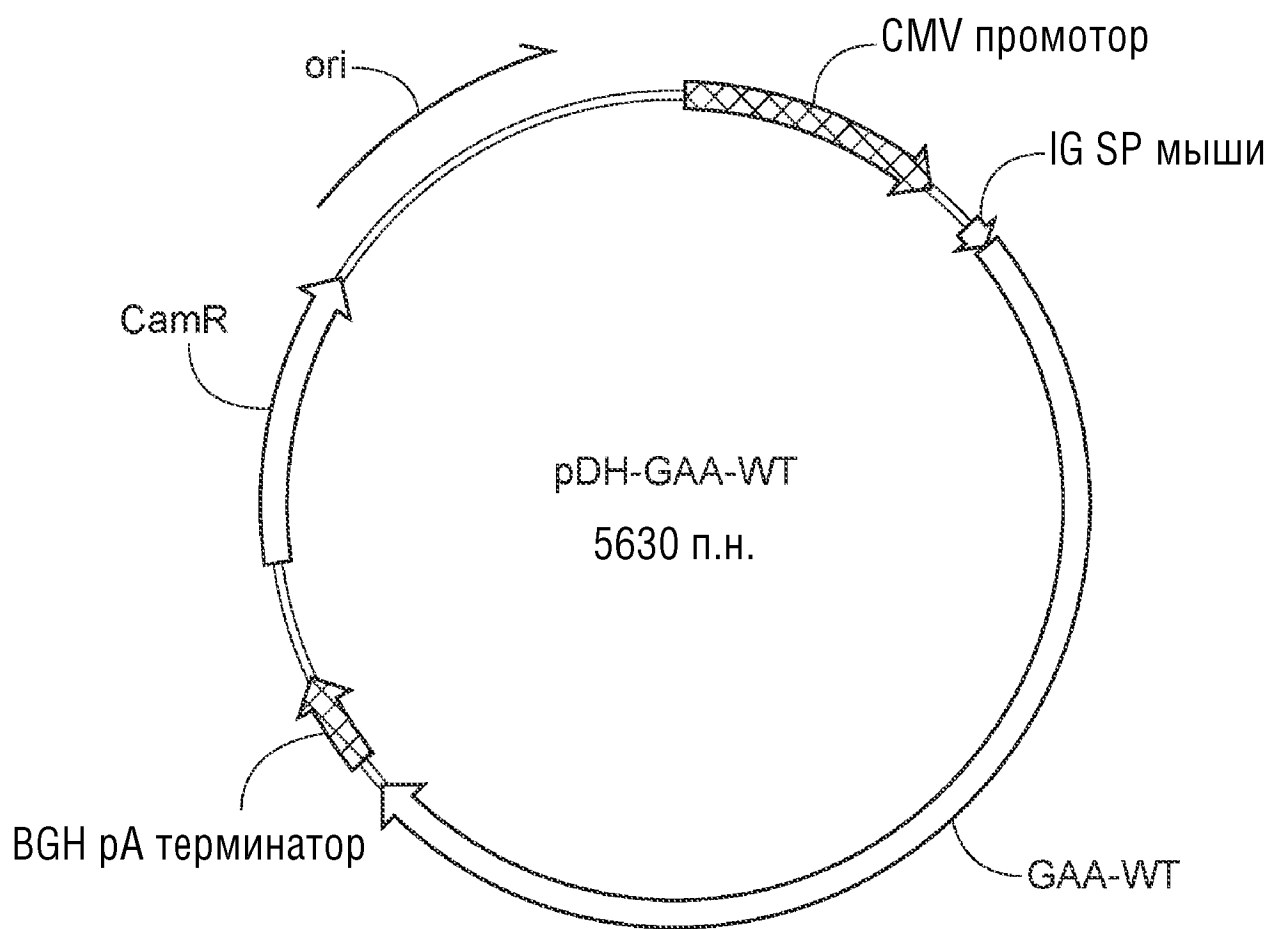
ФИГ.7



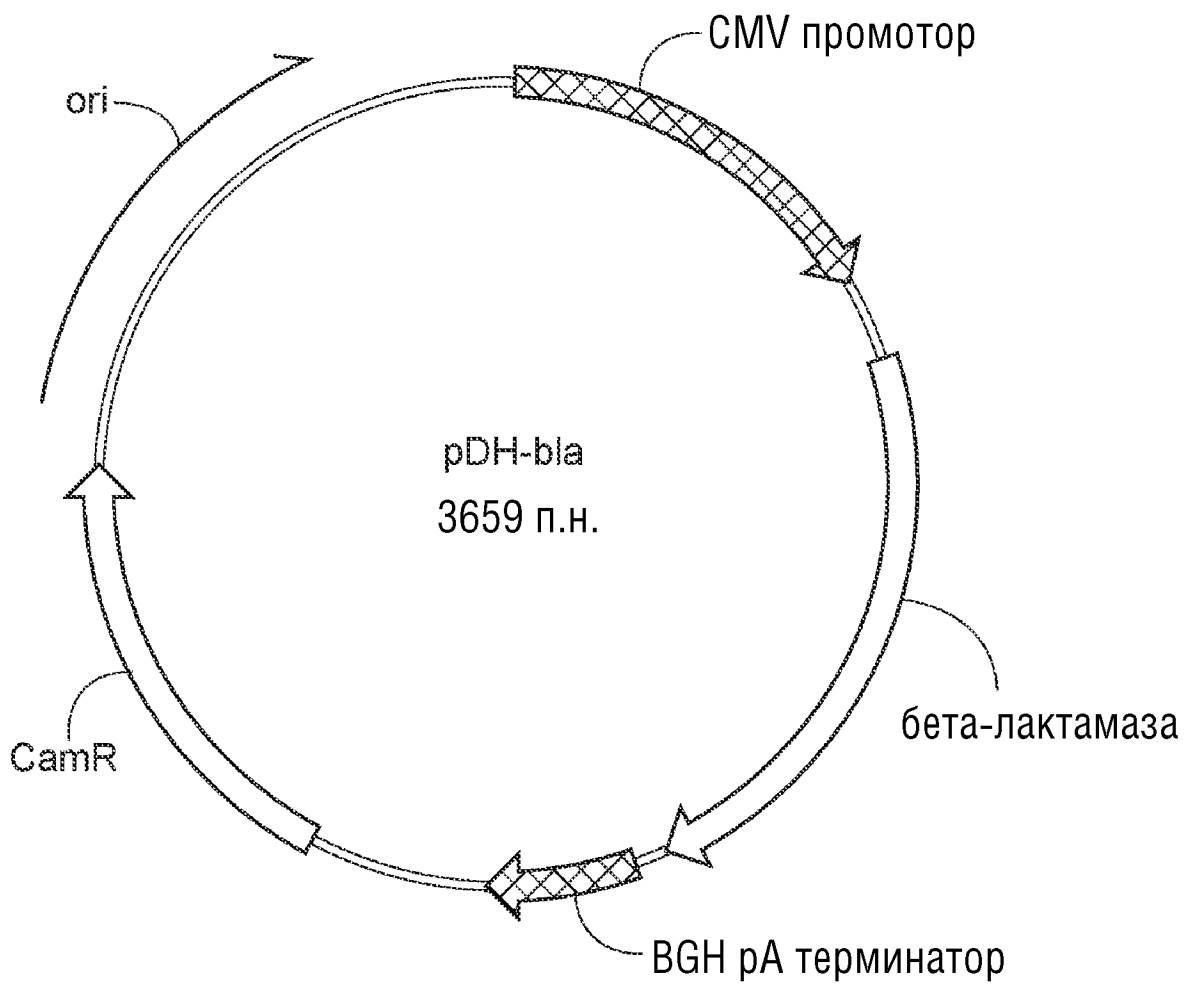
ФИГ.8



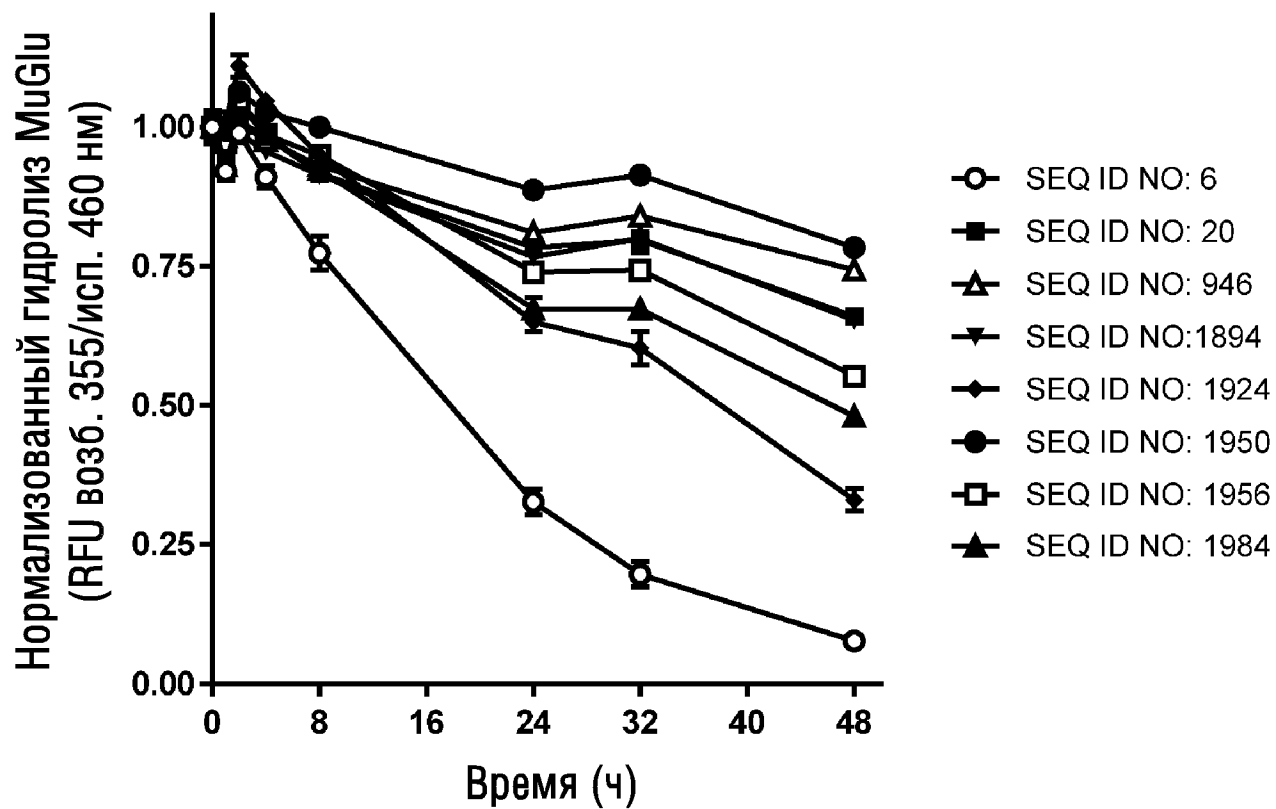
ФИГ.9



ФИГ.10

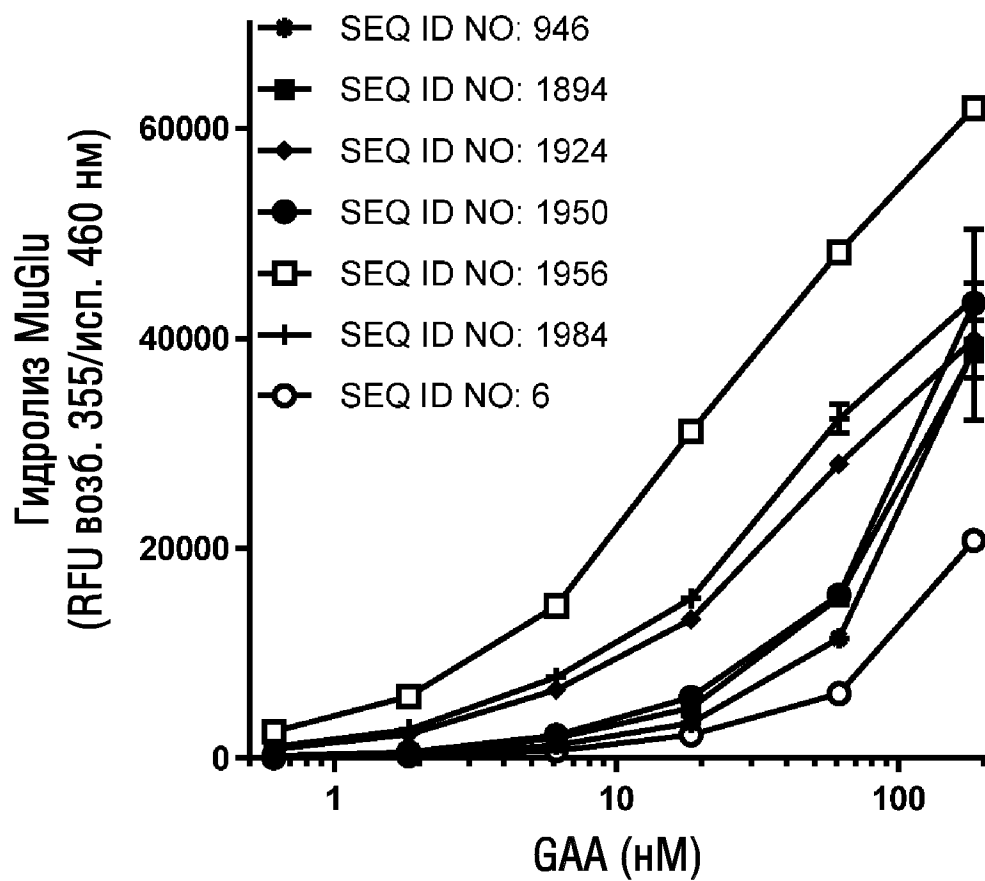


ФИГ.11

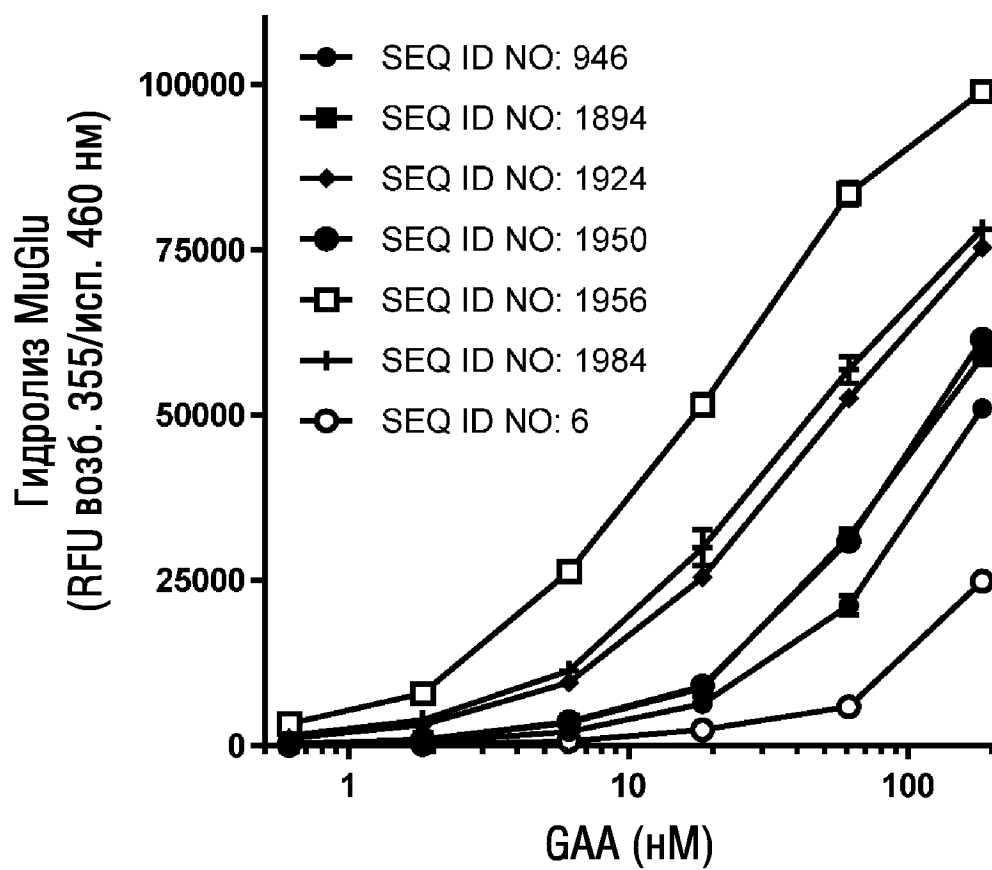




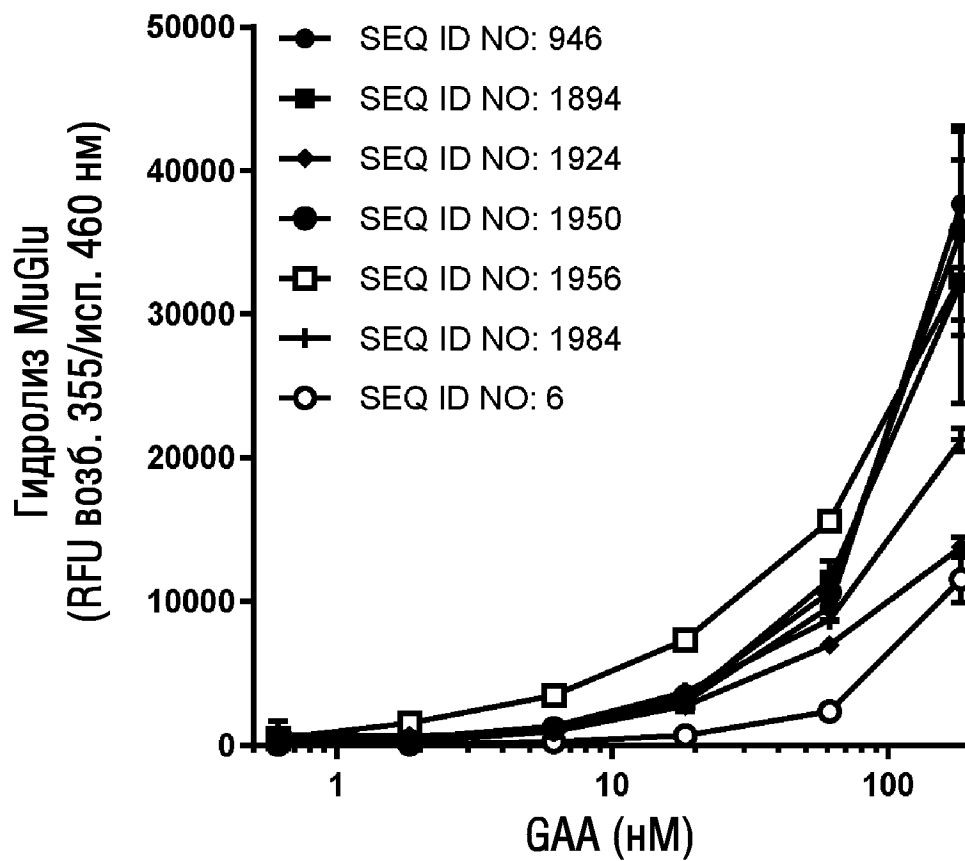
ФИГ.12



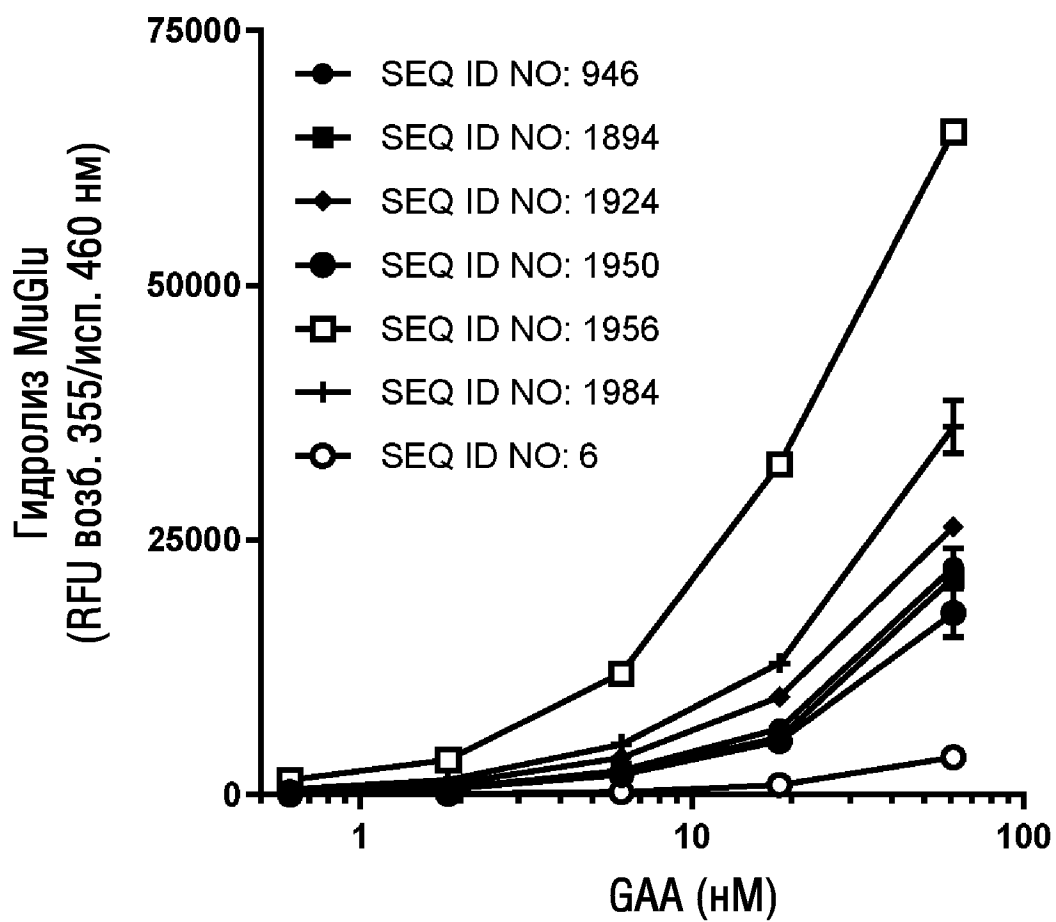
ФИГ.13



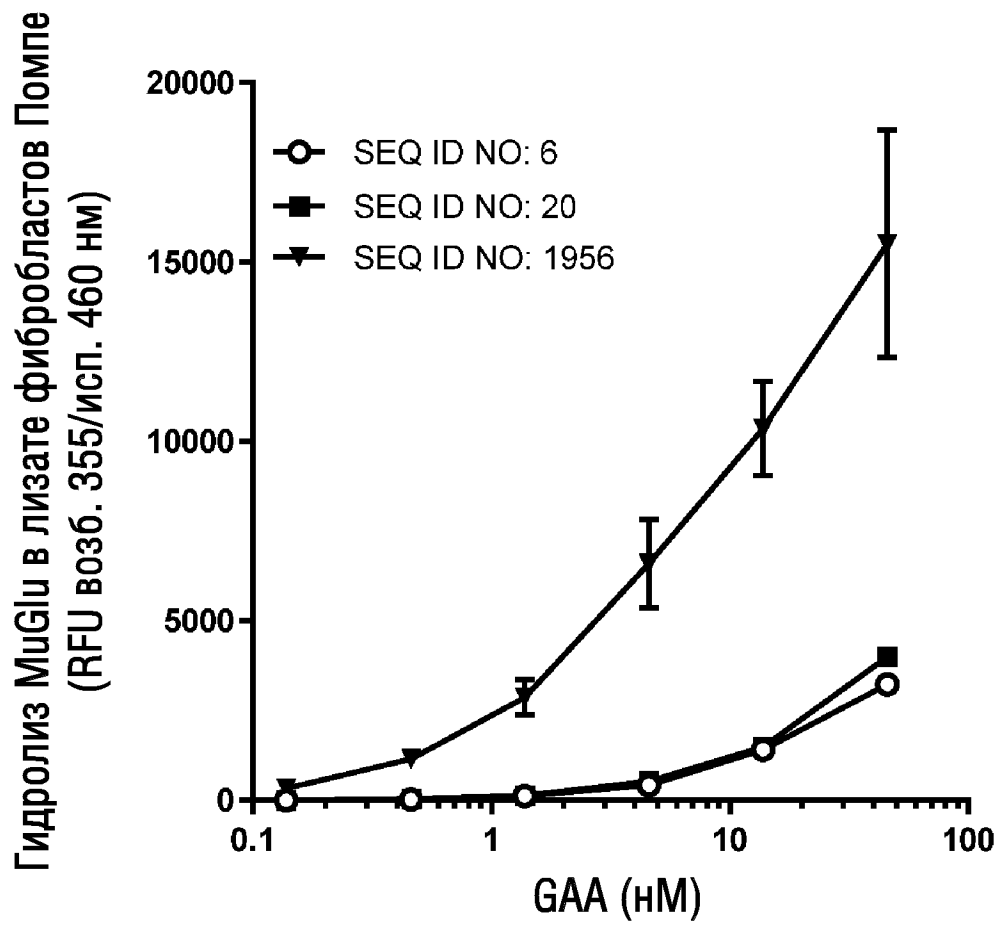
ФИГ.14



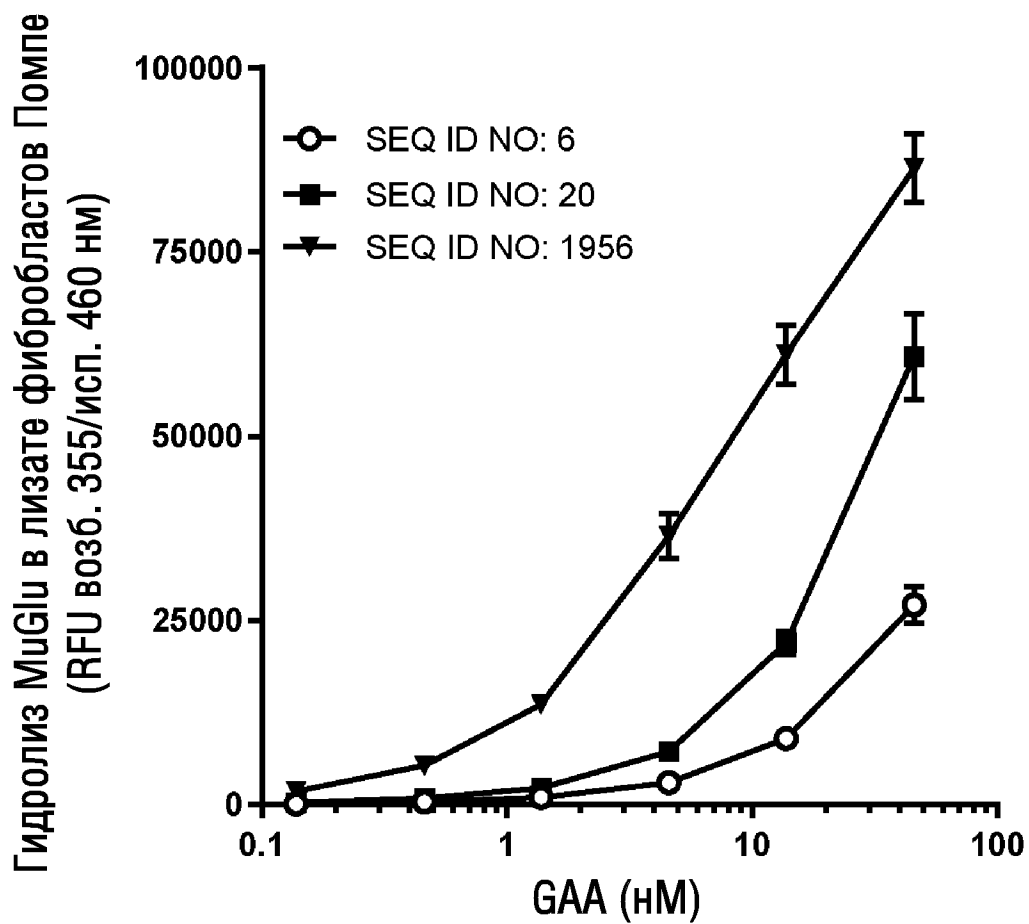
ФИГ.15



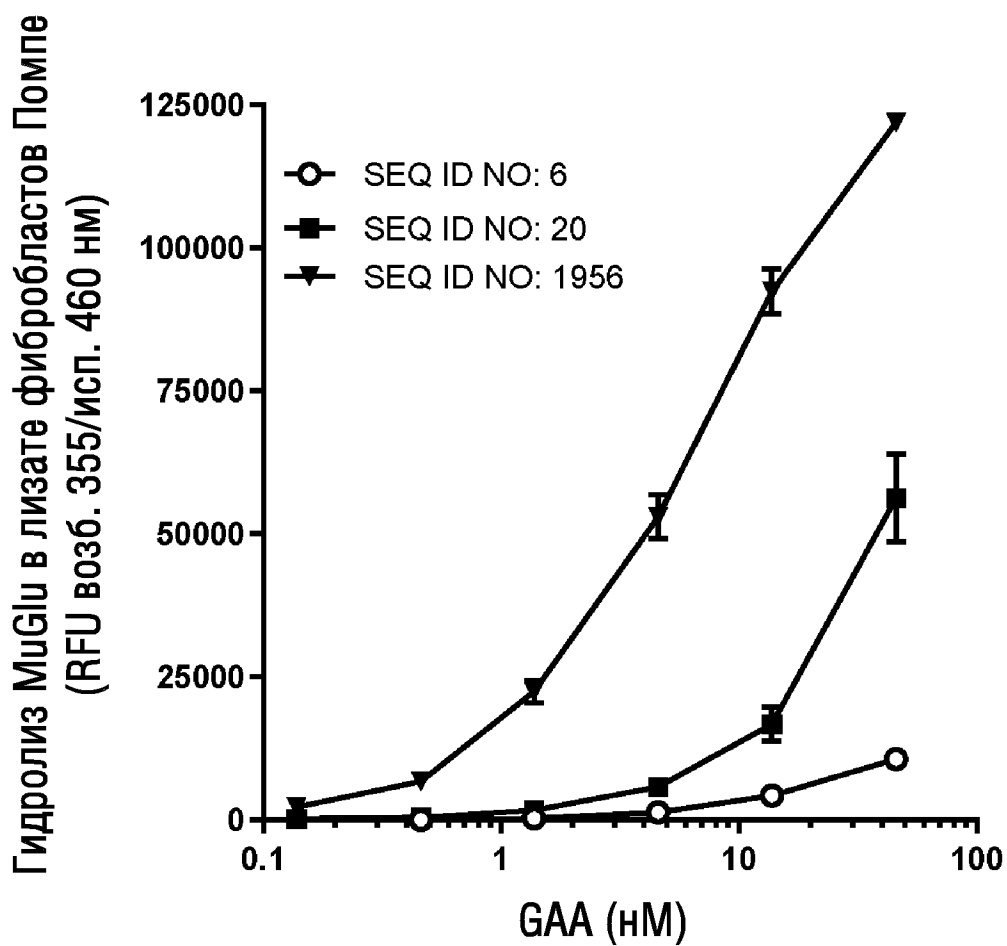
ФИГ.16



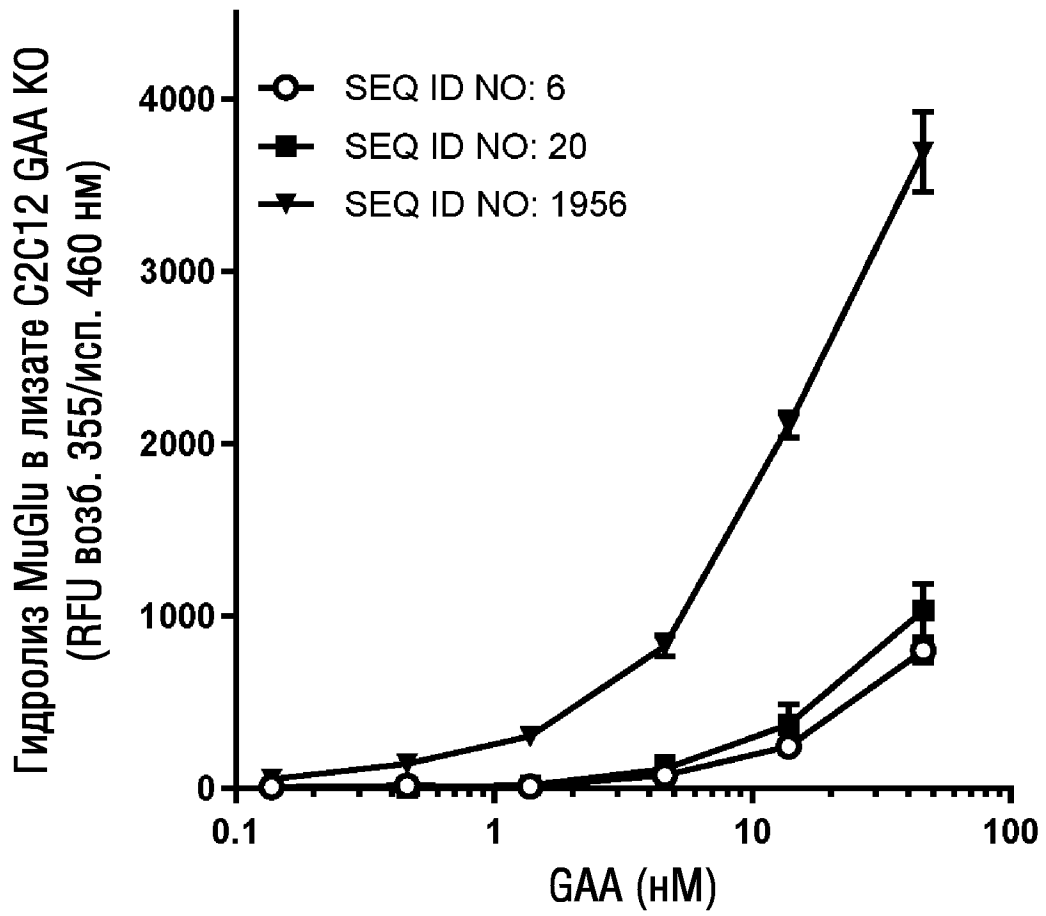
ФИГ.17



ФИГ.18

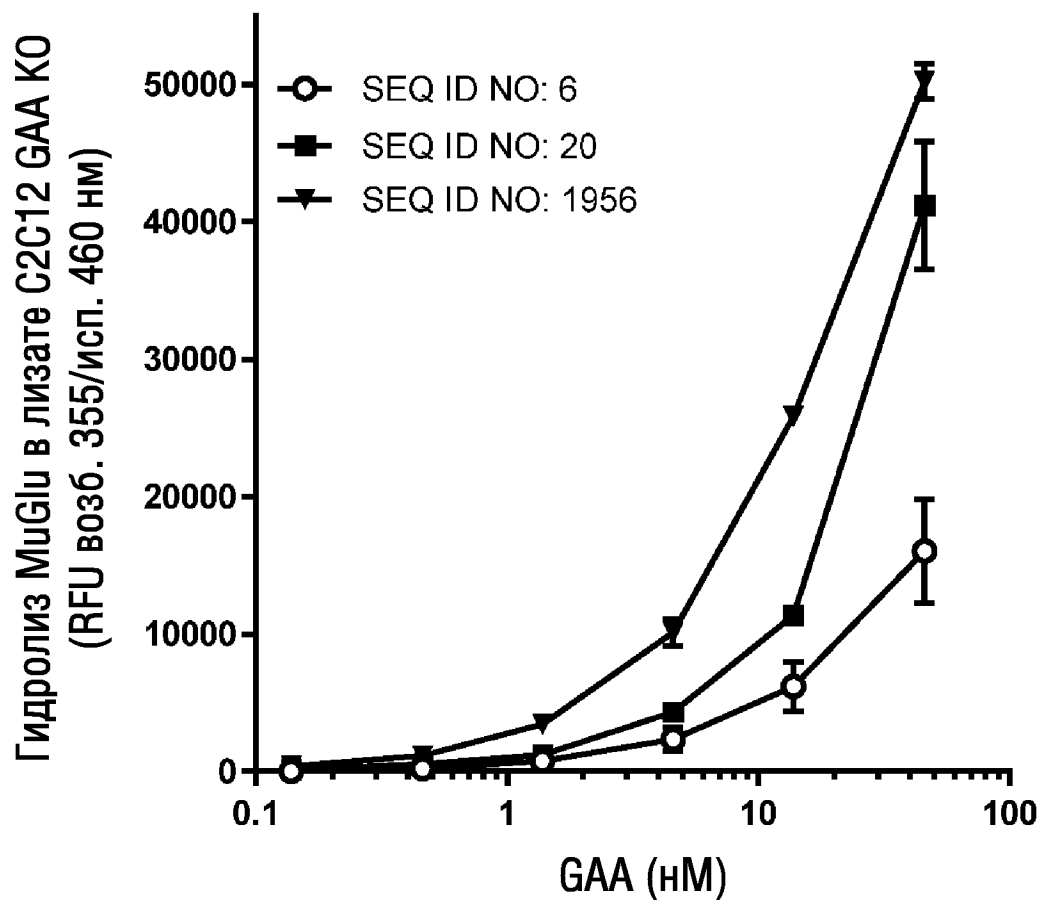


ФИГ.19

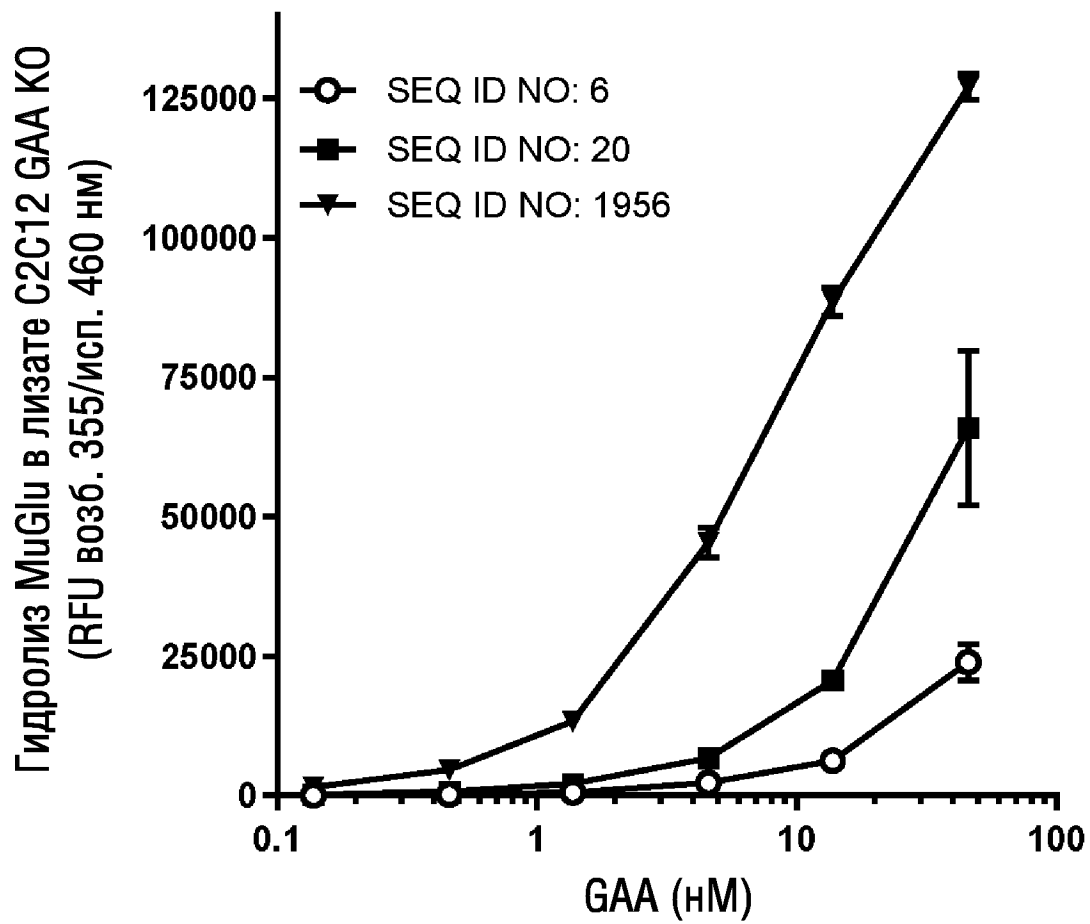




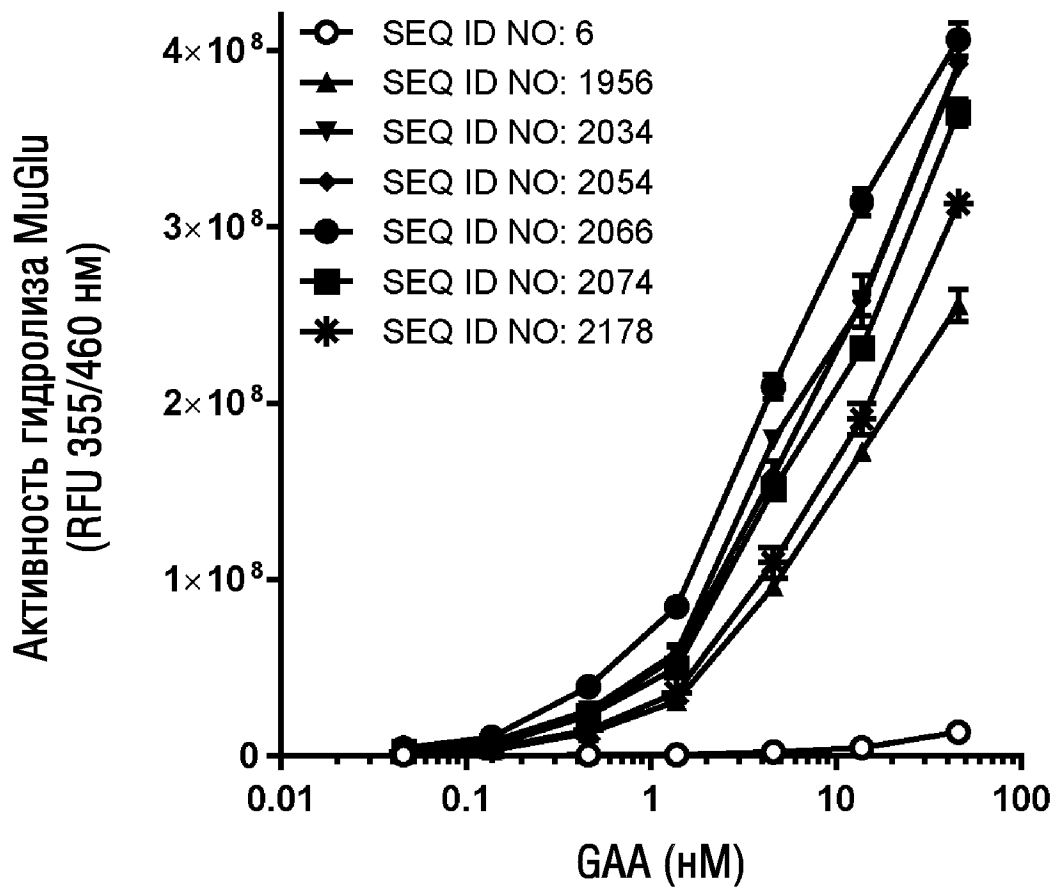
## ФИГ.20



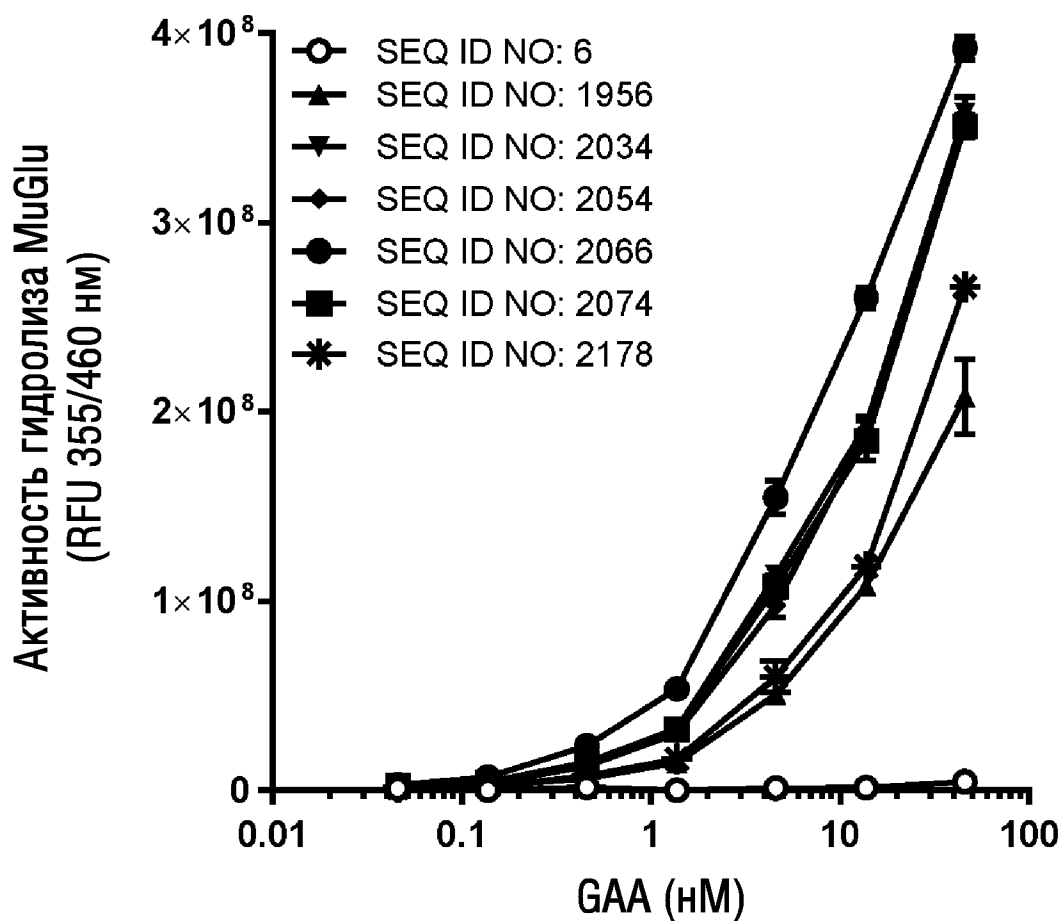
ФИГ.21



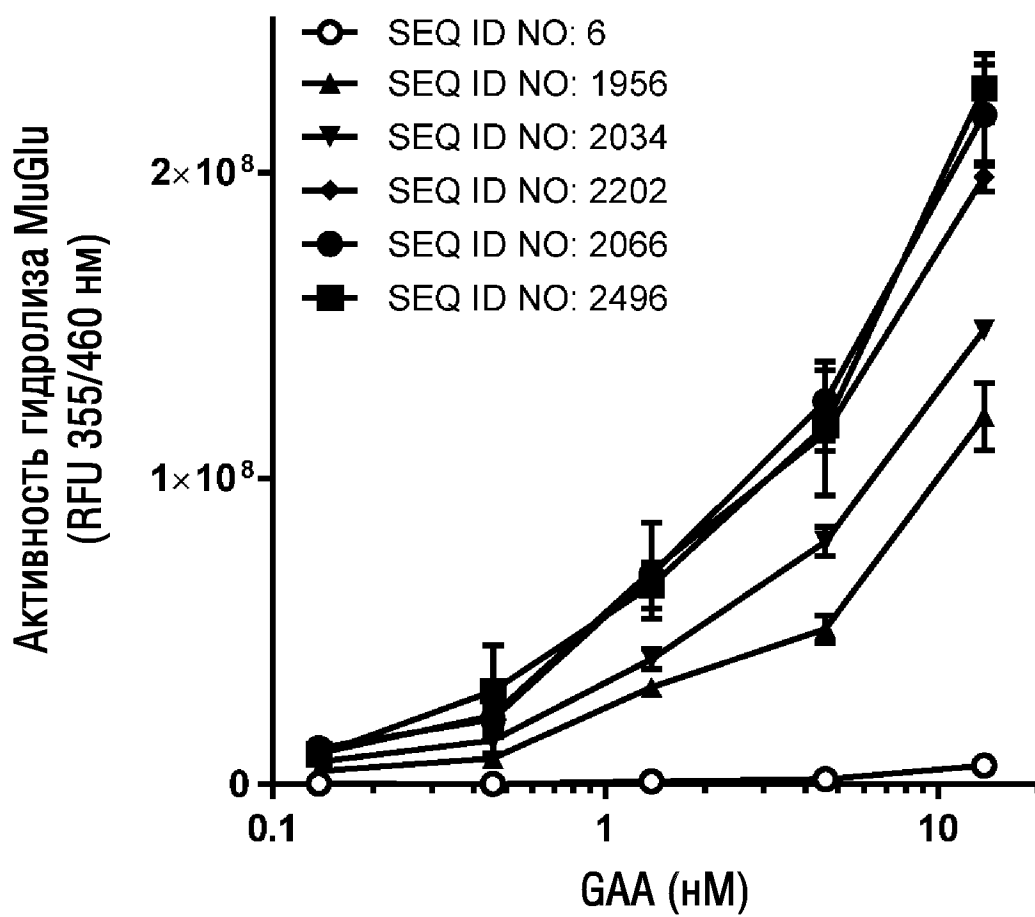
ФИГ.22



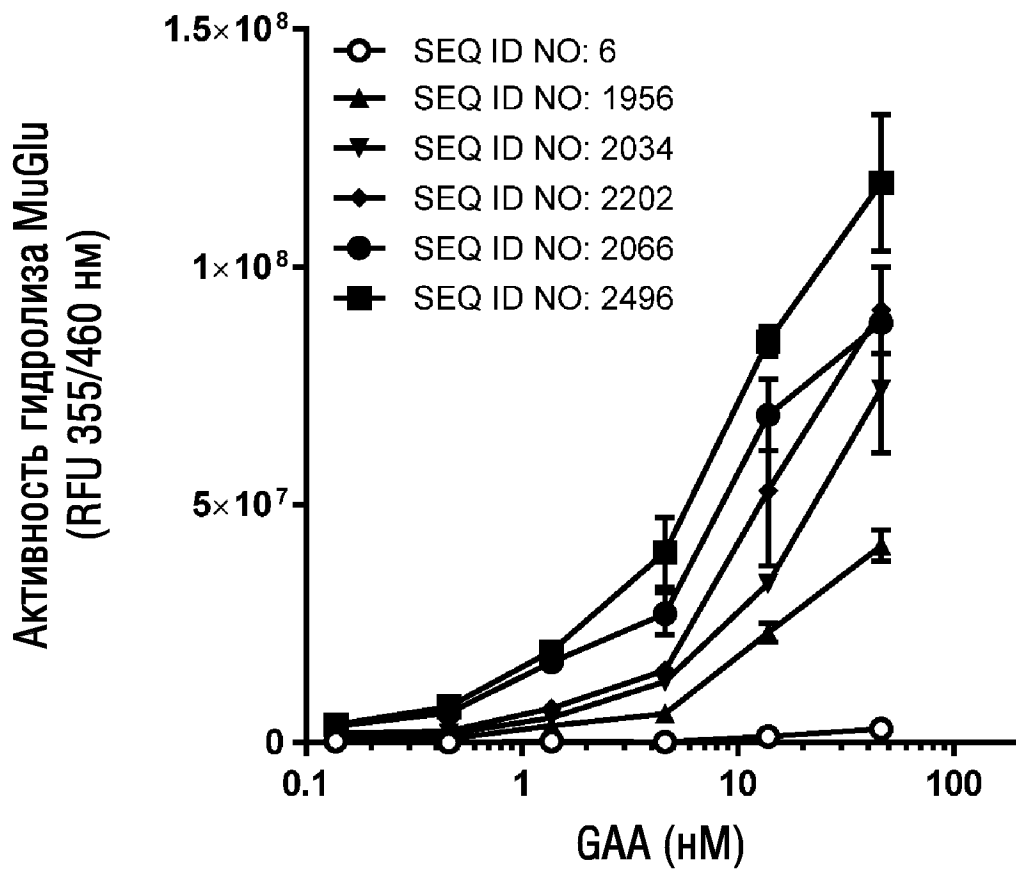
ФИГ.23



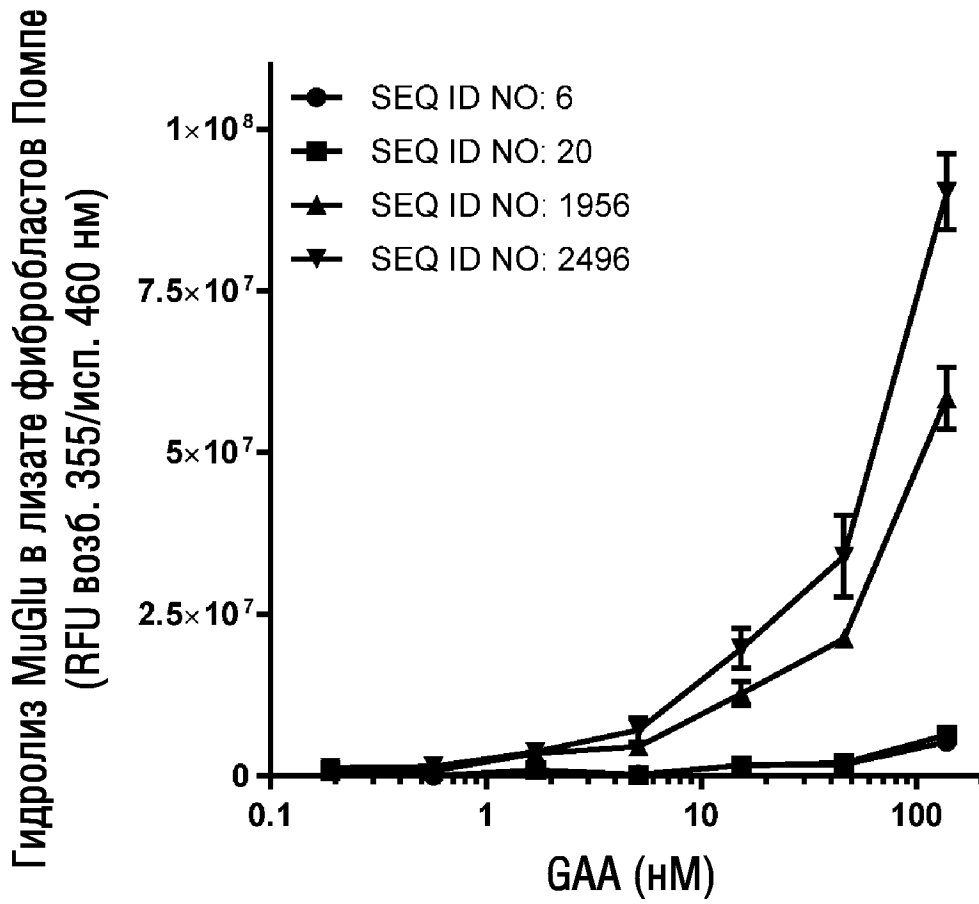
ФИГ.24



ФИГ.25



ФИГ.26



ФИГ.27

