(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202291913 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.05

(22) Дата подачи заявки
2021.01.15

(51) Int. Cl. ***A61K 48/00*** (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(54) ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА ДЛЯ ФЕНИЛКЕТОНУРИИ

(31) **62/962,011**
(32) **2020.01.16**
(33) **US**
(86) **PCT/IB2021/000008**
(87) **WO 2021/144649 2021.07.22**
(88) **2021.09.30**

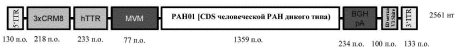
(71) Заявитель:
ТАКЕДА ФАРМАСЬЮТИКАЛ КОМПАНИ ЛИМИТЕД (JP)

(72) Изобретатель:
Клугманн Маттиас, Роттенштайнер Ганспетер, Хорлинг Франциска, Ленглер Йоханнес (US)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

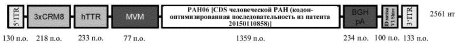
(57) В настоящем изобретении, среди прочего, предложен вектор на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащий капсид AAV8 и кодон-оптимизированную последовательность, кодирующую фермент фенилаланингидроксилазу (PAH) человека. В данном изобретении также предложен способ лечения субъекта, имеющего фенилкетонурию (ФКУ), включающий введение нуждающемуся в этом субъекту вектора на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего капсид AAV8 и промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, которая кодирует PAH, и при этом введение приводит к снижению уровня фенилаланина у субъекта.

T01



- Кодирующая последовательность человеческой PAH дикого типа (GenBank U49897)
- 23 CpG
- содержание GC 47,1 %

T02



- CDS PAH человека, кодон-оптимизированные – кодон-оптимизированные CDS PAH, описанные в заявке на патент США 201501108581
  - 110 CpG
  - содержание GC 64,6 %

T03

- CDS мышиного PAH (кодирующая последовательность мышиного PAH дикого типа (GenBank NM_008777.3))
  - 30 CpG
  - содержание GC 49,4 %

92% идентичности аминокислотной последовательности между человеческой PAH и мышиной PAH

202291913 A1

202291913 A1

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА ДЛЯ ФЕНИЛКЕТОНУРИИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] В данной заявке испрашивается преимущество и приоритет заявки США с серийным номером 62/962011, поданной 16 января 2020 г., содержание которой включено в данный документ.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Фенилкетонурия (ФКУ) является аутосомно-рецессивным метаболическим генетическим заболеванием, характеризующимся мутацией в гене печеночного фермента фенилаланингидроксилазы (PAH), что делает его нефункциональным. PAH необходима для метаболизма аминокислоты фенилаланина (Phe) в аминокислоту тирозин. Когда активность PAH снижается, фенилаланин накапливается и превращается в фенилпируват (также известный как фенилкетон). При отсутствии лечения ФКУ может привести к умственной отсталости, судорогам и другим серьезным проблемам со здоровьем. В настоящее время нет никакого лечения от этой болезни, и стандарт лечения заключается в соблюдении диеты, сведении к минимуму продуктов, содержащих большое количество белка.

[0003] Применение векторов, которые продуцируют терапевтические белки *in vivo*, желательно для лечения заболеваний, но оно ограничено различными факторами, в том числе плохой продукцией желаемых терапевтических белков *in vivo*.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Настоящее изобретение обеспечивает, среди прочего, способы и композиции для эффективного лечения ФКУ с использованием генной терапии. Настоящее изобретение частично основано на неожиданном открытии успешного лечения ФКУ на животной модели заболевания с использованием векторов на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащих кодон-оптимизированную человеческую PAH. Например, как описано более подробно в разделе примеров ниже, введение векторов rAAV, которые кодируют PAH, приводило к эффективной экспрессии белка. Кроме того, векторы rAAV, кодирующие капсид AAV8 и кодон-оптимизированную человеческую PAH, были особенно эффективны в снижении уровня фенилаланина и повышении уровней тирозина и триптофана как в плазме, так и в мозге мышей с ФКУ. Таким образом, авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что описанный в данный документ подход генной терапии может быть высокоэффективным при лечении ФКУ.

[0005] В одном аспекте настоящее изобретение относится к rAAV, содержащему кодон-оптимизированную последовательность, кодирующую PAH человека, при этом кодон-оптимизированная последовательность имеет по меньшей мере 70% идентичности с одной из SEQ ID NO: 11-27.

[0006] В некоторых вариантах осуществления кодон-оптимизированная последовательность имеет по меньшей мере 75% идентичности с одной из SEQ ID NO: 11-27. В некоторых вариантах осуществления кодон-оптимизированная последовательность имеет по меньшей мере 80% идентичности с одной из SEQ ID NO: 11-27. В некоторых вариантах осуществления кодон-оптимизированная последовательность имеет по меньшей мере 85% идентичности с одной из SEQ ID NO: 11-27. В некоторых вариантах осуществления кодон-

оптимизированная последовательность имеет по меньшей мере 90% идентичности с одной из SEQ ID NO: 11-27. В некоторых вариантах осуществления кодон-оптимизированная последовательность имеет по меньшей мере 95% идентичности с одной из SEQ ID NO: 11-27. В некоторых вариантах осуществления кодон-оптимизированная последовательность имеет по меньшей мере 99% идентичности с одной из SEQ ID NO: 11-27.

[0007] В некоторых вариантах осуществления кодон-оптимизированная последовательность идентична одной из SEQ ID NO: 11-27.

[0008] В некоторых вариантах осуществления rAAV кодирует капсид AAV8.

[0009] В некоторых вариантах осуществления капсид rAAV8 представляет собой модифицированный капсид AAV8 с улучшенной тропностью к печени по сравнению с капсидом AAV8 дикого типа.

[0010] В некоторых вариантах осуществления капсид AAV8 имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности с капсидом AAV дикого типа.

[0011] В некоторых вариантах осуществления rAAV дополнительно содержит последовательность посттранскрипционного регуляторного элемента сурков (WPRE).

[0012] В некоторых вариантах осуществления последовательность WPRE представляет собой природную последовательность WPRE.

[0013] В некоторых вариантах осуществления последовательность WPRE представляет собой модифицированную последовательность WPRE. В некоторых вариантах осуществления последовательность WPRE выбрана из WPRE дикого типа, WPRE3 или WPREmut6delATG.

[0014] В некоторых вариантах осуществления rAAV дополнительно содержит специфичный для печени промотор.

[0015] В некоторых вариантах осуществления специфичный для печени промотор представляет собой промотор транстиретина (TTR).

[0016] В некоторых вариантах осуществления rAAV содержит действующий в цис-положении регуляторный модуль (CRM).

[0017] В некоторых вариантах осуществления вектор содержит один, два, три, четыре, пять или более повторов CRM.

[0018] В некоторых вариантах осуществления CRM представляет собой CRM8.

[0019] В некоторых вариантах осуществления rAAV дополнительно содержит интрон выше последовательности PAH.

[0020] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения интрон представляет собой интрон мелкого вируса мышей (MVM).

[0021] В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения ФКУ, включающему введение субъекту, нуждающемуся в лечении, rAAV, содержащего кодон-оптимизированную последовательность, кодирующую фенилаланингидроксилазу человека (PAH), при этом кодон-оптимизированная последовательность имеет по меньшей мере 70% идентичности с одной из SEQ ID NO: 11-

27. В некоторых вариантах осуществления кодон-оптимизированная последовательность, кодирующая PAH, имеет содержание GC от 40% до 80%. Например, в некоторых вариантах осуществления кодон-оптимизированная последовательность, кодирующая PAH, имеет содержание GC около 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% или 80%. В некоторых вариантах осуществления кодон-оптимизированная последовательность, кодирующая PAH, содержит 10 или менее последовательностей CpG-островков. Например, в некоторых вариантах осуществления кодон-оптимизированная последовательность, кодирующая PAH, содержит 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 последовательностей CpG-островков. В некоторых вариантах осуществления кодон-оптимизированная последовательность, кодирующая PAH, содержит менее 6 последовательностей CpG-островков.

[0022] В некоторых вариантах осуществления введение rAAV приводит к снижению уровня фенилаланина (Phe) в плазме у субъекта по сравнению с контролем.

[0023] В некоторых вариантах осуществления введение rAAV приводит к повышению уровня тирозина в плазме у субъекта по сравнению с контролем.

[0024] В некоторых вариантах осуществления введение rAAV приводит к повышению уровня триптофана в плазме у субъекта по сравнению с контролем.

[0025] В некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой уровень Phe в плазме, тирозина в плазме и/или триптофана в плазме до лечения у субъекта.

[0026] В некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой референтный уровень Phe в плазме, тирозина в плазме и/или триптофана в плазме, основанный на ранее полученных данных. Например, ранее полученные данные (например, измерения образца ткани, измерения белка или мРНК) могут быть получены от других пациентов, тех же пациентов (например, до лечения) или от здоровых людей.

[0027] В некоторых вариантах осуществления rAAV вводят в дозе около 1×10^{10} вг/кг, около 1×10^{11} вг/кг, около 1×10^{12} вг/кг, около 1×10^{13} вг/кг, около 1×10^{14} вг/кг или около 1×10^{15} вг/кг.

[0028] В некоторых вариантах осуществления векторы rAAV вводят системно.

[0029] В некоторых вариантах осуществления векторы rAAV вводят внутривенно.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0030] На **Фиг. 1A-1D** представлена серия схематических изображений типичных экспрессионных конструкций, содержащих последовательности, экспрессирующие человеческие PAH дикого типа (дт) и кодон-оптимизированные (ко) PAH (hPAH). Соответствующие последовательности ко hPAH, приведенные в конструкциях экспрессии, представлены в таблице 2. ITR: инвертированный концевой повтор; hTTR: промотор транстиретина человека; CRM: действующий в цис регуляторный модуль; интрон MVM: интрон мелкого вируса мышей; BGH pA: терминатор бычьего гормона роста + полиА; WPRE: посттранскрипционный регуляторный элемент сурков.

[0031] **На Фиг. 2** показан вестерн-блот-анализ экспрессии hPAH в клетках HepG2, инфицированных векторами rAAV8, кодирующими hPAH дт или ко hPAH. Белковые полосы, представляющие белок hPAH, характеризуются размером ~50 кДа.

[0032] На **Фиг. 3А** представлен иллюстративный график, демонстрирующий уровни Phe, Tyr и Trp в плазме на исходном уровне и через 1, 2, 3, 4 и 5 недель после введения rAAV. На **Фиг. 3В** изображен ряд гистограмм, которые демонстрируют эффективность трансдукции *in vivo* (ДНК hPAH) и эффективность транскрипции (РНК hPAH) rAAV8, содержащего либо ко hPAH, либо hPAH дт.

[0033] **На Фиг. 4** показан пример коррекции окраски шерсти у мышей с фенилкетонурией через 3 недели после генной терапии с помощью rAAV8, кодирующего кодон-оптимизированную hPAH.

[0034] На **Фиг. 5** показана дозозависимая эффективность векторов rAAV8, кодирующих кодон-оптимизированную hPAH, в нормализации уровней Phe, Tyr и Trp в плазме и в коррекции окраски шерсти мышей с PAH-KO через 0, 1, 2, 3, 4 и 5 недель после лечения.

[0035] На **Фиг. 6** представлен иллюстративный график, который демонстрирует, что уровни больших нейтральных аминокислот (LNAA) (фенилаланина, тирозина и триптофана) и нейротрансмиттеров (дофамина, серотонина и норадреналина) дисрегулированы в мозге мышей с PAH-KO.

[0036] На **Фиг. 7А** представлен иллюстративный график, демонстрирующий уровни Phe, Tyr и Trp в мозговой ткани мышей с PAH-KO через 5 недель после лечения векторами rAAV8, кодирующими с hPAH, или у не получавших лечение мышей с PAH-KO. На **Фиг. 7В** представлен иллюстративный график, демонстрирующий уровни нейромедиаторов серотонина, норадреналина и дофамина в мозговой ткани мышей с PAH-KO через 5 недель после лечения векторами rAAV8, кодирующими кодон-оптимизированную hPAH, или у не получавших лечение мышей с PAH-KO.

[0037] На **Фиг. 8** представлен иллюстративный график, демонстрирующий исходные уровни Phe в плазме, а также через 7, 14, 35, 56, 98, 140 и 182 дня после введения векторов rAAV, кодирующих кодон-оптимизированную hPAH, в различных дозах мышам с PAH-KO. Уровни Phe у мышей, получавших кодон-оптимизированную hPAH, сравнивают с уровнями у получавших C22 мышей с PAH-KO, и получавших C22 мышей дикого типа.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0038] *Аденоассоциированный вирус (AAV): используемые в данном документы термины «аденоассоциированный вирус» или «AAV» или рекомбинантный AAV («rAAV») включают, но не ограничиваются ими, AAV типа 1, AAV типа 2, AAV типа 3 (включая типы 3А и 3В), AAV типа 4, AAV типа 5, AAV типа 6, AAV типа 7, AAV типа 8, AAV типа 9, AAV типа 10, AAV типа 11, AAV птиц, AAV крупного рогатого скота, AAV собак, лошадиный AAV и овечий AAV (см., например,* Fields et al., Virology, том 2, глава 69 (4-е изд., Lippincott-Raven Publishers); Gao et al., J. Virology 78:6381-6388 (2004); Mori et al., Virology 330:375-383 (2004)). Как правило, AAV может инфицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки и может находиться во внехромосомном состоянии, не интегрируясь в геном клетки-хозяина. Векторы на основе AAV, как правило, используются в генной терапии. AAV также включает кодон-оптимизированный AAV.

[0039] *Введение*: Используемые в данном документе термины «введение», «доставку» или «внесение» используются взаимозаменяемо в контексте доставки векторов на основе rAAV, кодирующих PAH, субъекту способом или путем, которые приводят к эффективной доставке вектора на основе rAAV. В данной области техники известны различные способы введения векторов на основе rAAV, включая, например,

внутривенное, подкожное или чрескожное введение. Трансдермальное введение вектора на основе rAAV можно осуществлять с использованием «генной пушки» или биолистической системы доставки частиц. В некоторых вариантах осуществления векторы rAAV вводят с помощью невирусных липидных наночастиц.

[0040] *Животное:* Используемый в данном документе термин «животное» относится к любому члену царства животных. В некоторых вариантах осуществления «животное» относится к людям на любой стадии развития. В некоторых вариантах осуществления «животное» относится к отличным от человека животным на любой стадии развития. В определенных вариантах осуществления отличное от человека животное представляет собой млекопитающее (например, грызун, мышь, крысу, кролик, обезьяну, собаку, кошку, овцу, крупный рогатый скот, примат и/или свинью). В некоторых вариантах осуществления животные включают, но не ограничиваются ими, млекопитающих, птиц, рептилий, амфибий, рыб, насекомых и/или червей. В некоторых вариантах осуществления животное может быть трансгенным животным, генно-модифицированным животным и/или клоном.

[0041] *Приблизительно или около* : В контексте данного документа термин «приблизительно» или «около» применительно к одному или большему количеству значений, представляющим интерес, относится к значению, которое аналогично установленному эталонному значению. В некоторых вариантах осуществления термин «приблизительно» или «около» относится к диапазону значений, которые попадают в пределы 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или менее в любую сторону (больше или меньше) от установленного эталонного значения, если не указано иное или иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число превышало бы 100 % от возможного значения).

[0042] *Активный*: Используемый в данном документе термин «активный» относится к характеристике любого агента, обладающего активностью в биологической системе и, в частности, в организме. Например, агент, который при введении в организм оказывает на этот организм биологическое действие, считается активным или биологически активным. В конкретных вариантах осуществления, где пептид является активным или биологически активным, часть этого пептида, которая обладает по меньшей мере одной биологической активностью пептида, обычно называется «активной» частью.

[0043] *Функциональный эквивалент или производное*: Используемый в данном документе термин «функциональный эквивалент» или «функциональное производное» обозначает в контексте функционального производного аминокислотной последовательности молекулу, которая сохраняет биологическую активность (либо функциональную, либо структурную), которая является практически аналогичной исходной последовательности. Функциональное производное или эквивалент может быть природным производным или может быть получено синтетическим путем. Иллюстративные функциональные производные включают аминокислотные последовательности, имеющие замены, делеции или добавления одной или более аминокислот, при условии, что биологическая активность белка сохраняется. Желательно, чтобы замещающая аминокислота имела химико-физические свойства, подобные свойствам замещающей аминокислоты. Желательные сходные химико-физические свойства включают сходство заряда, объемность, гидрофобность, гидрофильность и т.п.

[0044] *In vitro : Используемый в данном документе термин «in vitro» относится к событиям, которые происходят в искусственной среде, например, в пробирке или реакционном сосуде, в культуре клеток и т. д., а не в многоклеточном организме.*

[0045] *In vivo : Используемый в данном документе термин « in vivo» относится к событиям, которые происходят в многоклеточном организме, таком как человек и отличное от человека животное. В контексте систем на основе клеток данный термин может использоваться для обозначения событий, которые происходят внутри живой клетки (в отличие, например, от систем in vitro).*

[0046] *IRES: Используемый в данном документе термин «IRES» относится к любой подходящей последовательности участка внутренней посадки рибосомы.*

[0047] *Выделенный:* В контексте данного документа термин «выделенный» относится к веществу и/или объекту, которые были (1) отделены по меньшей мере от некоторых компонентов, с которыми они были связаны при первоначальной выработке (в природе и/или в экспериментальных условиях), и/или (2) получены, изготовлены и/или произведены человеком. Выделенные вещества и/или объекты могут быть отделены по меньшей мере от около 10%, около 20%, около 30%, около 40%, около 50%, около 60%, около 70%, около 80%, около 90%, около 95%, около 98%, около 99%, по существу 100% или 100% других компонентов, с которыми они были первоначально связаны. В некоторых вариантах осуществления выделенные агенты составляют более около 80%, около 85%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99%, по существу 100% или 100% чистоты. Как используется в данном документе вещество является «чистым», если оно по существу не содержит других компонентов. Используемый в данном документе термин «выделенная клетка» относится к клетке, не содержащейся в многоклеточном организме.

[0048] *Полипептид*: Термин «полипептид», используемый в данном документе, относится к последовательной цепи аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. Этот термин используется для обозначения аминокислотной цепи любой длины, но средний специалист в данной области техники поймет, что термин не ограничен длинными цепями и может относиться к минимальной цепи, включающей две аминокислоты, связанные вместе посредством пептидной связи. Как известно специалистам в данной области техники, полипептиды могут быть процессированы и/или модифицированы.

[0049] *Белок*: Используемый в данном документе термин «белок» относится к одному или более полипептидам, которые функционируют как дискретные единицы. Если один полипептид представляет собой дискретную функциональную единицу и не требует постоянной или временной физической ассоциации с другими полипептидами для формирования дискретной функциональной единицы, термины «полипептид» и «белок» могут использоваться взаимозаменяемо. Если дискретная функциональная единица состоит из более чем одного полипептида, которые физически связаны друг с другом, термин «белок» относится к множеству полипептидов, которые физически связаны и функционируют вместе как дискретная единица.

[0050] *Регуляторный элемент*: Используемый в данном документе термин «регуляторный элемент» относится к элементам контроля транскрипции, в частности, к некодирующим действующим в цис-положении элементам контроля транскрипции, способным регулировать и/или контролировать транскрипцию гена. Регуляторные элементы содержат по меньшей мере один сайт связывания фактора транскрипции, например, по меньшей мере один сайт связывания тканеспецифического фактора транскрипции. В вариантах осуществления, описанных в данном документе, регуляторные элементы имеют по меньшей мере один сайт связывания фактора транскрипции, специфичного для печени. Как правило, регуляторные элементы увеличивают или усиливают управляемую промотором экспрессию гена по сравнению с транскрипцией гена только с промотором, без регуляторных элементов. Таким образом,

регуляторные элементы, в частности, включают энхансерные последовательности, хотя следует понимать, что регуляторные элементы, усиливающие транскрипцию, не ограничиваются иллюстративными расположенными выше против хода транскрипции энхансерными последовательностями, но могут встречаться на любом расстоянии от гена, который они регулируют. Как известно в данной области техники, последовательности, регулирующие транскрипцию, могут располагаться либо выше (например, в промоторной области), либо ниже (например, в 3'-UTR) гена, который регулируется in vivo, и могут располагаться в непосредственной близости от гена или дальше. Регуляторные элементы могут включать либо встречающиеся в природе последовательности, комбинации (части) таких регуляторных элементов, либо несколько копий регуляторного элемента, например, не встречающиеся в природе последовательности. Соответственно, регуляторные элементы включают встречающиеся в природе и оптимизированные или сконструированные регуляторные элементы для достижения желаемого уровня экспрессии.

[0051] *Субъект*: Используемый в данном документе термин «субъект» относится к человеку или любому животному, отличному от человека (например, мыши, крысе, кролику, собаке, кошке, крупного рогатого скоту, свиньям, овцам, лошадям или приматам). Понятие человек включает пре- и постнатальные формы. Во многих вариантах осуществления субъект представляет собой человека. Субъектом может представлять собой пациента, который относится к человеку, представленному медицинскому учреждению для диагностики или лечения заболевания. Термин «субъект» применяется в данном документе взаимозаменяемо с «индивидом» или «пациентом». Субъект может быть поражен или являться предрасположенным к заболеванию или нарушению, но может и не иметь симптомов заболевания или нарушения.

[0052] *По существу*: Используемый в данном документе термин «по существу» относится к качественному состоянию, демонстрирующему общую или почти полную степень или степень представляющей интерес характеристики или свойства. Специалист в области биологических наук поймет, что биологические и химические явления редко, если вообще когда-либо, доходят до завершения и/или переходят к завершению, достижению или избеганию абсолютного результата. Таким образом, термин «по существу» используется в данном документе для обозначения потенциального недостатка полноты, присущей многим биологическим и химическим явлениям.

[0053] *Существенная гомология*: Фраза «существенная гомология» используется в данном документе для обозначения сравнения между последовательностями аминокислот или нуклеиновых кислот. Как будет понятно специалистам в данной области техники, две последовательности обычно считаются «по существу гомологичными», если они содержат гомологичные остатки в соответствующих положениях. Гомологичные остатки могут быть идентичными остатками. В качестве альтернативы, гомологичные остатки могут быть неидентичными остатками, имеющими подходящие сходные структурные и/или функциональные характеристики. Например, как известно специалистам в данной области техники, некоторые аминокислоты обычно классифицируют как «гидрофобные» или «гидрофильные» аминокислоты и/или как имеющие «полярные» или «неполярные» боковые цепи. Замена одной аминокислоты на другую того же типа часто может считаться «гомологичной» заменой.

[0054] Как хорошо известно в данной области техники, последовательности аминокислот или нуклеиновых кислот можно сравнивать с использованием любого из множества алгоритмов, в том числе доступных в коммерческих компьютерных программах, таких как BLASTN для нуклеотидных последовательностей и BLASTP, Gapped BLAST и PSI-BLAST для аминокислотных последовательностей.

Примеры таких программ описаны у Altschul, et al., basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, 215(3): 403-410, 1990; Altschul, et al., *Methods in Enzymology*; Altschul, et al., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs," *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997; Baxevanis, et al., Bioinformatics: *A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; и Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols* (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999. В дополнение к идентификации гомологичных последовательностей упомянутые выше программы, как правило, обеспечивают указание степени гомологии. В некоторых вариантах осуществления две последовательности считаются по существу гомологичными, если по меньшей мере, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более их соответствующих остатков идентичными на соответствующем участке остатков. В некоторых вариантах осуществления соответствующий участок представляет собой полную последовательность. В некоторых вариантах осуществления соответствующий участок составляет по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 или более остатков.

[0055] *Существенная идентичность*: Фраза «существенная идентичность» используется в данном документе для обозначения сравнения между последовательностями аминокислот или нуклеиновых кислот. Как будет понятно специалистам в данной области техники, две последовательности, как правило, считаются «по существу идентичными», если они содержат идентичные остатки в соответствующих положениях. Как хорошо известно в данной области техники, последовательности аминокислот или нуклеиновых кислот можно сравнивать с использованием любого из множества алгоритмов, в том числе доступных в коммерческих компьютерных программах, таких как BLASTN для нуклеотидных последовательностей и BLASTP, gappeDBLAST и PSI-BLAST для аминокислотных последовательностей. Примеры таких программ описаны в Altschul, et al., Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, 215(3): 403-410, 1990; Altschul, *et al.*, *Methods in Enzymology*; Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997; Baxevanis *et al.*, Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; и Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999. В дополнение к идентификации идентичных последовательностей программы, упомянутые выше, обычно предоставляют указание степени идентичности. В некоторых вариантах осуществления две последовательности считаются по существу идентичными, если по меньшей мере, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более их соответствующих остатков идентичны на соответствующем участке остатков. В некоторых вариантах осуществления соответствующий участок представляет собой полную последовательность. В некоторых вариантах осуществления соответствующий участок составляет по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 или более остатков.

[0056] *Страдает от:* У индивидуума, который «страдает» от заболевания, нарушения и/или патологического состояния, было диагностировано или он имеет один или более симптомов заболевания, расстройства и/или патологического состояния.

[0057] *Терапевтически эффективное количество*: Используемый в данном документе термин «терапевтически эффективное количество» терапевтического агента означает количество, которое является достаточным при введении субъекту, страдающему или подверженному заболеванию, нарушению и/или патологическому состоянию, для лечения, диагностики, предотвращения и/или задержки проявления

симптома(-ов) заболевания, нарушения и/или патологического состояния. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что терапевтически эффективное количество обычно вводят посредством схемы применения, включающей по меньшей мере одну стандартную дозу.

[0058] *Лечение*:Используемый в данном документе термин «лечить», «лечение» или «процесс лечения» относится к любому способу, используемому для частичного или полного облегчения, ослабления, улучшения, подавления, предотвращения, задержки проявления, уменьшения тяжести и/или уменьшения частоты возникновения одного или более симптомов или признаков конкретного заболевания, расстройства и/или патологического состояния. Лечение может быть назначено субъекту, у которого нет признаков заболевания и/или выявляются только ранние признаки заболевания с целью снижения риска развития патологии, связанной с заболеванием.

[0059] Перечисление числовых диапазонов по конечным точкам в данном документе включает все числа и дроби, входящие в этот диапазон (например, от 1 до 5 включает 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,9, 4 и 5). Также следует понимать, что предполагается, что все числа и их доли модифицированы термином «около».

[0060] Различные аспекты изобретения подробно описаны в следующих разделах. Использование разделов не предназначено для ограничения данного изобретения. Каждый раздел может относиться к любому аспекту данного изобретения. В данной заявке использование «или» означает «и/или», если не указано иное. В контексте данного документа формы единственного числа включают ссылки на формы как единственного, так и множественного числа, если из контекста явно следует иное.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0061] Настоящее изобретение обеспечивает, среди прочего, способы и композиции для лечения ФКУ с использованием векторов rAAV, которые кодируют фенилаланингидроксилазу (PAH) дикого типа или кодон-оптимизированную гидроксилазу. В частности, настоящее изобретение относится к способу лечения ФКУ путем введения rAAV, содержащего последовательность дикого типа или кодон-оптимизированную последовательность, кодирующую PAH человека, в эффективной дозе, такой, что по меньшей мере один симптом или признак ФКУ снижается по интенсивности, степени тяжести, или частоте. Описанный в данном документе метод генной терапии оказался особенно эффективным для нормализации уровня фенилаланина.

Фенилкетонурия (ФКУ)

[0062] Настоящее изобретение может быть использовано для лечения субъекта, страдающего ФКУ или предрасположенного к ней. ФКУ является аутосомно-рецессивным метаболическим генетическим заболеванием, характеризующимся мутацией в гене печеночного фермента PAH, что делает его нефункциональным. PAH необходима для метаболизма аминокислоты фенилаланина (Phe) в аминокислоту тирозин. Когда активность PAH снижается, фенилаланин накапливается и превращается в фенилпируват (также известный как фенилкетон), который можно обнаружить в моче.

[0063] Фенилаланин представляет собой большую нейтральную аминокислоту (LNAA). LNAA конкурируют за транспорт через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) через переносчик больших нейтральных аминокислот (LNAAT). Избыток Phe в крови насыщает переносчик и имеет тенденцию к снижению уровня других LNAA в мозге. Поскольку некоторые из этих других аминокислот необходимы для

синтеза белков и нейротрансмиттеров, накопление Phe препятствует развитию мозга и может вызвать умственную отсталость.

[0064] В дополнение к задержке развития головного мозга заболевание может клинически проявляться в виде различных симптомов, включая судороги, альбинизм, гиперактивность, задержку роста, кожную сыпь (экзему), микроцефалию и/или «затхлый» запах пота и мочи больного ребенка, из-за фенилацетата, одного из образующихся кетонов. Дети, не получавшие лечения, как правило, рождаются нормальными, но имеют задержку развития умственных и социальных навыков, размер головы значительно ниже нормы и часто демонстрируют прогрессирующие нарушения мозговой функции. По мере роста и развития ребенка, как правило, развиваются дополнительные симптомы, в том числе гиперактивность, подергивания рук или ног, аномалии ЭЭГ, кожная сыпь, тремор, судороги и тяжелые нарушения обучаемости. ФКУ обычно включают в рутинный скрининг новорожденных в большинстве стран, который обычно проводится через 2-7 дней после рождения.

[0065] Если ФКУ диагностирована достаточно рано, больной новорожденный может расти с относительно нормальным развитием мозга, но только при условии поддержания и контроля уровня Phe с помощью диеты или сочетания диеты и лекарств. Все пациенты с ФКУ должны придерживаться специальной диеты с низким содержанием Phe для оптимального развития мозга. Диета требует строгого ограничения или исключения продуктов с высоким содержанием Phe, таких как мясо, курица, рыба, яйца, орехи, сыр, бобовые, молоко и другие молочные продукты. Крахмалистые продукты, такие как картофель, хлеб, макароны и кукуруза, должны быть под контролем. Младенцы все еще могут быть на грудном вскармливании, чтобы получить все преимущества грудного молока, но его количество также необходимо контролировать, и потребуются добавки для восполнения недостающих питательных веществ. Подсластитель аспартам, присутствующий во многих диетических продуктах и безалкогольных напитках, также следует избегать, так как аспартам содержит фенилаланин.

[0066] На протяжении всей жизни пациенты могут использовать дополнительные смеси, таблетки или специально разработанные продукты для получения аминокислот и других необходимых питательных веществ, которые в противном случае были бы дефицитными при диете с низким содержанием фенилаланина. Некоторое количество Phe требуется для синтеза многих белков и необходимо для надлежащего роста, но уровни Phe должны строго контролироваться у пациентов с фенилкетонурией. Кроме того, пациенты с фенилкетонурией должны принимать добавки тирозина, который обычно получают из фенилаланина. Другие добавки могут включать рыбий жир, чтобы заменить длинноцепочечные жирные кислоты, отсутствующие в стандартной диете без Phe, и улучшить неврологическое развитие, а также железо или карнитин.

[0067] Другой потенциальной терапией ФКУ является тетрагидробиоптерин (BH4), кофактор для окисления Phe, который может снижать уровень Phe в крови у некоторых пациентов. Пациенты, которые отвечают на терапию BH4, также могут увеличить количество натурального белка, который они могут потреблять. Однако терапия BH4 не решает фундаментальной проблемы дефицита PAH и подходит только для 10% пациентов с ФКУ. Таким образом, в настоящее время отсутствует эффективное лечение ФКУ с повышенной безопасностью и снижением дозы, которое не вызывает подавления иммунитета.

Дизайн векторов rAAV PAH

[0068] В некоторых аспектах в данном документе предложен вектор на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), кодирующий белок фенилаланингидроксилазу (PAH). Схема, которая иллюстрирует иллюстративные векторы rAAV по настоящему изобретению, проиллюстрирована на Фиг. 1B. Как показано на Фиг. 1B, в некоторых вариантах осуществления вектор rAAV по настоящему изобретению содержит специфичный для печени промотор, 5'- и 3'-концевой инвертированный повтор (ITR), действующий в цис-положении регуляторный модуль (CRM), и интрон.

[0069] Последовательность PAH вектора может быть вариантом дикого типа или кодон-оптимизированным вариантом. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления вектор на основе rAAV содержит нуклеотидную последовательность PAH дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV содержит кодон-оптимизированную последовательность PAH.

[0070] Подходящий PAH для настоящего изобретения представляет собой любой белок или часть белка, который может заменить, по меньшей мере, частичную активность природного белка фенилаланингидроксилазы (PAH) или восстановить один или более фенотипов или симптомов, связанных с дефицитом PAH.

[0071] В некоторых вариантах осуществления подходящая нуклеотидная последовательность PAH для настоящего изобретения содержит последовательность PAH, кодирующую белок hPAH дикого типа (GenBank U49897, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления подходящая нуклеотидная последовательность PAH для настоящего изобретения включает кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий белок PAH дикого типа. Аминокислотная последовательность природной PAH человека показана в таблице 1:

Таблица 1. PAH человека

PAH человека (Амино-кислотная последова-тельность)	MSTAVLENPGLGRKLSDFGQETSYIEDNCNQNGAISLIFSLKEEVGALAKVLRLFEEND VNLTHIESRPSRLKKDEYEFFTHLDKRSLPALTNIIKILRHDIGATVHELSRDKKKDTVP WFPRTIQELDRFANQILSYGAELDADHPGFKDPVYRARRKQFADIAYNYRHGQPIPRVE YMEEEKKTWGTVFKTLKSLYKTHACYEYNHIFPLLEKYCGFHEDNIPQLEDVSQFLQT CTGFRLRPVAGLLSSRDFLGGLAFRVFHCTQYIRHGSKPMYTPEPDICHELLGHVPLFSD RSFAQFSQEIGLASLGAPDEYIEKLATIYWFTVEFGLCKQGDSIKAYGAGLLSSFGELQY CLSEKPKLLPLELEKTAIQNYTVTEFQPLYYVAESFNDAKEKVRNFAATIPRPFSVRYDP YTQRIEVLDNTQQLKILADSINSEIGILCSALQKIK (SEQ ID NO:1)

[0072] В описанном в данном документе векторе rAAV можно использовать различные виды промоторов. К ним относятся, например, универсальные, тканеспецифичные и регулируемые (например, индуцибельные или репрессируемые) промоторы. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой специфичный для печени промотор. Примеры специфичных для печени промоторов известны в данной области техники и включают, например, промотор транстиретина человека (hTTR), промотор α-антитрипсина, профактор IX человека/олигомеры, чувствительные к фактору транскрипции печени, LSP и основной промотор альбумина. Специфичные для печени промоторы описаны, например, в

Zhijian Wu *et al.*, *Molecular Therapy* vol 16, no 2, February 2008, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки.

[0073] В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой универсальный промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор куриного бета-актина.

[0074] В некоторых вариантах осуществления вектор на основе rAAV содержит дополнительные энхансерные или регуляторные элементы для стимуляции транскрипции и/или трансляции мРНК (например, энхансерные последовательности, последовательности Козак, последовательности полиаденилирования, последовательности терминации транскрипции, IRES и т.п.). В некоторых вариантах осуществления вектор содержит 5'- и 3'-концевой инвертированный повтор (ITR). В некоторых вариантах осуществления вектор содержит один или более энхансерных элементов. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит поли(A)-хвост.

[0075] В некоторых вариантах осуществления вектор на основе rAAV содержит один или более небольших элементов, таких как интрон. В данной области техники известны различные интроны. Подходящие интроны для описанного в данного документе вектора на основе rAAV включают, например, интрон MVM, укороченный интрон F.IX, химерный интрон β-глобина SD/SA тяжелой цепи иммуноглобулина, интрон SV40 и/или 1-й интрон альфа-глобина. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе rAAV содержит интрон MVM. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе rAAV содержит интрон SV40.

[0076] В некоторых вариантах осуществления вектор на основе rAAV содержит посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE). В данной области техники известны различные оптимизированные или вариантные формы WPRE, в том числе WPRE3, WPREmut6delATG и другие.

[0077] В некоторых вариантах осуществления вектор на основе rAAV содержит действующий в цис-положении регуляторный модуль (CRM). Различные типы CRM подходят для использования в векторах, описанных в данном документе, и включают, например, специфичный для печени CRM, специфичный для нейронов CRM и/или CRM8. В некоторых вариантах осуществления вектор включает более одного CRM. Например, в некоторых вариантах осуществления вектор содержит два, три, четыре, пять или шесть CRM. В некоторых вариантах вектор содержит три CRM, например три CRM8.

[0078] В некоторых вариантах осуществления вектор на основе rAAV оптимизирован по последовательности для повышения стабильности транскрипта, более эффективной трансляции и/или для снижения иммуногенности. В некоторых вариантах осуществления PAH оптимизирована по последовательности.

[0079] В некоторых вариантах осуществления вектор на основе rAAV представляет собой вектор на основе AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 или AAV11. В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV представляет собой AAV1. В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV представляет собой AAV2. В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV представляет собой AAV3. В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV представляет собой AAV4. В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV представляет собой AAV5. В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV представляет собой AAV6. В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV представляет

собой AAV7. В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV представляет собой AAV8. В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV представляет собой AAV9. В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV представляет собой AAV10. В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV представляет собой AAV11. В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV оптимизирован по последовательности. В некоторых вариантах осуществления капсид rAAV модифицирован. Например, в некоторых вариантах осуществления капсид rAAV8 модифицирован.

[0080] Иллюстративные последовательности элементов показаны в таблице 2 ниже. В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV содержит векторный элемент rAAV, содержащий нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности с последовательностью векторного элемента, приведенной в **таблице 2**. В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV содержит нуклеотидную последовательность векторного элемента, идентичную нуклеотидной последовательности векторного элемента, приведенной в **таблице 2**.

Таблица 2. Иллюстративные последовательности элементов rAAV

3xCRM8
GGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGGTCACCCCAGTTATCGGAGGAGCAAACAGGGGCTAAGTCCACCGGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGGTCACCCCAGTTATCGGAGGAGCAAACAGGGGCTAAGTCCACCGGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGGTCACCCCAGTTATCGGAGGAGCAAACAGGGGCTAAGTCCAC (SEQ ID NO: 2)
промотор hTTR
AAATGACCTATTAAGAATATTTCATAGAACGAATGTTCCGATGCTCTAATCTCTCTAGACAAGGTTCATATTTGTATGGGTTACTTATTCTCTCTTTGTTGACTAAGTCAATAATCAGAATCAGCAGGTTTGCAGTCAGATTGGCAGGGATAAGCAGCCTAGCTCAGGAGAAGTGAGTATAAAAGCCCCAGGCTGGGAGCAGCCATCACAGAAGTCCACTCATTCTTGGCAGG (SEQ ID NO: 3)
интрон MVM
CTAAGGTAAGTTGGCGCCGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATTAATGTTTAATTACCTTTTTTACAGGCCTG (SEQ ID NO: 4)
WPRE3
aatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggtattcttaactatgttgctccttttacgctatgtggatacgctgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctccttgtataaatcctggttagttcttgccacggcggaactcatcgccgcctgccttgcccgctgctggacaggggctcggctgttgggcactgacaattccgtggtgtt (SEQ ID NO: 5)

WPREmut6delATG
GATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTTTGTTGCTCCTTT TACGCTTTGTGGATACGCTGCTTTATTGCCTTTGTATCTTGCTATTGCTTCCCGTTTGGCTTTCATTTT CTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTTTGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTG GCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCT CCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCC GCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGT CCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCT TCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCT TCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCGGACTAG (SEQ ID NO: 6)
WPRE
ACCAGGTTCTGTTCCTGTTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTT AACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTC CCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGC CCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCCTGGTTGGGGCATT GCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCAT CGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTG TCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGT CCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTG CGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCC TGTTTCGCCTCGGGCTCCTCGAG (SEQ ID NO: 7)
BGH pA
CCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCC CGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCA TCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAG GATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGAA (SEQ ID NO: 8)
3’ ITR
AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCG ACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAG A (SEQ ID NO: 9)
5’ ITR

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGC
CCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT

(SEQ ID NO: 10)

Кодон-оптимизированная человеческая PAH – 01

atgtccactgcggtcctggaaaacccaggcttgggcaggaaactctctgactttggacaggaaacaagctatattgaagacaactgcaatcaaaatggtgccatatca
ctgatcttctcactcaaagaagaagttggtgcattggccaaagtattgcgcttatttgaggagaatgatgtaaacctgacccacattgaatctagaccttctcgtttaaaga
aagatgagtatgaatttttcacccatttggataaacgtagcctgcctgctctgacaaacatcatcaagatcttgaggcatgacattggtgccactgtccatgagctttcac
gagataagaagaaagacacagtgccctggttcccaagaaccattcaagagctggacagatttgccaatcagattctcagctatggagcggaactggatgctgacca
ccctggttttaaagatcctgtgtaccgtgcaagacggaagcagtttgctgacattgcctacaactaccgccatgggcagcccatccctcgagtggaatacatggagga
agaaaagaaaacatggggcacagtgttcaagactctgaagtccttgtataaaacccatgcttgctatgagtacaatcacatttttccacttcttgaaaagtactgtggcttc
catgaagataacattccccagctggaagacgtttctcaattcctgcagacttgcactggtttccgcctccgacctgtggctggcctgctttcctctcgggatttcttgggtg
gcctggccttccgagtcttccactgcacacagtacatcagacatggatccaagcccatgtataccccgaacctgacatctgccatgagctgttgggacatgtgccctt
gttttcagatcgcagctttgcccagttttcccaggaaattggccttgcctctctgggtgcacctgatgaatacattgaaaagctcgccacaatttactggtttactgtggagt
ttgggctctgcaaacaaggagactccataaaggcatatggtgctgggctcctgtcatcctttggtgaattacagtactgcttatcagagaagccaaagcttctccccctg
gagctggagaagacagccatccaaaattacactgtcacggagttccagcccctgtattacgtggcagagagttttaatgatgccaaggagaaagtaaggaactttgct
gccacaatacctcggcccttctcagttcgctacgacccatacacccaaaggattgaggtcttggacaatacccagcagcttaagattttggctgattccattaacagtga
aattggaatcctttgcagtgccctccagaaaataaagtag

(SEQ ID NO: 11)

Кодон-оптимизированная человеческая PAH – 03

atgagcactgctgtgctggagaaccctggcctgggcaggaaactgagtgactttggccaggagaccagctacattgaggacaactgcaaccagaatggagccatc
agcctgatcttcagcctgaaggaggaggtgggagccctggccaaggtgctgaggctgtttgaggagaatgatgtgaacctgacccacattgagagcaggcccagc
aggctgaagaaggatgagtatgagttcttcacccacctggacaagaggagcctgcctgccctgaccaacatcatcaagatcctgaggcatgacattggagccacag
tgcatgagctgagcagggacaagaagaaggacacagtgccctggttccccaggaccatccaggagctggacaggtttgccaaccagatcctgagctatggagctg
agctggatgctgaccaccctggcttcaaggaccctgtgtacagggccaggaggaagcagtttgctgacattgcctacaactacaggcatggccagcccatccccag
ggtggagtacatggaggaggagaagaagacctggggcacagtgttcaagaccctgaagagcctgtacaagacccatgcctgctatgagtacaaccacatcttccc
cctgctggagaagtactgtggcttccatgaggacaacatcccccagctggaggatgtgagccagttcctgcagacctgcacaggcttcaggctgaggcctgtggct
ggcctgctgagcagcagggacttcctgggaggcctggccttcagggtgttccactgcacccagtacatcaggcatggcagcaagcccatgtacacccctgagcct
gacatctgccatgagctgctgggccatgtgcccctgttcagtgacaggagctttgcccagttcagccaggagattggcctggccagcctgggagcccctgatgagta
cattgagaagctggccaccatctactggttcacagtggagtttggcctgtgcaagcagggagacagcatcaaggcctatggagctggcctgctgagcagctttggag
agctgcaatactgcctgagtgagaagcccaagctgctgcccctggagctggagaagacagccatccagaactacacagtgacagagttccagcccctgtactatgt
ggctgagagcttcaatgatgccaaggagaaagtgaggaactttgctgccaccatccccaggcccttcagtgtgaggtatgacccctacacccagaggattgaggtg
ctggacaacacccagcagctgaagatcctggctgacagcatcaacagtgagattggcatcctgtgcagtgccctgcagaagatcaagtag

(SEQ ID NO: 12)

Кодон-оптимизированная человеческая PAH – 04

atgtccactgcagtcctggagaacccaggcttgggcaggaaactctctgactttggacaggagaccagctatattgaagacaactgcaaccaaaatggtgccatctc
cctgatcttctccctcaaagaggaagtgggtgcattggccaaagtcttgaggctttttgaggagaatgatgtcaacctgacccacattgagtctagaccttctaggcttaa
gaaagatgagtatgagtttttcacccacttggataaaaggagcctgcctgctctgaccaacatcatcaagatcttgaggcatgacattggtgccactgtccatgagcttt
ccagggataagaagaaagacacagtgccctggttcccaagaaccatccaagagctggacagatttgccaaccagatcctcagctatggagcagaactggatgctg

accaccctggcttcaaagatcctgtgtacagggcaagaagaaagcagtttgctgacattgcctacaactacaggcatgggcagcccatccctagggtggaatacatg gaggaggaaaagaaaacctggggcacagtgttcaagaccctgaagtccttgtataaaacccatgcttgctatgagtacaaccacatctttccacttcttgagaagtact gtggcttccatgaagataacatcccccagctggaggatgtgtctcagttcctgcagacctgcactggcttcaggctcaggcctgtggctggcctgctttcctctagaga tttcttgggtggcctggccttcagggtcttccactgcacacagtacatcagacatggatccaagcccatgtatacccctgaacctgacatctgccatgagctgttgggac atgtgcccttgttttcagataggagctttgcccagttctcccaggagattggccttgcctctctgggtgcacctgatgaatacattgagaagctggccaccatctactggtt cactgtggagtttgggctctgcaaacaaggagactccatcaaggcatatggtgctgggctcctgtcatcctttggtgaacttcagtactgcctttcagagaagccaaag cttctccccctggagctggagaagacagccatccaaaactacactgtcacagagttccagcccctctattatgtggcagagagcttcaatgatgccaaggagaaagtc aggaactttgctgccaccatacctagacccttctcagtgaggtatgacccatacacccaaaggattgaggtcttggacaacacccagcaacttaagatcttggctgatt ccatcaacagtgagattggaatcctttgcagtgccctccagaaaatcaagtag (SEQ ID NO: 13)
Кодон-оптимизированная человеческая PAH – 05
atgtccactgctgtcctggagaacccaggcttgggcaggaagctctctgactttgggcaggagaccagctacattgaggacaactgcaaccagaatggggccatct ccctgatcttctccctcaaggaggaagtgggggccctggccaaggtgttgaggctgtttgaggaaaatgatgtgaacctgacccacattgagtccagaccctccagg ctgaagaaggatgagtatgagttcttcacccacttggacaagaggagcctgcctgccctgaccaacatcatcaaaatcttgaggcatgacattggggccactgtccat gagctgtccagggacaagaaaaaggacacagtgccctggttccccagaaccatccaggagctggacagatttgccaaccagatcctcagctatggggctgagctg gatgctgaccaccctggcttcaaggaccctgtgtacagggccagaagaaagcagtttgctgacattgcctacaactacaggcatgggcagcccatccccagggtgg agtacatggaggaagagaaaaagacctggggcacagtgttcaagaccctgaagtccttatacaagacccatgcctgctatgagtacaaccacatcttccccctcctg gagaagtactgtggcttccatgaggacaacatcccccagctggaggatgtctcccagttcctgcagacctgcactggcttcaggctcaggcctgtggctggcctcct gtcctccagagacttcttgggaggcctggccttcagggtcttccactgcacacagtacatcagacatggctccaagcccatgtacacccctgagcctgacatctgcca tgagctgttgggccatgtgcccttgttctcagacaggagctttgcccagttctcccaggagattggcctggcctccctgggagcccctgatgagtacattgagaagctg gccaccatctactggttcactgtggagtttgggctctgcaagcagggggactccatcaaggcctatggggctgggctcctgtcatcctttggggagctgcaatactgc ctgtcagagaagcccaagctgctccccctggagctggagaagacagccatccagaactacactgtcactgagttccagcccctctactatgtggctgagagtttcaat gatgccaaggagaaagtgaggaactttgctgccaccatccctagacccttctcagtcaggtatgacccctacacccagaggattgaggtcttggacaacacccagca gctgaagatcttggctgactccatcaacagtgagattggcatcctgtgcagtgccctccagaagatcaagtag (SEQ ID NO: 14)
Кодон-оптимизированная человеческая PAH – 06
atgagcaccgccgtgctggagaaccccggcctgggccgcaagctgagcgacttcggccaggagaccagctacatcgaggacaactgcaaccagaacggcgcc atcagcctgatcttcagcctgaaggaggaggtgggcgccctggccaaggtgctgcgcctgttcgaggagaacgacgtgaacctgacccacatcgagagccgccc cagccgcctgaagaaggacgagtacgagttcttcacccacctggacaagcgcagcctgcccgccctgaccaacatcatcaagatcctgcgccacgacatcggcg ccaccgtgcacgagctgagccgcgacaagaagaaggacaccgtgccctggttcccccgcaccatccaggagctggaccgcttcgccaaccagatcctgagctac ggcgccgagctggacgccgaccaccccggcttcaaggaccccgtgtaccgcgcccgccgcaagcagttcgccgacatcgcctacaactaccgccacggccagc ccatcccccgcgtggagtacatggaggaggagaagaagacctggggcaccgtgttcaagaccctgaagagcctgtacaagacccacgcctgctacgagtacaac cacatcttccccctgctggagaagtactgcggcttccacgaggacaacatcccccagctggaggacgtgagccagttcctgcagacctgcaccggcttccgcctgc gccccgtggccggcctgctgagcagccgcgacttcctgggcggcctggccttccgcgtgttccactgcacccagtacatccgccacggcagcaagcccatgtaca cccccgagcccgacatctgccacgagctgctgggccacgtgcccctgttcagcgaccgcagcttcgcccagttcagccaggagatcggcctggccagcctgggc gcccccgacgagtacatcgagaagctggccaccatctactggttcaccgtggagttcggcctgtgcaagcagggcgacagcatcaaggcctacggcgccggcct gctgagcagcttcggcgagctgcagtactgcctgagcgagaagcccaagctgctgcccctggagctggagaagaccgccatccagaactacaccgtgaccgagt tccagcccctgtactacgtggccgagagcttcaacgacgccaaggagaaggtgcgcaacttcgccgccaccatcccccgccccttcagcgtgcgctacgacccct acacccagcgcatcgaggtgctggacaacacccagcagctgaagatcctggccgacagcatcaacagcgagatcggcatcctgtgcagcgccctgcagaagatc aagtag

(SEQ ID NO: 15)

Кодон-оптимизированная человеческая PAH – 08

atggcagctgttgtcctggagaacggagtcctgagcagaaaactctcagactttgggcaggaaacaagttacatcgaagacaactccaatcaaaatggtgctgtatct
ctgatattctcactcaaagaggaagttggtgccctggccaaggtcctgcgcttatttgaggagaatgagatcaacctgacacacattgaatccagaccttcccgtttaaa
caaagatgagtatgagtttttcacctatctggataagcgtagcaagcccgtcctgggcagcatcatcaagagcctgaggaacgacattggtgccactgtccatgagctt
tcccgagacaaggaaaagaacacagtgccctggttcccaaggaccattcaggagctggacagattcgccaatcagattctcagctatggagccgaactggatgcag
accacccaggctttaaagatcctgtgtaccgggcgagacgaaagcagtttgctgacattgcctacaactaccgccatgggcagcccattcctcgggtggaatacaca
gaggaggagaggaagacctggggaacggtgttcaggactctgaaggccttgtataaaacacatgcctgctacgagcacaaccacatcttccctcttctggaaaagta
ctgcggtttccgtgaagacaacatcccgcagctggaagatgtttctcagtttctgcagacttgtactggtttccgcctccgtcctgttgctggcttactgtcgtctcgagatt
tcttgggtggcctggccttccgagtcttccactgcacacagtacattaggcatggatctaagcccatgtacacacctgaacctgatatctgtcatgaactcttgggacat
gtgcccttgttttcagatagaagctttgcccagttttctcaggaaattgggcttgcatcgctgggggcacctgatgagtacattgagaaactggccacaatttactggttta
ctgtggagtttgggctttgcaaggaaggagattctataaaggcatatggtgctgggctcttgtcatcctttggagaattacagtactgtttatcagacaagccaaagctcc
tgcccctggagctagagaagacagcctgccaggagtatactgtcacagagttccagcctctgtactatgtggccgagagtttcaatgatgccaaggagaaagtgagg
acttttgctgccacaatcccccggcccttctccgttcgctatgacccctacactcaaagggttgaggtcctggacaatactcagcagttgaagattttagctgactccatt
aatagtgaggttggaatcctttgccatgccctgcagaaaataaagtcatag

(SEQ ID NO: 16)

Кодон-оптимизированная человеческая PAH – 11

atgagcacagcagtcctggagaaccctgggcttgggaggaaactgagtgactttgggcaagagacctcctacattgaggataactgcaatcagaatggagccatca
gcctcatcttctccctgaaagaggaggtgggggccctggccaaagtcctcagactctttgaggagaatgacgtgaacctgacccacattgagagcagacccagtag
gctcaagaaggatgagtatgaattcttcacccacctggacaagaggagcctgcctgccctcaccaacatcatcaaaatcctgaggcatgacattggggccactgtcc
atgaactgtccagagacaagaagaaagacacagtcccctggtttccaaggaccatccaagagctggaccgctttgccaaccagatcctctcctatggggctgagctg
gatgctgaccaccctggcttcaaggacccagtgtaccgggccagaaggaagcagtttgctgatattgcctacaattacagacatggccagcccatccccagagtgg
agtacatggaggaagagaaaaagacctggggcacagtgttcaaaaccctgaagtccctctacaagacccatgcctgctatgagtacaaccacatctttcccctgctg
gagaagtactgtgggttccatgaggacaatatccctcagctggaagatgtgtcccagttcctgcagacctgcactggctttaggctgaggcctgtggctggcctgctc
agctctagggacttcctgggggggctggccttcagagtcttccactgcacccagtacatccgccatgggagcaagcccatgtacaccccagagccagacatctgcc
atgagctgctgggccatgtgcccctcttctcagacagaagctttgcccagttcagccaagaaattggactggcctccctgggtgcccctgatgaatacatagaaaagc
tggctaccatctactggttcacagtggaatttggcctctgcaagcaaggggactccatcaaggcctatggagctgggctcctgagctcctttggagagctccaatactg
cctgtctgagaagcccaagctcctgcccctggagcttgagaagacagccatccagaactacactgtgactgagttccagcctctgtactacgtggcagagtccttcaa
tgatgccaaggagaaggtgaggaactttgcagccaccattcctaggcccttctctgtgaggtatgacccctacacacagaggattgaagtgctggacaacacccagc
agctcaagatcctggcagacagcatcaactcagagattggcatcctgtgctctgccctccagaagattaagtag

(SEQ ID NO: 17)

Кодон-оптимизированная человеческая PAH – 12

atgagcacagcagtgttggagaaccctgggcttgggaggaaactgtctgactttggacaagagacctcctacatagaagacaactgcaatcagaatggagccatctc
cctcatcttcagcctcaaggaagaggtgggggccctggccaaagtcctgaggctctttgaggagaatgacgtgaacctgacccacattgagagtaggccctcccgg
ctgaagaaggatgaatatgaattcttcacccacctggataagaggagcctgcctgccctcaccaacatcatcaaaatcctgaggcatgacattggggccactgtgcat
gagctctcaagggacaagaagaaagacacagtcccctggttccctaggaccatccaagagctggaccgctttgccaaccagatcctctcctatggggctgagctgg
atgctgaccaccctggcttcaaggacccagtgtaccgggccagaaggaagcagtttgcagatattgcctacaattacagacatggccagcccatcccaagggtgga
atacatggaggaagaaaaaaagacctggggcactgtcttcaaaaccctgaagagcctgtacaagacccatgcctgctatgagtacaaccacatctttcccctgctgg

agaagtactgtgggttccatgaggacaatatccctcagctggaggatgtgtcccagttcctccagacctgcactggctttaggctgaggcctgtggctggcctgctgtc
cagcagagacttcctgggggcttggccttcagagtgttccactgcacccagtacatccgccatgggagcaagcccatgtacaccccagagccagacatctgccat
gaactgctgggccatgtgcccctcttcagtgacagaagctttgcccagttctcccaagaaattggactggcctccctgggtgcccctgatgagtacattgagaagctg
gccaccatctactggtttacagtggagtttggcctctgcaagcaaggggactccatcaaggcctatggagctgggctgctcagctcctttggggagctgcaatactgc
ctgagtgagaaacccaagctcctgcccctggagctggaaaagacagccatccagaactacacagtcacagagttccagcctctctactatgtggcagagagcttca
atgatgccaaggagaaggtgaggaactttgctgccaccatccccagacccttctctgtgaggtatgacccctacactcagaggattgaagtgctggacaacacccag
cagctcaagattctggctgatagcatcaactcagagattggcatcctgtgctctgccctgcagaagatcaagtag

(SEQ ID NO: 18)

Кодон-оптимизированная человеческая PAH – 13

atgagcacagcagtgttggagaaccctgggcttgggaggaaactgtctgactttgggcaagagacctcctacattgaggacaactgcaatcagaatggggccatca
gcctcatcttttccctgaaagaggaggtgggggccctggccaaagtcctgaggctctttgaggagaatgacgtgaacctgacccacattgagagtaggccctctagg
ctgaagaaggatgaatatgaattcttcacccacctggacaagaggagcctgcctgccctcaccaacatcatcaaaatcctgaggcatgacattggagccactgtccat
gagctgtccagagataagaagaaagacacagtcccctggtttccccgcaccatccaagagcttgaccgctttgccaaccagatcctgagctatggggcagagctgg
atgctgaccaccctggcttcaaggacccagtgtacagagccagaaggaagcagtttgctgatattgcctacaattaccgccatggacagcccatcccaagggtgga
atacatggaggaagagaaaaagacctggggcacagtcttcaaaaccctgaagtccctctacaagacccatgcctgctatgagtacaaccacatcttccccctgctgg
agaagtactgtggcttccatgaagacaatatccctcagctggaggatgtgtcccagttcctgcagacctgcactgggttccgcctgagacctgtggctgggctcctctc
cagcagagacttcctgggggcttggccttcagagtgttccactgcacccagtacatcagacatggcagcaagcccatgtacaccccagagcctgacatctgccat
gagctcctgggccatgtgcccctcttcagtgacagaagctttgcccagttctcccaagaaattgggctggcctccctgggtgcccctgatgagtacatagaaaagctg
gctaccatctactggttcacagtggagtttggcctgtgcaagcaaggggacagcatcaaggcctatggagctggcctgctcagctcctttggagagctccaatactgc
ctgagtgagaagcccaagctcctgcccctggaactggagaagacagccatccagaactacactgtgactgagttccagcctctgtactatgtggctgagagcttcaat
gatgccaaggagaaggtgaggaactttgcagccaccatccccagacccttctctgtgaggtatgacccctacacacagaggattgaagtgctggacaacacccagc
agctcaagatcctggcagactccatcaactcagagattggcatcctctgcagtgccctccagaagattaagtag

(SEQ ID NO: 19)

Кодон-оптимизированная человеческая PAH – 14

atgagcacagcagtcctggagaaccctgggcttgggaggaaactgtctgactttgggcaagagacctcctacatagaagacaactgcaatcagaatggagccatca
gcctcatcttctccctgaaagaggaggtgggggccctggcaaaggtgctgaggctgtttgaggagaatgatgtgaacctgacccacattgaatctaggccctcccgg
ctgaagaaggatgaatatgaattcttcacccacctggacaagaggagcctgcctgccctcaccaacatcatcaaaatcctgaggcatgacattggggccactgtccat
gaactgtccagagataagaagaaagacacagtcccctggttccctaggaccatccaagagctggacagatttgccaaccagatcctctcctatggggctgagctgg
atgctgaccaccctggcttcaaggaccctgtctatagggccagaaggaagcagtttgctgatattgcctacaattacagacatggccagcccatcccaagggtggaat
acatggaggaagagaaaaagacctggggcacagtcttcaaaaccctgaagtccctctacaagacccatgcctgctatgagtacaaccacatcttccccctgctggaa
aagtactgtgggttccatgaggacaatatccctcagctggaggatgtctcccagttcctccagacctgcactggcttccgcctgagacctgtggctgggctcctgagc
agcagagacttcctgggggggctggccttcagagtgttccactgcacacagtacatccgccatgggagcaagcccatgtacaccccagagccagacatctgccat
gagctgctgggccatgtgcccctcttcagtgaccgcagctttgcccagttcagccaagaaattggactggcctccctgggtgcccctgatgagtacattgagaagctg
gccaccatctactggtttactgtggagtttggcctctgcaagcaaggggacagcatcaaggcctatggagctggcctgctcagctcctttggagagctccaatactgc
ctgagtgagaaacccaagctcctgcccctggagctggagaagacagccatccagaactacacagtgacagagttccagcctctgtactacgtggcagagagcttca
atgatgccaaggagaaggtcagaaactttgcagccaccatccccagacccttctctgtgaggtatgacccctacactcagaggattgaggtcttggacaacacccag
cagctcaagattctggctgactccatcaactcagagattggcatcctgtgctctgccctgcagaagatcaagtaa

(SEQ ID NO: 20)

Кодон-оптимизированная человеческая PAH – 15

atgagcacagcagtcctggagaaccctgggcttgggaggaagctctctgactttgggcaagagacctcctacatagaagacaactgcaatcagaatggagccatca
gcctcatcttctccctcaaggaagaagtgggggccctggcaaaggtcctgaggctctttgaggagaatgatgtcaacctgacccacattgagtctaggcccagcaga
ctgaagaaggatgaatatgaattcttcacccacctggacaagaggagcctgcctgccctcaccaacatcatcaaaatcctgaggcatgacattggggccactgtccat
gagctctccagagacaaaaagaaggacaccgtcccctggttccctaggaccatccaagaactggaccgctttgccaaccagatcctctcctatggggcagagctgg
atgctgaccaccctggcttcaaagacccagtgtacagagccagaaggaagcagtttgcagatattgcctacaattaccgccatggacagcccatcccaagggtgga
atacatggaagaggagaagaaaacctggggcacagtgttcaagaccctgaagagcctgtacaagacccatgcctgctatgagtacaaccacatctttcccctgctgg
aaaagtactgtgggttccatgaggacaatatccctcagctggaggatgtgtcccagttcctccagacctgcactggctttaggctgaggcctgtggctggcctgctgtc
cagtagggacttcctgggggggcttggccttcagagtcttccactgcacccagtacatcagacatggcagcaagcccatgtacaccccagagcctgacatctgccatg
aactcctgggccatgtgcccctcttcagtgacagatcctttgcccagttcagccaagagatcgggctggcctccctgggtgcccctgatgagtacattgaaaaactgg
ccaccatctactggtttactgtggagtttggcctctgcaagcaaggggacagcatcaaggcctatggagctgggctcctcagcagctttggagagctccaatactgcc
tgtctgagaaacccaagctgctccccctggagctggagaagacagccatccagaactacacagtcacagagttccagcctctctactacgtggctgagagcttcaat
gatgccaaggagaaggtgaggaactttgctgccaccatccccagacccttctctgtgaggtatgacccctacactcagaggattgaggtgctggacaacacccagc
agctcaagattctggctgactccatcaactcagagattggcatcctgtgctctgccctgcagaagatcaagtaa

(SEQ ID NO: 21)

Кодон-оптимизированная человеческая PAH – 16

atgagcacagcagtgttggagaaccctgggcttgggaggaaactgtctgactttgggcaagagacctcctacattgaagacaactgcaatcagaatggagccatca
gcctcatcttttccctgaaagaggaggtgggggccctggccaaagtcctgaggctctttgaggagaatgacgtgaacctgacccacattgagagtaggcccagcag
actgaagaaggatgaatatgaattcttcacccacctggacaagaggagcctgcctgccctcaccaacatcatcaaaatcctgaggcatgacattggggccactgtcc
acgagctctcaagggacaagaagaaagacacagtcccctggtttccaaggaccatccaagagcttgaccgctttgccaaccagatcctctcctatggggctgagctg
gatgctgaccaccctggctttaaggacccagtgtatagggccagaaggaagcagtttgctgatattgcctacaactacagacatggccagcccatcccaagggtgga
atacatggaggaagagaaaaagacctggggcacagtgttcaagaccctgaagagcctgtacaagacccatgcctgctatgagtacaaccacatcttcccccctgctg
gaaaagtactgtggcttccatgaggacaatatccctcagctggaggatgtgtcccagttcctccagacctgcactgggtttaggctgaggcctgtggctgggctcctc
agcagccgggacttcctgggggggctggccttcagagtcttccactgcacccagtacatccgccatgggagcaagcccatgtacaccccagagccagacatctgc
catgaactgctgggccatgtgcccctcttcagtgacagatcctttgcccagttctcccaagaaattggactggcctccctgggtgcccctgatgagtacatagagaagc
tggctaccatctactggttcacagtggagtttggcctctgcaagcaaggggactccatcaaggcctatggagctggcctgctgtccagctttggagagctgcagtattg
cctgagtgagaaacccaagctcctgcccctggagctggagaagacagccatccagaactatactgtgactgagttccagcctctctactatgtggcagagagcttca
atgatgccaaggagaaggtgaggaactttgcagccaccatccccagacccttctctgtgaggtatgacccctacactcagaggatagaagtgctggacaacaccca
gcagctcaagatcctggcagacagcatcaactcagagattggcatcctgtgctctgccctccagaagattaagtaa

(SEQ ID NO: 22)

Кодон-оптимизированная человеческая PAH – 17

atgtccactgctgttctggagaaccctggactggggaggaagctctctgactttgggcaagagacctcctacattgaggacaactgcaaccagaatggggccatcag
cctcatcttctccctgaaagaggaggtgggggccctggccaaggtcctgaggctctttgaggagaatgatgtgaacctgactcacattgagagccggcccagtagg
ctgaagaaggatgagtatgaattcttcacccacctggataagaggagcctgcctgccctgaccaacatcatcaaaatcctgaggcatgacattggagccactgtccac
gagctctcaagggacaagaagaaagacactgtgccctggtttccaaggaccatccaagagctggacagatttgccaatcagatcctctcctatggggcagagctgg
atgctgaccaccctggcttcaaggaccctgtctatagggctaggaggaagcagtttgcagatattgcctacaattaccgccatggacagcccatcccaagggtggag
tacatggaggaagagaaaaagacctggggcacagtcttcaaaaccctgaagtccctctacaagacccacgcctgctatgagtacaaccacatcttccccctgctgga
gaagtactgtgggttccatgaagacaatatcccccagcttgaggatgtctcccagttcctccagacctgtactggctttaggctgaggcctgtggctgggctcctgtcc
agcagagacttcctgggggggcttggccttcagagtgttccactgcacacagtacatcagacatggcagcaagcccatgtacaccccagagccagacatctgccatg
agctgctgggccatgtccccctcttcagtgaccgcagctttgcccagttcagccaagaaattgggctggcctccctgggggctcctgatgaatacatagagaagctg
gccaccatctactggttcacagttgagtttggcctctgcaagcaaggggacagcatcaaggcctatggagctggcctgctcagctcctttggagagctgcagtattgtc

tgtctgagaagcccaagctcctgcccctggagctggaaaagacagccatccagaactacacagtgacagagttccagcctctgtactatgtggctgagtccttcaatg
atgccaaggagaaggtgaggaattttgctgccaccattcccagacccttctctgtgaggtatgacccctacactcagaggattgaagtgctggacaacacccagcag
ctcaagatcctggcagactccatcaactcagagattggcatcctgtgttctgccctccagaagatcaagtga

(SEQ ID NO: 23)

Кодон-оптимизированная человеческая PAH – 18

atgagcacagcagttctggagaaccctggactggggaggaagctgtctgactttggacaagagacctcctacatagaggacaactgcaatcagaatggagccatca
gcctcatcttcagcctcaaggaggaagtgggggccctggccaaggtcctgaggctgtttgaggagaatgatgtgaacctgactcacattgagagtaggccctcaag
gctcaagaaggatgagtatgagttcttcacccacctggataagaggtccctgcctgccctgaccaacatcatcaaaatcctgcgccatgacattggggccacagtgc
acgagctctcaagggacaagaagaaagacacagtcccctggtttccccgcaccatccaagagctggacagatttgccaaccagatcctctcctatggggctgagct
ggatgctgaccaccctggctttaaggacccagtgtatagggccagaaggaagcagtttgctgatattgcctacaattacagacatggccagcccatccccagagttg
agtacatggaggaagagaaaaagacctggggcactgttttcaagaccctgaagtccctctacaagacccacgcctgctatgagtacaaccacatcttcccactgctg
gaaaagtactgtggcttccatgaggacaatatccctcagctggaggatgtctcccagttcctccagacctgtactgggtttaggctgaggcctgtagctggcctgctca
gctctagggacttcctgggagggctggccttccgggtcttccactgcacccagtacatcagacatgggagcaagcccatgtacaccccagagccagacatctgcca
tgagctgctgggccatgtgcccctcttctcagataggtcctttgcccagttctcccaagagataggcctggcatccctgggtgcccctgatgagtacattgagaagctg
gccaccatctactggttcactgtggagtttggcctctgcaagcaaggggacagcatcaaggcctatggagctgggctcctgtccagctttggggagctgcagtattgt
ctgagtgagaagcccaagctcctgccactggagctggagaagacagccatccagaactacacagtcacagagttccagcctctgtactatgtggcagagagcttca
atgatgccaaggagaaggtgaggaattttgcagccaccatcccaagacccttctctgtgaggtatgacccctacactcagaggattgaggtgctggacaacacccag
cagctcaagattctggctgactccatcaactcagagattggcatcctgtgttctgccctccagaagatcaagtga

(SEQ ID NO: 24)

Кодон-оптимизированная человеческая PAH – 19

atgagcacagctgtgctggagaaccctgggcttggaaggaagctcagtgactttggccaagagacctcctacattgaggacaactgcaatcagaatggagccatca
gcctcatcttttccttgaaggaagaagtgggggccttggccaaagtcctgaggctgtttgaggagaatgacgtcaacctgactcacattgaatctaggccttcaaggct
caagaaggatgagtatgaattcttcacccacctggacaagaggagcctgcctgctctgaccaacatcatcaaaatcttgaggcatgacattggagcaacagtccacg
agcttagcagagacaaaaagaaagacaccgtgccctggttcccaagaaccattcaagagttggataggtttgccaaccagatcctctcctatggggctgagctggat
gctgaccaccctggctttaaggaccctgtgtatagagccagaagaaagcagtttgctgatattgcctacaattacagacatggacagcccatccccagagtggagtac
atggaggaagagaaaaaaacctggggcactgtcttcaagaccctgaaatctctgtacaagacacatgcctgctatgagtacaaccacatcttccctctgttggagaag
tactgtggcttccatgaagataacattccccagcttgaggatgtgtctcaatttctccagacctgcactggattcagactcagaccagtggctggcctgctgtccagtag
ggacttcctgggaggactggcctttagggtgttccactgcacacagtacatcagacacggcagcaagcccatgtacacaccagagccagacatctgccatgagctc
ctgggccatgtccccctcttctctgacagatcctttgcccagttctcccaagaaattggtctggcttccctgggtgcccctgatgaatatatagaaaagctggccaccatc
tactggtttacagtggaatttgggctctgcaaacaaggagactccattaaggcctatggagctgggctgctcagcagctttggagagctgcaatactgcctgtctgaaa
aacccaagcttctgcccctggaactggagaaaacagcaatccagaactacactgtgactgagttccagcctctctactacgtggcagagagcttcaatgatgccaag
gagaaggtgagaaactttgcagccactatcccaaggcccttcagtgttagatatgacccctacacccagaggattgaggtgcttgacaatactcagcagctgaagatt
ctggcagattccatcaactcagagattggcatcctgtgttctgccctgcagaagatcaagtaa

(SEQ ID NO: 25)

Кодон-оптимизированная человеческая PAH – 20

atgtccactgctgtgttggagaaccctggacttggcagaaaactgagtgactttgggcaagagacctcctacattgaagataactgcaatcagaatggagccatttccc
tcatcttctccctgaaggaagaagtgggggccctggccaaagtcctgcgcctgtttgaggagaatgacgtcaacctgacccacatcgaatctaggccttcaaggttga
agaaggatgaatatgagttcttcacacacctggataagaggagcctgcctgccctcaccaacatcatcaaaatcttgaggcatgacattggagcaacagtccacgag

ctgagcagagacaagaagaaagacaccgtcccctggtttcccagaaccatccaagaacttgaccgcttcgccaaccagatcctgtcctatggcgcagagcttgatg
ctgaccaccctgggttcaaggacccagtgtacagagccagaaggaagcagtttgcagatattgcctacaattaccgccatggccagcccatcccaagagtggagta
catggaggaagagaaaaagacctggggcactgtgttcaaaaccctgaaaagcctctacaagactcacgcctgctatgaatacaaccacattttcccactgcttgaga
agtactgtggcttccatgaggacaatatcccccagctggaggatgtgtctcaatttctgcagacctgcactggctttcggctgagacctgtggccggcctcctcagcag
ccgggacttcctgggaggcttggccttcagagtcttccactgcacacagtatatcagacatggaagcaagcccatgtacactccagagccagacatctgccatgaac
tgctgggccatgtgcccctcttctctgaccggagctttgcccagttcagccaagagattggccttgcctctctgggggctcctgatgagtacatcgagaagctggctac
catctactggttcaccgtggaatttggcctgtgcaaacaaggagactccatcaaggcctatggagctgggctgctctcctcctttggagagctccagtactgcctgtctg
aaaaacccaagctcctgcccctggagctggaaaagacagccatccagaactacacagtgacagaattccagcctctgtactacgtggctgagagcttcaatgatgcc
aaggagaaggtgagaaactttgctgccaccattcctcggcccttttctgtgcgctatgacccctacacccaaagaattgaggtgctggacaacacccagcagctcaa
gattctggcagacagcatcaactcagagatcggcatcctctgctccgcccttcagaagatcaagtaa

(SEQ ID NO: 27)

[0081] В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV PAH содержит кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность PAH, имеющий по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью с одной из SEQ ID NO: 11-27. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления вектор rAAV PAH содержит кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность PAH, имеющий по меньшей мере 70% идентичности с одной из SEQ ID NO: 11-27. В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV PAH содержит кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность PAH, имеющую по меньшей мере 75% идентичности с одной из SEQ ID NO: 11-27. В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV PAH содержит кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность PAH, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с одной из SEQ ID NO: 11-27. В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV PAH содержит кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность PAH, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с одной из SEQ ID NO: 11-27. В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV PAH содержит кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность PAH, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с одной из SEQ ID NO: 11-27. В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV PAH содержит кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность PAH, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с одной из SEQ ID NO: 11-27. В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV PAH содержит кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность PAH, имеющую по меньшей мере 99% идентичности с одной из SEQ ID NO: 11-27. В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV PAH содержит кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность PAH, идентичную одной из SEQ ID NO: 11-27.

Применение векторов rAAV, кодирующих PAH, для лечения заболевания

[0082] В данном документе описаны способы лечения заболевания, связанного с недостаточностью фермента PAH. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления векторы rAAV, описанные в данном документе, подходят для лечения субъекта с дефицитом PAH, таким как фенилкетонурия (ФКУ). Способ лечения включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, вектора на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), как описано в данном документе.

[0083] Описанный в данном документе вектор rAAV можно использовать для лечения любого заболевания, связанного с дефицитом или нарушением PAH.

[0084] В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV остается эписомальным после введения нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV не остается эписомальным после введения нуждающемуся в этом субъекту. Например, в некоторых вариантах осуществления вектор rAAV интегрируется в геном субъекта. Такая интеграция может быть достигнута, например, с помощью различных технологий редактирования генов, таких как нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции, (TALEN), редактирование генома ARCUS и/или системы CRISPR-Cas.

[0085] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую вектор rAAV, описанный в данном документе, применяют для лечения нуждающихся в этом субъектов. Фармацевтическая композиция, содержащая вектор rAAV по изобретению, содержит фармацевтически приемлемый эксципиент, разбавитель или носитель. Примеры подходящих фармацевтических носителей хорошо известны в данной области техники и включают фосфатно-солевые буферные растворы, воду, эмульсии, такие как эмульсии масло/вода, различные типы смачивающих агентов, стерильные растворы и т.п. Такие носители могут быть приготовлены обычными способами и введены субъекту в терапевтически эффективном количестве.

[0086] Вектор rAAV вводят нуждающемуся в этом субъекту подходящим путем. В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV вводят внутривенно, внутрибрюшинно, подкожно или внутрикожно. В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления внутрикожное введение включает введение с использованием «генной пушки» или системы доставки биолистических частиц. В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV вводят при помощи невирусной липидной наночастицы. Например, композиция, содержащая вектор rAAV, может включать один или более разбавителей, буферов, липосом, липид, липидный комплекс. В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV содержится в микросфере или наночастице, такой как липидная наночастица.

[0087] В некоторых вариантах осуществления у субъекта обнаруживают функциональную PAH. Можно использовать различные способы обнаружения PAH, которые могут включать, например, забор ткани (включая биопсию) и скрининг на наличие PAH. В некоторых вариантах осуществления функциональную PAH обнаруживают у субъекта примерно через 2-6 недель после введения вектора rAAV. В некоторых вариантах осуществления функциональную PAH обнаруживают у субъекта примерно через 2 недели после введения вектора rAAV. В некоторых вариантах осуществления функциональную PAH обнаруживают у субъекта примерно через 3 недели после введения вектора rAAV. В некоторых вариантах осуществления функциональную PAH обнаруживают у субъекта примерно через 4 недели после введения вектора rAAV. В некоторых вариантах осуществления функциональную PAH обнаруживают у субъекта примерно через 5 недель после введения вектора rAAV. В некоторых вариантах осуществления функциональную PAH обнаруживают у субъекта примерно через 6 недель после введения вектора rAAV. В некоторых вариантах осуществления функциональную PAH обнаруживают в гепатоцитах субъекта примерно через 2-6 недель после введения вектора rAAV. В некоторых вариантах осуществления функциональную PAH обнаруживают в гепатоцитах субъекта более чем через 7 недель после введения вектора rAAV.

[0088] В некоторых вариантах осуществления функциональную PAH обнаруживают у субъекта по меньшей мере через 3 месяца, 6 месяцев, 12 месяцев, 2 года, 3 года, 4 года, 5 лет, 6 лет, 7 лет, 8 лет, 9 лет или 10 лет после введения вектора rAAV. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления функциональную PAH обнаруживают у субъекта по меньшей мере через 3 месяца после введения вектора

rAAV. В некоторых вариантах осуществления функциональную PAH обнаруживают у субъекта по меньшей мере через 6 месяцев после введения вектора rAAV. В некоторых вариантах осуществления функциональную PAH обнаруживают у субъекта по меньшей мере через 12 месяцев после введения вектора rAAV. В некоторых вариантах осуществления функциональную PAH обнаруживают у субъекта по меньшей мере через 2 года после введения вектора rAAV. В некоторых вариантах осуществления функциональную PAH обнаруживают у субъекта по меньшей мере через 3 года после введения вектора rAAV. В некоторых вариантах осуществления функциональную PAH обнаруживают у субъекта по меньшей мере через 4 года после введения вектора rAAV. В некоторых вариантах осуществления функциональную PAH обнаруживают у субъекта по меньшей мере через 5 лет после введения вектора rAAV. В некоторых вариантах осуществления функциональную PAH обнаруживают у субъекта по меньшей мере через 6 лет после введения вектора rAAV. В некоторых вариантах осуществления функциональную PAH обнаруживают у субъекта по меньшей мере через 7 лет после введения вектора rAAV. В некоторых вариантах осуществления функциональная PAH выявляется у субъекта по меньшей мере через 8 лет после введения вектора rAAV. В некоторых вариантах осуществления функциональную PAH обнаруживают у субъекта по меньшей мере через 9 лет после введения вектора rAAV. В некоторых вариантах осуществления функциональную PAH обнаруживают у субъекта по меньшей мере через 10 лет после введения вектора rAAV. В некоторых вариантах осуществления функциональную PAH обнаруживают у субъекта в течение оставшейся части жизни субъекта после введения вектора rAAV.

[0089] В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, приводит к продукции активной PAH в терапевтически эффективном количестве.

[0090] В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, приводит к снижению уровня фенилаланина (Phe) у субъекта. В некоторых вариантах осуществления снижение уровня Phe обнаруживают в плазме субъекта. В некоторых вариантах осуществления в центральной нервной системе (ЦНС) обнаруживают снижение Phe. В некоторых вариантах осуществления снижение Phe обнаруживают в ткани головного мозга субъекта. В некоторых вариантах осуществления снижение Phe обнаруживают в ткани печени субъекта. В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, снижает уровень Phe у субъекта на около 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40 %, 35%, 30%, 25%, 20%, 15% или на около 10% по сравнению с исходным уровнем Phe у субъекта до введения rAAV, содержащего PAH. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, снижает уровень Phe у субъекта на около 95%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, снижает уровень Phe у субъекта на около 90%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, снижает уровень Phe у субъекта на около 85%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, снижает уровень Phe у субъекта на около 80%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, снижает уровень Phe у субъекта на около 75%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, снижает уровень Phe у субъекта на около 70%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, снижает уровень Phe у субъекта на около 65%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, снижает уровень Phe у субъекта на около 60%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, снижает уровень Phe у субъекта на около 55%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, снижает уровень Phe у субъекта на около 50%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, снижает уровень Phe у субъекта на

около 45%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, снижает уровень Phe у субъекта на около 40%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, снижает уровень Phe у субъекта на около 35%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, снижает уровень Phe у субъекта на около 30%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, снижает уровень Phe у субъекта на около 25%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, снижает уровень Phe у субъекта на около 20%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, снижает уровень Phe у субъекта на около 15%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, снижает уровень Phe у субъекта на около 10%.

[0091] В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, приводит к увеличению количества отличных от Phe больших нейтральных аминокислот (LNAA) у субъекта. Не желая быть связанными какой-либо теорией, различные способы действия могут приводить к увеличению количества LNAA у субъекта, включая, например, повышенную продукцию LNAA, повышенный транспорт или перенос LNAA и/или повышенную стабильность LNAA. В некоторых вариантах осуществления в плазме субъекта обнаруживают повышение уровня отличных от Phe LNAA. В некоторых вариантах осуществления в центральной нервной системе (ЦНС) обнаруживают повышение уровня отличных от Phe LNAA. В некоторых вариантах осуществления в ткани головного мозга субъекта обнаруживают повышение уровня отличных от Phe LNAA. В некоторых вариантах осуществления в ткани печени субъекта обнаруживают повышение уровня отличных от Phe LNAA. В некоторых вариантах осуществления отличная от Phe LNAA представляет собой тирозин. В некоторых вариантах осуществления отличная от Phe LNAA представляет собой триптофан. В некоторых вариантах осуществления отличная от Phe LNAA представляет собой валин. В некоторых вариантах осуществления отличная от Phe LNAA представляет собой изолейцин. В некоторых вариантах осуществления отличная от Phe LNAA представляет собой метионин. В некоторых вариантах осуществления отличная от Phe LNAA представляет собой треонин. В некоторых вариантах осуществления отличная от Phe LNAA представляет собой лейцин. В некоторых вариантах осуществления отличная от Phe LNAA представляет собой гистидин.

[0092] В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, приводит к увеличению уровня тирозина (Tyr) у субъекта. Не желая быть связанными какой-либо теорией, различные способы действия могут приводить к увеличению количества Tyr у субъекта, включая, например, повышенную продукцию Tyr, повышенный транспорт или перенос Tyr и/или повышенную стабильность Tyr. В некоторых вариантах осуществления в плазме субъекта обнаруживают повышение уровня Tyr. В некоторых вариантах осуществления в ткани головного мозга субъекта обнаруживают повышение уровня Tyr. В некоторых вариантах осуществления в ткани печени субъекта обнаруживают повышение уровня Tyr. В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Tyr у субъекта на около 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15% или на около 10% по сравнению с исходным уровнем Tyr у субъекта до введения rAAV, содержащего PAH. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Tyr у субъекта на около 95%. В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Tyr у субъекта на около 90%. В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Tyr у субъекта на около 85%. В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Tyr у субъекта на около 80%. В некоторых вариантах

осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Tyr у субъекта на около 75%. В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Tyr у субъекта на около 70%. В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Tyr у субъекта на около 65%. В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Tyr у субъекта на около 60%. В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Tyr у субъекта на около 55%. В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Tyr у субъекта на около 50%. В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Tyr у субъекта на около 45%. В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Tyr у субъекта на около 40%. В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Tyr у субъекта на около 35%. В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Tyr у субъекта на около 30%. В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Tyr у субъекта на около 25%. В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Tyr у субъекта на около 20%. В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Tyr у субъекта на около 15%. В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Tyr у субъекта на около 10%.

[0093] В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, приводит к повышению уровня триптофана (Trp) у субъекта. Не желая быть связанными какой-либо теорией, различные способы действия могут приводить к повышению уровня Trp у субъекта, включая, например, повышенную продукцию Trp, повышенный транспорт или перенос Trp и/или повышенную стабильность Trp. В некоторых вариантах осуществления в плазме субъекта обнаруживают повышение уровня Trp. В некоторых вариантах осуществления в ткани головного мозга субъекта обнаруживают повышение уровня Trp. В некоторых вариантах осуществления в ткани печени субъекта обнаруживают повышение уровня Trp. В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Trp у субъекта на около 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15% или на около 10% по сравнению с исходным уровнем Trp у субъекта до введения rAAV, содержащего PAH. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Trp у субъекта на около 95%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, повышает уровень Trp у субъекта на около 90%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, повышает уровень Trp у субъекта на около 85%. В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Trp у субъекта на около 80%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, повышает уровень Trp у субъекта на около 75%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, повышает уровень Trp у субъекта на около 70%. В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Trp у субъекта на около 65%. В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Trp у субъекта на около 60%. В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Trp у субъекта на около 55%. В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Trp у субъекта на около 50%. В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Trp у субъекта на около 45%. В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Trp у субъекта на около 40%. В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Trp у субъекта

на около 35%. В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Trp у субъекта на около 30%. В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Trp у субъекта на около 25%. В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Trp у субъекта на около 20%. В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Trp у субъекта на около 15%. В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, повышает уровень Trp у субъекта на около 10%.

[0094] В некоторых вариантах осуществления введение rAAV, содержащего PAH, приводит к повышению уровня нейротрансмиттеров у субъекта. Не желая быть связанными какой-либо теорией, различные способы действия могут приводить к повышению уровня нейротрансмиттеров у субъекта, включая, например, повышенную выработку нейротрансмиттеров, повышенный транспорт или перенос нейротрансмиттеров и/или повышенную стабильность нейротрансмиттеров. В некоторых вариантах осуществления в ткани головного мозга субъекта обнаруживают увеличение количества нейротрансмиттеров. В некоторых вариантах осуществления в центральной нервной системе (ЦНС) субъекта повышение уровня нейротрансмиттеров обнаруживают. В некоторых вариантах осуществления нейротрансмиттер представляет собой серотонин, дофамин, норадреналин, адреналин или норадреналин. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, повышает уровень одного или более нейротрансмиттеров у субъекта на около 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45 %, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15% или на около 10% по сравнению с исходным уровнем нейротрансмиттера субъекта до введения rAAV, содержащего PAH. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, повышает уровень одного или более нейротрансмиттеров у субъекта на около 95%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, повышает уровень одного или более нейротрансмиттеров у субъекта на около 90%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, повышает уровень одного или более нейротрансмиттеров у субъекта на около 85%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, повышает уровень одного или более нейротрансмиттеров у субъекта на около 80%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, повышает уровень одного или более нейротрансмиттеров у субъекта на около 75%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, повышает уровень одного или более нейротрансмиттеров у субъекта на около 70%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, повышает уровень одного или более нейротрансмиттеров у субъекта на около 65%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, повышает уровень одного или более нейротрансмиттеров у субъекта на около 60%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, повышает уровень одного или более нейротрансмиттеров у субъекта на около 55%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, повышает уровень одного или более нейротрансмиттеров у субъекта на около 50%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, повышает уровень одного или более нейротрансмиттеров у субъекта на около 45%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, повышает уровень одного или более нейротрансмиттеров у субъекта на около 40%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, повышает уровень одного или более нейротрансмиттеров у субъекта на около 35%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, повышает уровень одного или более нейротрансмиттеров у субъекта на около 30%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, повышает уровень одного или более нейротрансмиттеров у субъекта на около 25%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, повышает уровень одного или

более нейротрансмиттеров у субъекта на около 20%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, повышает уровень одного или более нейротрансмиттеров у субъекта на около 15%. В некоторых вариантах осуществления введенный rAAV, содержащий PAH, повышает уровень одного или более нейротрансмиттеров у субъекта на около 10%.

[0095] В некоторых вариантах осуществления после введения субъекту вектора AAV уровни функциональной PAH, обнаруживаемые у субъекта, примерно в 2-10 раз превышают количество функциональной PAH, обнаруживаемое у субъекта до введения rAAV, содержащего PAH.

[0096] В некоторых вариантах осуществления после введения субъекту вектора AAV уровни обнаруживаемой функциональной PAH соответствуют или превышают терапевтический уровень для человека. В некоторых вариантах осуществления уровни функциональной PAH после введения вектора rAAV примерно в 2-35 раз превышают терапевтический уровень для человека. В некоторых вариантах осуществления уровни активного PAH после введения примерно в 2 раза превышают терапевтический уровень для человека. В некоторых вариантах осуществления уровни функциональной PAH после введения примерно в 3 раза превышают терапевтический уровень для человека. В некоторых вариантах осуществления уровни функциональной PAH после введения примерно в 4 раза превышают терапевтический уровень для человека. В некоторых вариантах осуществления уровни активного PAH после введения примерно в 5 раза превышают терапевтический уровень для человека. В некоторых вариантах осуществления уровни активной PAH после введения примерно в 6 раз превышают терапевтический уровень для человека. В некоторых вариантах осуществления уровни активного PAH после введения примерно в 6 раз превышают терапевтический уровень для человека. В некоторых вариантах осуществления уровни активного PAH после введения примерно в 7 раз превышают терапевтический уровень для человека. В некоторых вариантах осуществления уровни активной PAH после введения примерно в 8 раз превышают терапевтический уровень для человека. В некоторых вариантах осуществления уровни активной PAH после введения примерно в 9 раз превышают терапевтический уровень для человека. В некоторых вариантах осуществления уровни активного PAH после введения примерно в 10 раз превышают терапевтический уровень для человека. В некоторых вариантах осуществления уровни активного PAH после введения примерно в 15 раз превышают терапевтический уровень для человека. В некоторых вариантах осуществления уровни активного PAH после введения примерно в 20 раз превышают терапевтический уровень для человека. В некоторых вариантах осуществления уровни активного PAH после введения примерно в 25 раз превышают терапевтический уровень для человека. В некоторых вариантах осуществления уровни активного PAH после введения примерно в 30 раз превышают терапевтический уровень для человека. В некоторых вариантах осуществления уровни функциональной PAH после введения примерно в 35 раз превышают терапевтический уровень для человека.

[0097] В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV PAH доставляют в виде однократной дозы на субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят минимальную эффективную дозу (МЭД). Используемый в данном документе термин МЭД относится к дозе вектора rAAV PAH, необходимой для достижения активности PAH, приводящей к снижению уровней Phe у субъекта.

[0098] Титр вектора определяют на основании содержания ДНК в векторном препарате. В некоторых вариантах осуществления количественную ПЦР или оптимизированную количественную ПЦР используют для определения содержания ДНК в препаратах вектора rAAV PAH. Примеры оптимизированной

количественной ПЦР включают двойную капельную ПЦР. В одном варианте осуществления доза составляет от около 1×10^{11} векторных геномов (вг)/кг массы тела до около 1×10^{13} вг/кг, включая конечные точки.

[0099] В некоторых вариантах осуществления дозировка составляет 1×10^{n} вг/кг. В еще одном варианте осуществления дозировка составляет 1×10^{12} вг/кг. В конкретных вариантах осуществления доза rAAV.hPAH, вводимая субъекту, составляет по меньшей мере $1x10^{10}$ вг/кг, $5x10^{10}$ вг/кг, $1x10^{11}$ вг/кг, $5,0 \times 10^{11}$ вг/кг, 1×10^{12} вг/кг, $2,0 \times 10^{12}$ вг/кг, $3,5 \times 10^{12}$ вг/кг, $4,0 \times 10^{12}$ вг/кг, $4,5 \times 10^{12}$ вг/кг, $5,0 \times 10^{12}$ вг/кг, $5,5 \times 10^{12}$ вг/кг, $6,0 \times 10^{12}$ вг/кг, $6,5 \times 10^{12}$ вг/кг, $7,0 \times 10^{12}$ вг/кг, $8,0 \times 10^{12}$ вг/кг, $9,0 \times 10^{12}$ вг/кг, $1,0 \times 10^{13}$ вг/кг, $2,5 \times 10^{13}$ вг/кг, 5×10^{13} вг/кг, $7,5 \times 10^{13}$ вг/кг, или $1,0 \times 10^{14}$ вг/кг.

[0100] В некоторых вариантах осуществления композиции векторов rAAV PAH могут быть составлены в дозированных единицах, содержащих количество дефектного по репликации вируса, находящееся в диапазоне от около $1,0\times10^{9}$ вг до около $1,0\times10^{15}$ вг. Используемый в данном документе термин «дозировка» может относиться к общей дозе, доставляемой субъекту в ходе лечения, или к количеству, доставляемому за один цикл введения в ходе лечения, включающего несколько циклов введения.

[0101] В некоторых вариантах осуществления дозировка достаточна для снижения уровня Phe в плазме пациента на 25% или более. В некоторых вариантах осуществления rAAV PAH применяют в комбинации с одним или более видами терапии для лечения ФКУ. В некоторых вариантах осуществления rAAV PAH применяют в комбинации с диетой для лечения ФКУ. В некоторых вариантах осуществления rAAV PAH применяют в комбинации с диетой с низким содержанием белка. В некоторых вариантах осуществления rAAV PAH применяют в комбинации с нутрицевтиком или пищевой добавкой, или питательной смесью для ФКУ. В некоторых вариантах осуществления rAAV PAH применяют в комбинации с терапией нейтральными аминокислотами. В некоторых вариантах осуществления rAAV PAH применяют в комбинации с фармакологическими препаратами. В некоторых вариантах осуществления rAAV PAH вводят с дигидрохлоридом сапроптерина. В некоторых вариантах осуществления rAAV PAH вводят в комбинации с Kuvan®. В некоторых вариантах осуществления rAAV PAH вводят в комбинации с метаболизирующими ферментами ФКУ. В некоторых вариантах осуществления rAAV PAH вводят в комбинации с пегавалиазой. В некоторых вариантах осуществления rAAV PAH вводят в комбинации с Palynziq®. В некоторых вариантах осуществления введение rAAV предшествует другим видам терапии ФКУ, проводится одновременно с другими видами терапии ФКУ или проводится после введения других видов терапии ФКУ.

ПРИМЕРЫ

[0102] Другие признаки, цели и преимущества настоящего изобретения очевидны в следующих примерах. Однако следует понимать, что примеры, демонстрирующие варианты осуществления настоящего изобретения, даны только в качестве иллюстрации, а не ограничения. Различные изменения и модификации в пределах объема изобретения станут очевидными специалистам в данной области техники из примеров.

Пример 1: Дизайн вектора

[0103] В этом примере представлены иллюстративные способы и схемы создания репрезентативных экспрессионных конструкций rAAV (векторов rAAV), содержащих последовательности фенилаланингидроксилазы (PAH) и их варианты.

[0104] В этом исследовании использовали вектор на основе рекомбинантного AAV (rAAV8). Базовая конструкция вектора rAAV включает экспрессионную кассету, окруженную инвертированными концевыми повторами (ITR): 5'-ITR и 3'-ITR. Эти ITR опосредуют репликацию и упаковку векторного генома при помощи белка репликации Rep AAV и ассоциированных факторов в клетках-продуцентах векторов. Как правило, экспрессионная кассета содержит промотор, кодирующую последовательность, полиА-хвост и/или метку, как показано на **Фиг. 1А** и **Фиг. 1В**. Иллюстративная конструкция экспрессии, кодирующая hPAH, была разработана и приготовлена с использованием стандартных методов молекулярной биологии. Кодирующая последовательность для hPAH была вставлена ниже промотора hTTR (промотор транстиретина человека). Кроме того, специфичный для печени действующий в цис-положении регуляторный модуль (CRM) был вставлен выше промотора, а последовательность интрона минутного вируса мышей (MVM) была вставлена ниже промотора. Эту комбинацию регулятора и промотора тестировали для оценки уровней трансдукции, как показано в следующих ниже примерах. Экспрессионную конструкцию впоследствии лигировали с вектором AAV и подтверждали секвенированием.

Оптимизация кодонов

[0105] Кодирующие последовательности для hPAH были кодон-оптимизированы на основе множества параметров, таких как количество сайтов CpG, содержание GC, палиндромы, повторяющиеся последовательности оснований и исключение сайтов рестрикции и сайтов сплайсинга. Количество последовательностей островков CpG, которые могут вызывать иммунный ответ, сократилось до менее чем 6. Содержание GC поддерживалось приблизительно на уровне 57% (±3%). Повторяющиеся основания, которые были больше или равны 10 п.н., также были удалены.

[0106] Схема иллюстративных конструкций, содержащих PAH, показана на **Фиг. 1А-1D**. Может быть выполнено любое количество вариаций вышеуказанной конструкции. Например, можно использовать более одного промотора и/или можно ввести последовательность WPRE. Кроме того, рассмотрены различные комбинации регуляторной области, промотора и интрона.

Пример 2. Экспрессия in vitro векторов rAAV8, содержащих кодон-оптимизированную последовательность hPAH

[0107] Этот пример иллюстрирует, что векторы rAAV8, содержащие кодон-оптимизированную последовательность hPAH, эффективны в индукции экспрессии hPAH *in vitro.*

[0108] Клетки HepG2 (линия клеток рака печени человека) инфицировали векторами rAAV, содержащими либо последовательность hPAH дикого типа, либо кодон-оптимизированную последовательность hPAH. Уровень экспрессии PAH в клеточных лизатах измеряли с помощью вестерн-блоттинга с антителом к PAH. Как показано на Фиг. 2, **rAAV8**, содержащий кодон-оптимизированную последовательность hPAH (S01), приводил к большей экспрессии hPAH по сравнению с rAAV8, содержащим hPAH дикого типа (T01).

Пример 3. Эффективность in vivo векторов rAAV8 с кодон-оптимизированной последовательностью hPAH

[0109] Этот пример иллюстрирует *in vivo* эффективность кодон-оптимизированных конструкций rAAV8 hPAH в нормализации уровней Phe, Trp и Tyr в плазме у мышей с нокаутом PAH (PAH-KO).

[0110] Мышам с PAH-KO вводили векторы rAAV, содержащие последовательность hPAH дикого типа (группа A, T01); или кодон-оптимизированные последовательности hPAH (группа B и C, S01 и S03). Конструкции вектора rAAV изображены на **Фиг. 1A** и **Фиг. 1B**. Мыши получали 1×10^{13} вг/кг векторов, а образцы плазмы собирали до введения rAAV и на 1, 2, 3, 4 и 5 неделе после инъекции. Мышей умерщвляли на 5 неделе и собирали образцы тканей. Кроме того, отслеживали окраски шерсти мышей. Группу мышей дикого типа и группу не получавших лечение мышей с PAH-KO использовали в качестве положительного и отрицательного контроля, соответственно. Схема эксперимента представлена в **таблице 3** ниже.

Таблица 3. Исследование *in vivo* с использованием векторов rAAV8, содержащих PAH дикого типа и кодон-оптимизированную PAH

Группа	Условие	Лечение	Доза
A	Контрольный вектор	T01	1 x 10^{13} вг/кг
B	Исследование	S01	1 x 10^{13} вг/кг
C	Исследование	S03	1 x 10^{13} вг/кг
D	Положительный контроль	ДТ; Не получавшие лечение	-
E	Отрицательный контроль	PAH-KO; Не получавшие лечение	-

[0111] Эффективность вектор-опосредованной экспрессированной PAH определяли путем мониторинга уровней фенилаланина (Phe), тирозина (Try) и триптофана (Trp) в плазме. Фермент PAH отвечает за первую стадию процессинга фенилаланина и участвует в биосинтезе Tyr и Trp. Результаты представлены на **Фиг. 3A**. У мышей, которым вводили кодон-оптимизированные конструкции, S01 (группа B) и S03 (группа C), наблюдалось значительно сниженное содержание Phe в плазме по сравнению с не получавшими лечение мышами или мышами, которым вводили контрольный вектор T01 (группа A). Через 2 недели после введения уровень Phe у мышей групп B и C был аналогичен таковому у мышей дикого типа (группа D). Более того, сниженный уровень Phe сохранялся через 5 недель после введения однократной дозы. Уровень Tyr и Trp также увеличился у мышей группы B и C по сравнению с уровнем группы A или не получавших лечение мышей с KO (группа E).

[0112] Кроме того, эффективность транскрипции rAAV8, содержащим человеческую кодон-оптимизированную PAH, сравнивали с эффективностью транскрипции rAAV8, содержащим человеческую PAH дикого типа. Результаты представлены на **Фиг. 3B**, и демонстрируют, что, несмотря на сравнимую трансдукцию между rAAV8, содержащим человеческую кодон-оптимизированную PAH, и rAAV8, содержащим человеческую PAH дикого типа, наблюдалась превосходная транскрипция кодон-оптимизированной hPAH.

[0113] Также отслеживали окраски шерсти мышей. Неожиданно окраску шерсти корректировали через 3 недели после введения rAAV8 с кодон-оптимизированной PAH, как показано на **Фиг. 4**.

Пример 4. Генная терапия с использованием векторов rAAV8, содержащих кодон-оптимизированную hPAH, нормализует биомаркеры ФКУ дозозависимым образом

[0114] Этот пример иллюстрирует, что генная терапия с использованием векторов rAAV8, содержащих кодон-оптимизированную последовательность hPAH, нормализует уровни Phe, Tyr и Trp в плазме и окраску шерсти дозозависимым образом.

[0115] Мышам с PAH-KO инъецировали векторы rAAV8, экспрессирующие кодон-оптимизированный вектор hPAH, в низкой (1×10^{12} вг/кг) или высокой (1×10^{13} вг/кг) дозе. Образцы плазмы собирали до введения rAAV и на 1, 2, 3, 4 и 5 неделе после инъекции, и в каждый момент времени измеряли уровни Phe, Tyr и Trp. Дополнительно отслеживали окраску шерсти мышей. В качестве отрицательного контроля использовали группу не получавших лечение мышей с PAH-KO. Схема эксперимента представлена в **таблице 4** ниже.

Таблица 4. Дозозависимый эффект генной терапии с использованием векторов rAAV8 с кодон-оптимизированной PAH дикого типа

Группа	Условие	Лечение	Доза	Количество мышей (N)
F	Низкая доза	S01	1 x 10^{12} вг/кг	6
G	Высокая доза	S01	1 x 10^{13} вг/кг	6
H	Отрицательный контроль	PAH-KO; Не получавшие лечение	-	6

[0116] Результаты представлены на **Фиг. 5**. Уровень Phe в плазме крови значительно снижался у мышей, которым вводили кодон-оптимизированную hPAH дозозависимым образом. Мыши, которым вводили высокую дозу S01, показали 100% изменение окраски шерсти через три недели. Низкая доза, которая в 10 раз ниже высокой дозы, демонстрирует клиническую пользу с отсроченной кинетикой. Кроме того, уровни тирозина и триптофана в плазме мышей с PAH-KO нормализовали после введения малых доз S01.

Пример 5. Нормализация уровней нейтральных аминокислот и нейротрансмиттеров в головном мозге мышей с PAH-KO с помощью генной терапии векторами AAV8, содержащими кодон-оптимизированную hPAH

[0117] Этот пример иллюстрирует *in vivo* эффективность кодон-оптимизированных конструкций rAAV8 hPAH в нормализации уровней Phe, Trp и Tyr в головном мозге мышей с нокаутом PAH (PAH-KO). Кроме того, уровни дофамина и серотонина в головном мозге были восстановлены у мышей с PAH-KO, получавших генную терапию векторами AAV8, содержащими кодон-оптимизированную последовательность hPAH.

Сначала были проведены исследования для оценки уровней фенилаланина, тирозина и триптофана в головном мозге мышей дикого типа (ДТ) и мышей с PAH-KO. Среди всех больших нейтральных аминокислот (LNAA) фенилаланин имеет самое высокую аффинность к переносчику больших нейтральных аминокислот (LNAAT), который транспортирует LNAA через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Если Phe находится в избытке в крови, он насыщает транспортер и, таким образом, снижает уровень отличных от Phe LNAA в головном мозге. Поскольку эти аминокислоты необходимы для синтеза белков и нейротрансмиттеров, накопление Phe препятствует развитию и функционированию мозга. Действительно, фенотипирование мышей ДТ и мышей с PAH-KO подтвердило, что LNAA (Phe, Try и Trp) и нейротрансмиттеры (дофамин, серотонин и норадреналин) дисрегулированы в головном мозге мышей с PAH-KO, как показано на **Фиг. 6**. Концентрации Phe, Tyr и Trp измеряли в тканях головного мозга, извлеченных на 5-й неделе у групп мышей, приведенных в **таблице 4**. Результаты показаны на **Фиг. 7A**. Уровни Phe в головном мозге значительно снизились у мышей с PAH-KO, получавших генную терапию AAV8 с кодон-оптимизированной последовательностью hPAH, дозозависимым образом. Соответственно, уровни как Tyr, так и Trp повышались в головном мозге мышей с PAH-KO, получавших генную терапию AAV8, содержащего кодон-оптимизированную последовательность hPAH, дозозависимым образом. Более того, уровни как серотонина, так и норадреналина восстанавливались в головном мозге получавших лечение мышей с PAH-KO дозозависимым образом, как показано на **Фиг. 7B**.

Пример 6. Долгосрочная стабилизация уровней Phe у мышей с PAH-KO с помощью генной терапии векторами AAV8, содержащими кодон-оптимизированную hPAH

[0118] Этот пример иллюстрирует долгосрочную эффективность *in vivo* генной терапии векторами AAV8, содержащими кодон-оптимизированную последовательность hPAH, у мышей с PAH-KO (**Фиг. 8**).

[0119] Мышам с нокаутом PAH (PAH-KO) вводили кодон-оптимизированные конструкции rAAV8 hPAH в низких (1×10^{12} вг/кг), средних или высоких дозах (1×10^{13} вг/кг). Образцы плазмы собирали до введения rAAV8 и через 7, 14, 35, 56, 98, 140 и 182 дня после инъекции. Уровни фенилаланина измеряли в плазме и сравнивали с уровнями Phe у контрольных (C22) мышей с PAH-KO и контрольных мышей дикого типа, получавших C22. Результаты показаны на **Фиг. 8**.

[0120] Уровни Phe были значительно снижены у мышей с PAH-KO, получавших кодон-оптимизированные конструкции rAAV8 hPAH, по сравнению с контрольными мышами с PAH-KO, получавшими C22. Уровни Phe у мышей, получавших лечение hPAH, были сравнимы с уровнями Phe у мышей дикого типа, получавших контроль C22.

[0121] При высокой дозе 1 x 10^{13} вг/кг уровни Phe в плазме поддерживались на низком уровне, сходном с исходным уровнем и сравнимом с уровнями Phe у мышей дикого типа через 7, 14, 35, 56, 98, 140 и 182 дня после введения, демонстрируя долгосрочную эффективность генной терапии с помощью AAV8 с кодон-оптимизированной hPAH у мышей с PAH-KO.

Эквиваленты и объем

[0122] Специалистам в данной области техники станет понятно или они смогут установить, используя не более чем рутинные эксперименты, существование многочисленных эквивалентов конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в данном документе. Объем настоящего изобретения не ограничивается приведенным выше описанием, а скорее соответствует изложенному в следующей формуле изобретения:

Формула изобретения:

1. Вектор на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащий кодон-оптимизированную последовательность, кодирующую фенилаланингидроксилазу (PAH) человека, причем кодон-оптимизированная последовательность имеет по меньшей мере 70% идентичности с одной из SEQ ID NO: 11-27.

2. rAAV по п. 1, отличающийся тем, что кодон-оптимизированная последовательность имеет по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности с одной из SEQ ID NO: 11-27.

3. rAAV по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что кодон-оптимизированная последовательность идентична одной из SEQ ID NO: 11-27.

4. rAAV по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что rAAV кодирует капсид AAV8.

5. rAAV по п. 4, отличающийся тем, что капсид AAV8 представляет собой модифицированный капсид AAV8 с улучшенной тропностью к печени по сравнению с капсидом AAV8 дикого типа.

6. rAAV по п. 5, отличающийся тем, что капсид AAV8 имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности с капсидом AAV8 дикого типа.

7. rAAV по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что rAAV дополнительно содержит последовательность WPRE.

8. rAAV по п. 7, отличающийся тем, что последовательность WPRE представляет собой природную последовательность WPRE.

9. rAAV по п. 7, отличающийся тем, что последовательность WPRE представляет собой модифицированную последовательность WPRE.

10. rAAV по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что rAAV дополнительно содержит специфичный для печени промотор.

11. rAAV по п. 10, отличающийся тем, что специфичный для печени промотор представляет собой промотор транстиретина (TTR).

12. rAAV по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что rAAV содержит действующий в цис-положении регуляторный модуль (CRM).

13. rAAV по п. 12, отличающийся тем, что вектор содержит один, два, три, четыре, пять или более повторов CRM.

14. rAAV по п. 12 или п. 13, отличающийся тем, что CRM представляет собой CRM8.

15. rAAV по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что rAAV дополнительно содержит интрон, расположенный выше последовательности PAH.

16. rAAV по п. 15, отличающийся тем, что интрон представляет собой интрон мелкого вируса мышей (MVM).

17. Способ лечения фенилкетонурии (ФКУ), включающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего

кодон-оптимизированную последовательность, кодирующую фенилаланингидроксилазу (PAH) человека, причем кодон-оптимизированная последовательность имеет по меньшей мере 70% идентичности с одной из SEQ ID NO: 11-27.

18. Способ по п. 17, отличающийся тем, что введение rAAV приводит к снижению уровня фенилаланина (Phe) в плазме у субъекта по сравнению с контролем.

19. Способ по п. 17 или п. 18, отличающийся тем, что введение rAAV приводит к повышению уровня тирозина в плазме у субъекта по сравнению с контролем.

20. Способ по любому из пп. 17-19, отличающийся тем, что введение rAAV приводит к повышению уровня триптофана в плазме у субъекта по сравнению с контролем.

21. Способ по любому из пп. 18-20, отличающийся тем, что контроль представляет собой уровень до лечения у субъекта.

22. Способ по любому из пп. 18-20, отличающийся тем, что контроль представляет собой эталонный уровень, основанный на полученных ранее данных.

23. Способ по любому из пп. 17-22, отличающийся тем, что кодон-оптимизированная последовательность имеет по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности с одной из SEQ ID NO: 11-27.

24. Способ по любому из пп. 17-23, отличающийся тем, что кодон-оптимизированная последовательность идентична одной из SEQ ID NO: 11-27.

25. Способ по любому из пп. 17-24, отличающийся тем, что rAAV кодирует капсид AAV8.

26. Способ по п. 25, отличающийся тем, что капсид AAV8 представляет собой модифицированный капсид AAV8 с улучшенной тропностью к печени по сравнению с капсидом AAV8 дикого типа.

27. Способ по п. 25, отличающийся тем, что капсид AAV8 имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности с капсидом AAV дикого типа.

28. Способ по любому из пп. 17-27, отличающийся тем, что rAAV дополнительно содержит последовательность WPRE.

29. Способ по п. 28, отличающийся тем, что последовательность WPRE представляет собой природную последовательность WPRE.

30. Способ по п. 28, отличающийся тем, что последовательность WPRE представляет собой модифицированную последовательность WPRE.

31. Способ по любому из пп. 17-30, отличающийся тем, что rAAV дополнительно содержит специфичный для печени промотор.

32. Способ по п. 31, отличающийся тем, что специфичный для печени промотор представляет собой промотор транстиретина (TTR).

33. Способ по любому из пп. 17-32, отличающийся тем, что rAAV содержит действующий в цис-положении регуляторный модуль (CRM).

34. Способ по п. 33, отличающийся тем, что вектор содержит один, два, три, четыре, пять или более повторов CRM.

35. Способ по п. 33 или п. 34, отличающийся тем, что CRM представляет собой CRM8.

36. Способ по любому из пп. 17-35, отличающийся тем, что rAAV дополнительно содержит интрон, расположенный выше последовательности PAH.

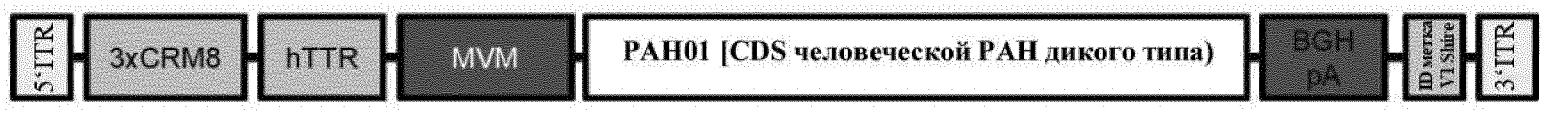
37. Способ по п. 36, отличающийся тем, что интрон представляет собой интрон мелкого вируса мышей (MVM).

38. Способ по любому из пп. 17-37, отличающийся тем, что rAAV вводят в дозе около 1×10^{10} вг/кг, около 1×10^{11} вг/кг, около 1×10^{12} вг/кг, около 1×10^{13} вг/кг, около 1×10^{14} вг/кг или около 1×10^{15} вг/кг.

39. Способ по любому из пп. 17-38, отличающийся тем, что rAAV вводят системно.

40. Способ по любому из пп. 17-38, отличающийся тем, что rAAV вводят внутривенно.

T01

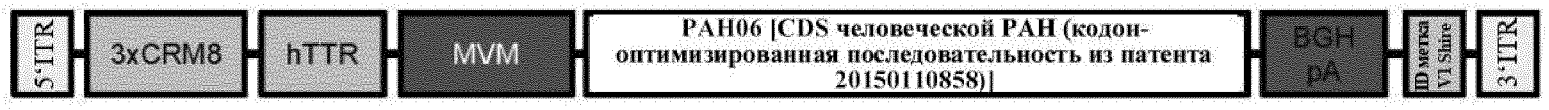


2561 нт

130 п.о. 218 п.о. 233 п.о. 77 п.о. 1359 п.о. 234 п.о. 100 п.о. 133 п.о.

- Кодирующая последовательность человеческой PAH дикого типа (GenBank U49897)
- 23 CpG
- содержание GC 47,1 %

T02

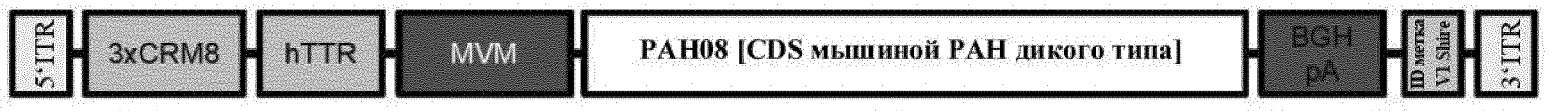


2561 нт

130 п.о. 218 п.о. 233 п.о. 77 п.о. 1359 п.о. 234 п.о. 100 п.о. 133 п.о.

- CDS PAH человека, кодон-оптимизированные – кодон-оптимизированные CDS PAH, описанные в заявке на патент США 20150110858
  - 110 CpG
  - содержание GC 64,6 %

T03



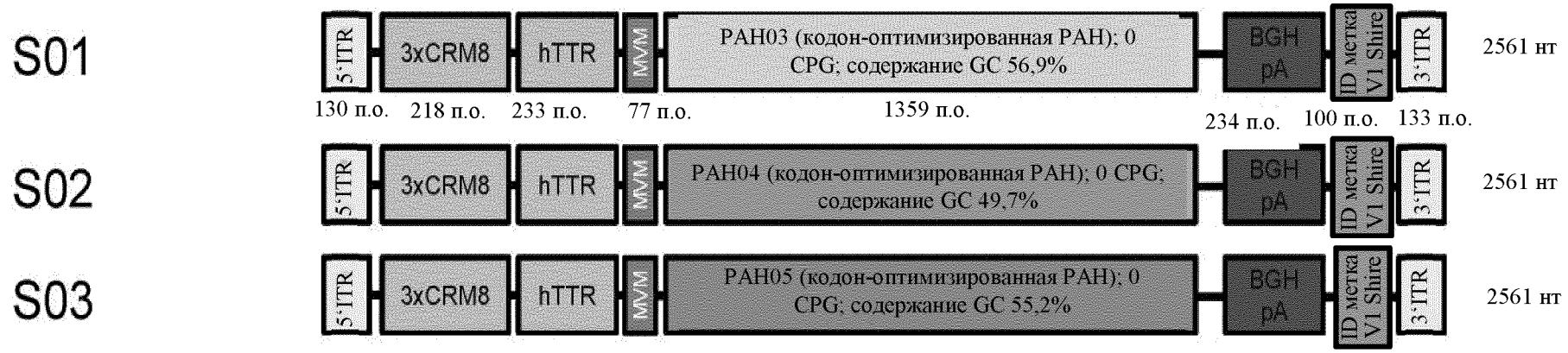
2564 нт

130 п.о. 218 п.о. 233 п.о. 77 п.о. 1362 п.о. 234 п.о. 100 п.о. 133 п.о.

- CDS мышиного PAH (кодирующая последовательность мышиного PAH дикого типа (GenBank NM_008777.3))
  - 30 CpG
  - содержание GC 49,4 %

92% идентичности аминокислотной последовательности между человеческой PAH и мышиной PAH

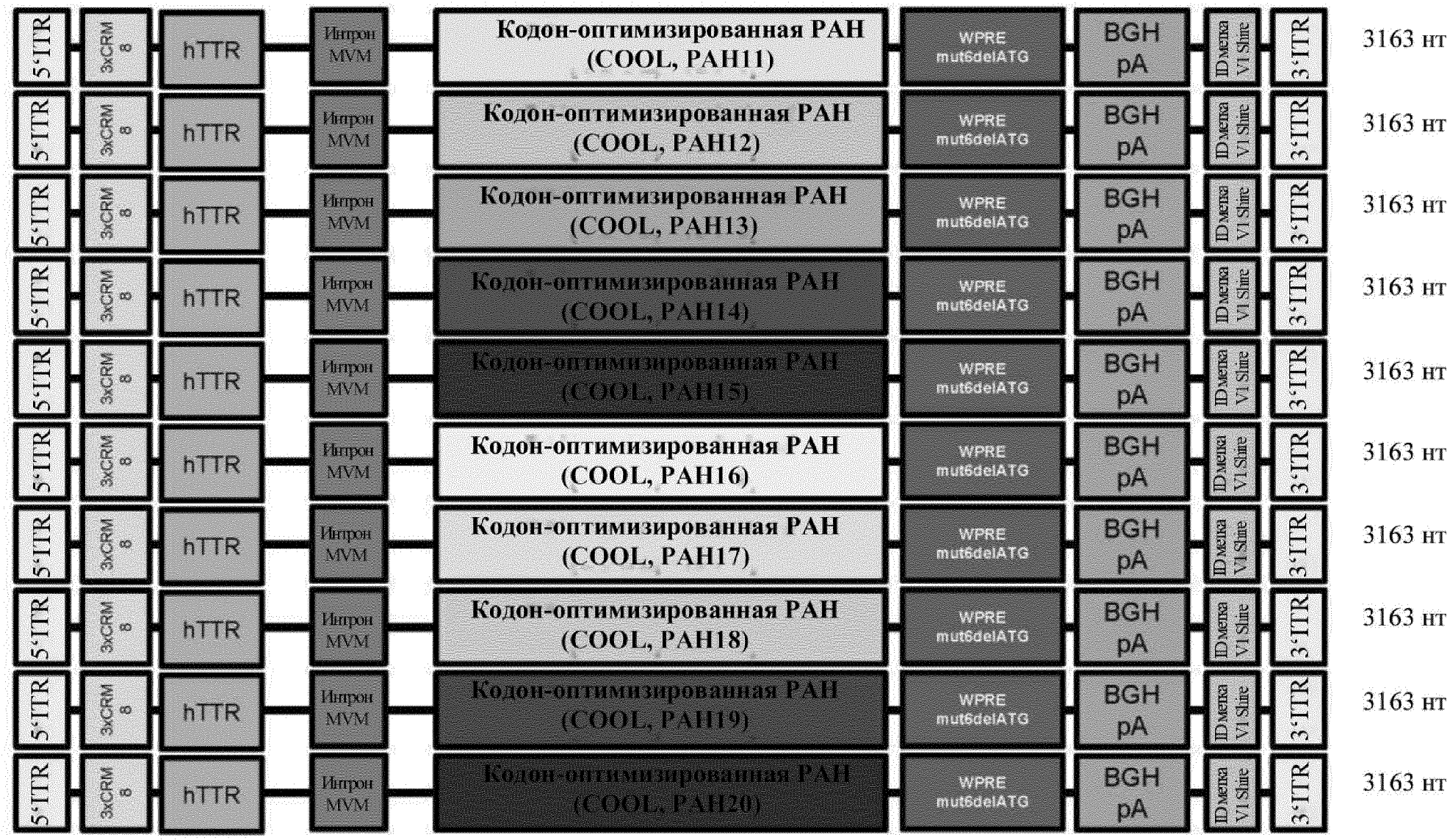
ФИГ. 1A


S01
5'ITR
3xCRM8
hTTR
MVM
PAH03 (кодон-оптимизированная PAH); 0 CPG; содержание GC 56,9%
BGH pA
ID метка V1 Shire
3'ITR
2561 нт
130 п.о.
218 п.о.
233 п.о.
77 п.о.
1359 п.о.
234 п.о.
100 п.о.
133 п.о.
S02
5'ITR
3xCRM8
hTTR
MVM
PAH04 (кодон-оптимизированная PAH); 0 CPG; содержание GC 49,7%
BGH pA
ID метка V1 Shire
3'ITR
2561 нт
S03
5'ITR
3xCRM8
hTTR
MVM
PAH05 (кодон-оптимизированная PAH); 0 CPG; содержание GC 55,2%
BGH pA
ID метка V1 Shire
3'ITR
2561 нт

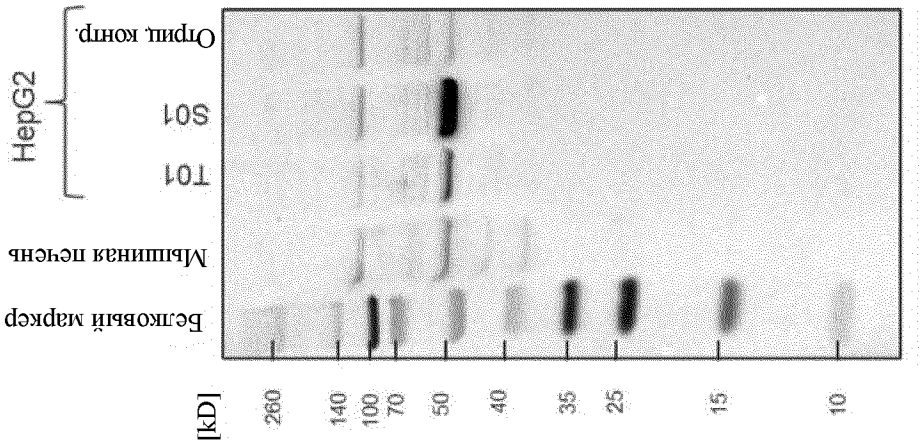
ФИГ. 1B

Tr01
5'ITR
3xCRM8
hTTR
MVM
Кодон-оптимизированная человеческой PAH (PAH03)
WPRE3
BGH pA
ID метка V1 Shire
3'ITR
2809 нт
Tr02
5'ITR
3xCRM8
hTTR
MVM
Кодон-оптимизированная человеческой PAH (PAH03)
WPRE mut6delATG
BGH pA
ID метка V1 Shire
3'ITR
3163 нт

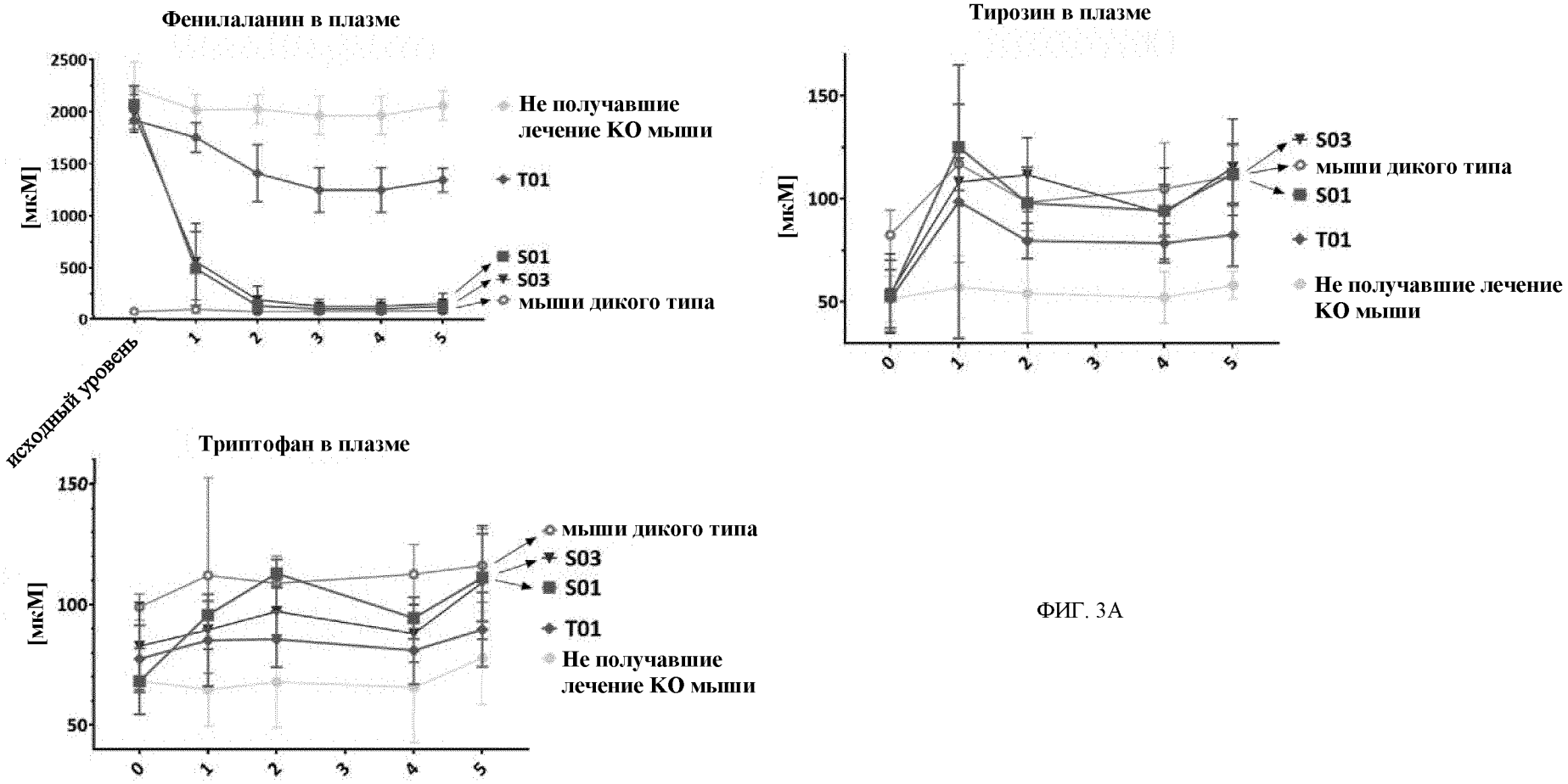
ФИГ. 1C


5'ITR
3xCRM 8
hTTR
Интрон MVM
Кодон-оптимизированная PAH (COOL, PAH11)
Кодон-оптимизированная PAH (COOL, PAH12)
Кодон-оптимизированная PAH (COOL, PAH13)
Кодон-оптимизированная PAH (COOL, PAH14)
Кодон-оптимизированная PAH (COOL, PAH15)
Кодон-оптимизированная PAH (COOL, PAH16)
Кодон-оптимизированная PAH (COOL, PAH17)
Кодон-оптимизированная PAH (COOL, PAH18)
Кодон-оптимизированная PAH (COOL, PAH19)
Кодон-оптимизированная PAH (COOL, PAH20)
WPRE mut6delATG
BGH pA
ID метка V1 Shine
3'ITR
3163 нт

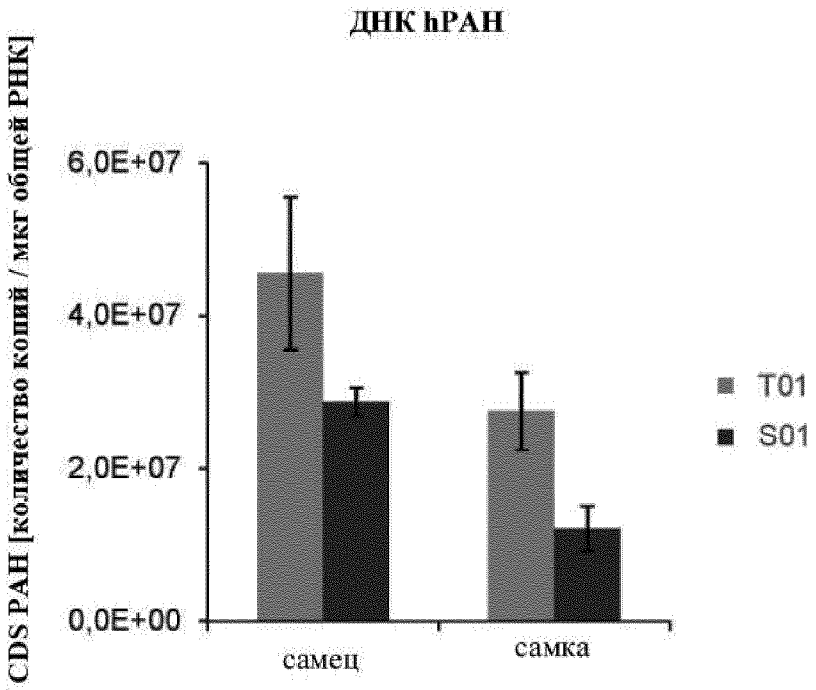
ФИГ. 1D

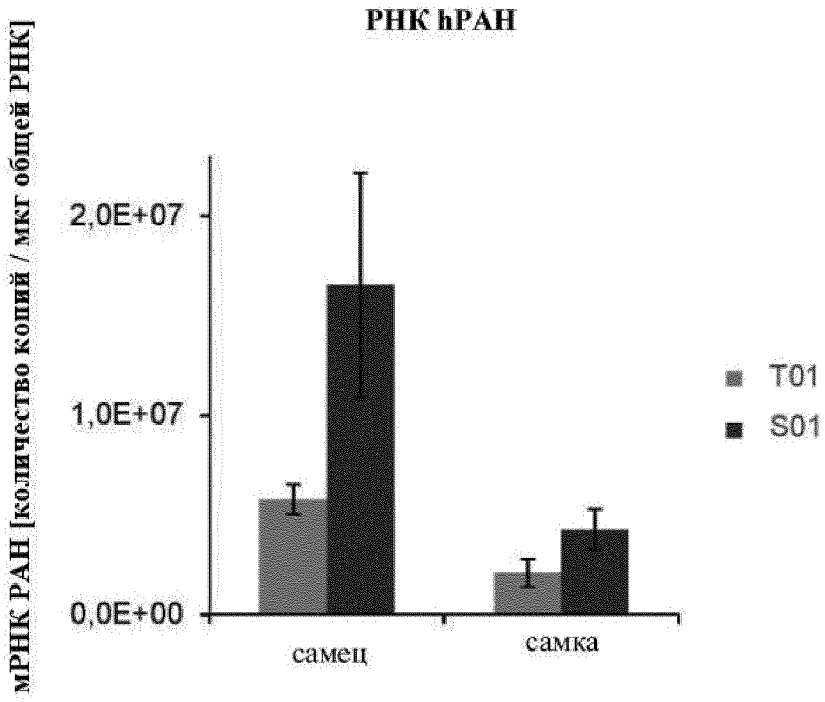

[kD]
260
140
100
70
50
40
35
25
15
10
Белковый маркер
Мышиная печень
T01
S01
Отриц. конт.
HepG2

ФИГ. 2

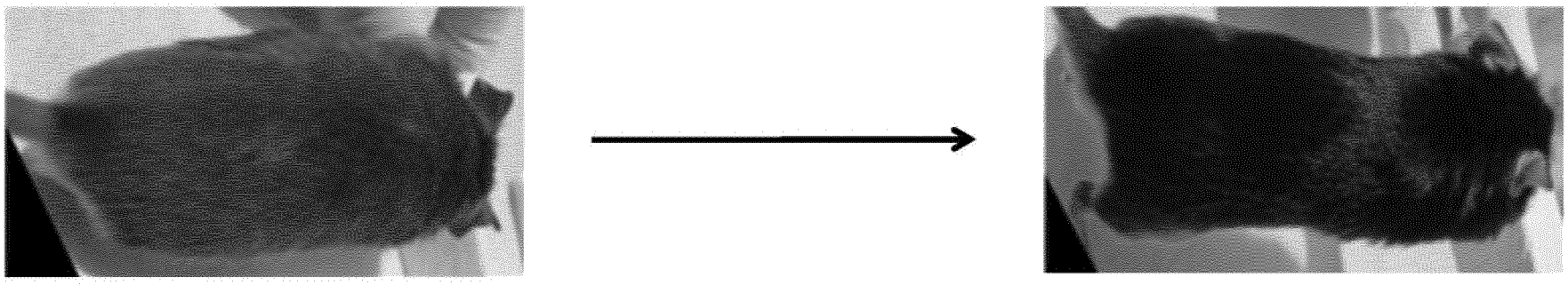

Фенилаланин в плазме
[мкМ]
2500
2000
1500
1000
500
0
исходный уровень
1
2
3
4
5
Не получавшие лечение КО мыши
T01
S01
S03
мыши дикого типа
Тирозин в плазме
[мкМ]
150
100
50
0
1
2
3
4
5
S03
мыши дикого типа
S01
T01
Не получавшие лечение КО мыши
Триптофан в плазме
[мкМ]
150
100
50
0
1
2
3
4
5
мыши дикого типа
S03
S01
T01
Не получавшие лечение КО мыши

ФИГ. 3А


ДНК hPAH
CDS PAH [количество копий / мкг общей РНК]
6,0E+07
4,0E+07
2,0E+07
0,0E+00
самец
самка
T01
S01


РНК hPAH
мРНК PAH [количество копий / мкг общей РНК]
2,0E+07
1,0E+07
0,0E+00
самец
самка
T01
S01

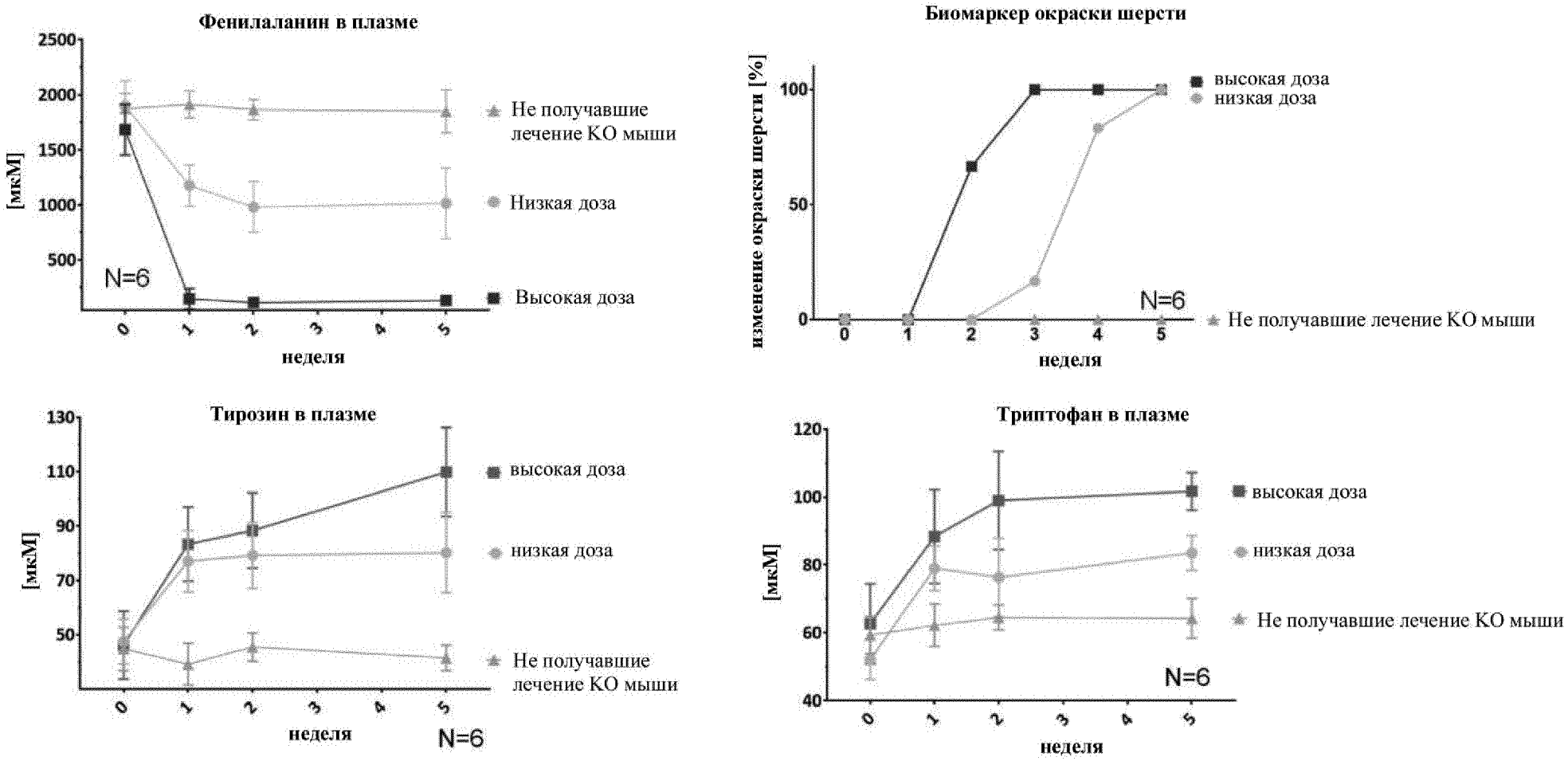
ФИГ. 3B



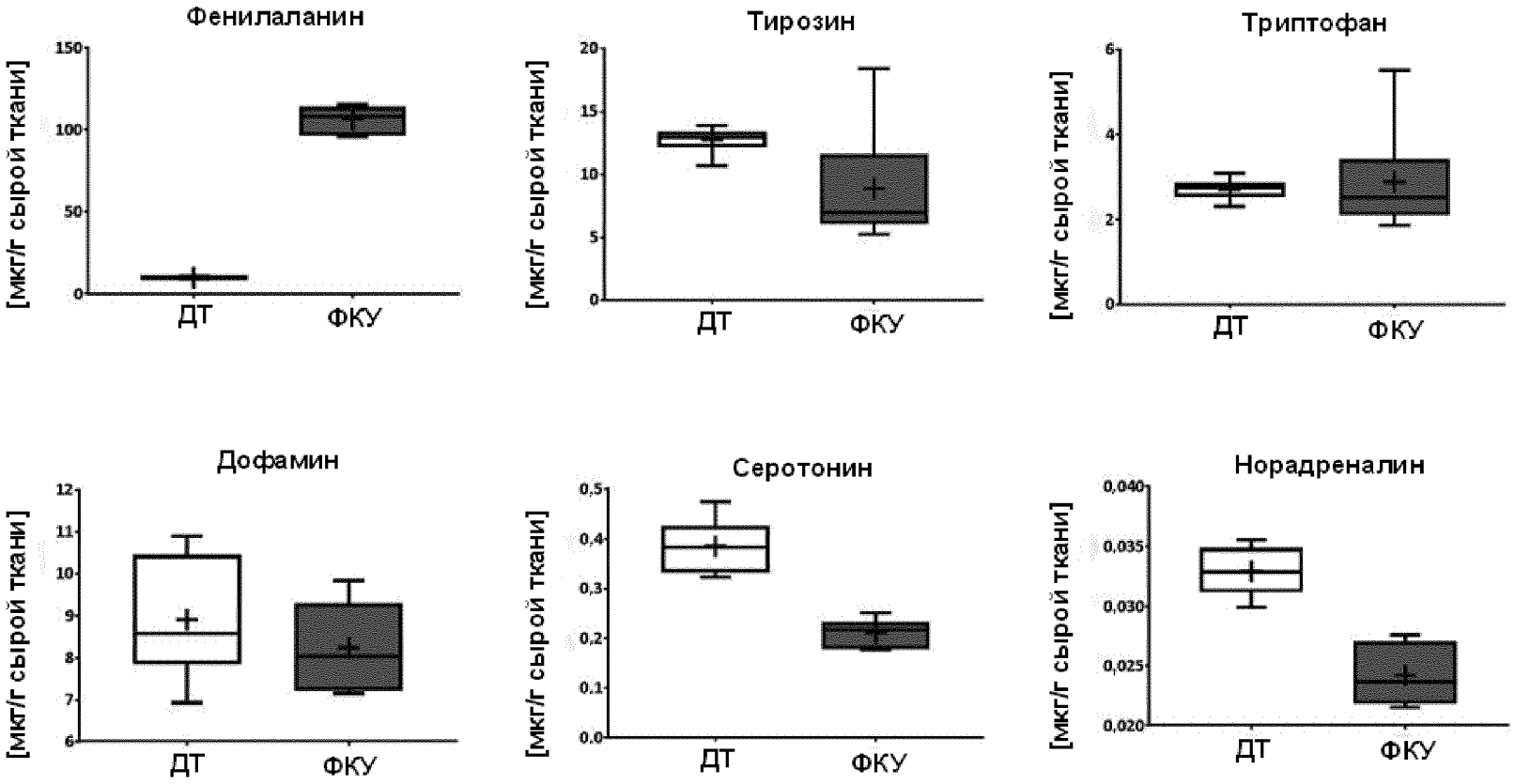
ФКУ (до лечения)

ФКУ (через 3 недели после лечения)

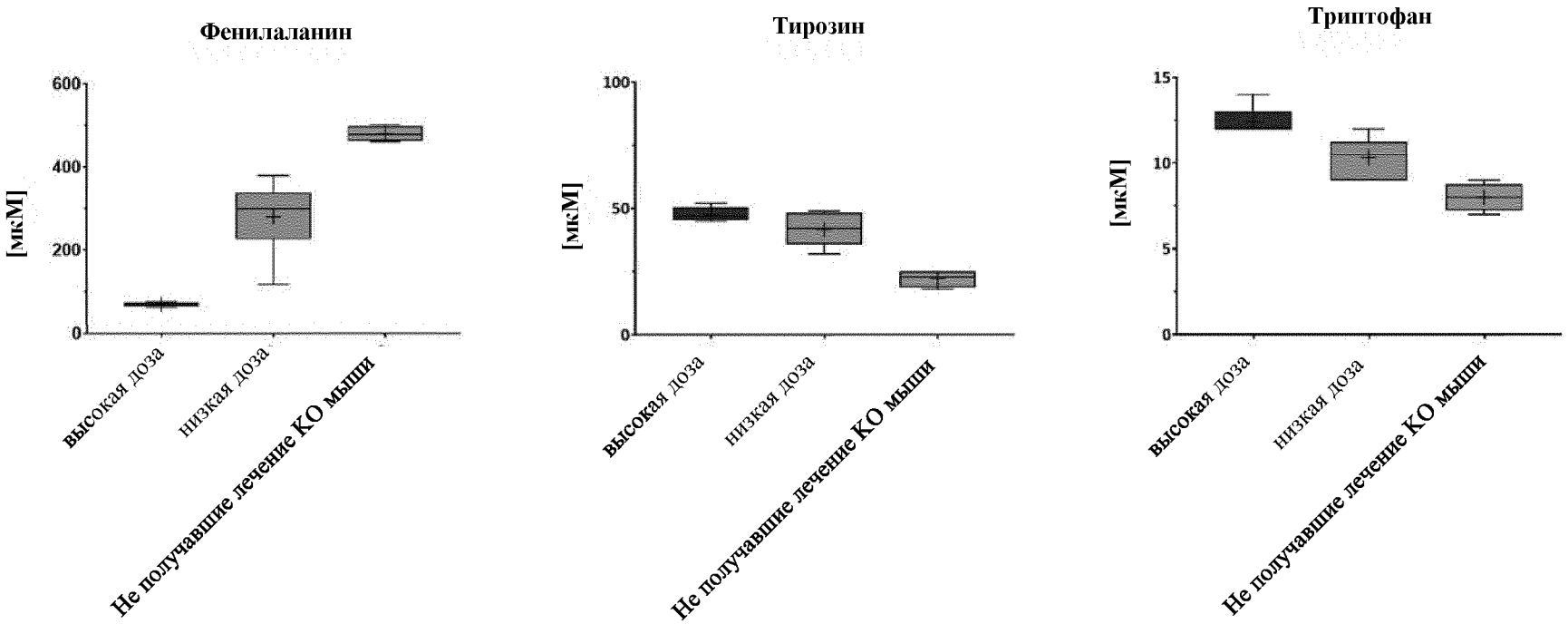
ФИГ. 4


Фенилаланин в плазме
[мкМ]
2500
2000
1500
1000
500
N=6
0 1 2 3 4 5
неделя
Не получавшие лечение КО мыши
Низкая доза
Высокая доза
Биомаркер окраски шерсти
изменение окраски шерсти [%]
100
50
0
N=6
0 1 2 3 4 5
неделя
высокая доза
низкая доза
Не получавшие лечение КО мыши
Тирозин в плазме
[мкМ]
130
110
90
70
50
0 1 2 3 4 5
неделя
N=6
высокая доза
низкая доза
Не получавшие лечение КО мыши
Триптофан в плазме
[мкМ]
120
100
80
60
40
0 1 2 3 4 5
неделя
N=6
высокая доза
низкая доза
Не получавшие лечение КО мыши

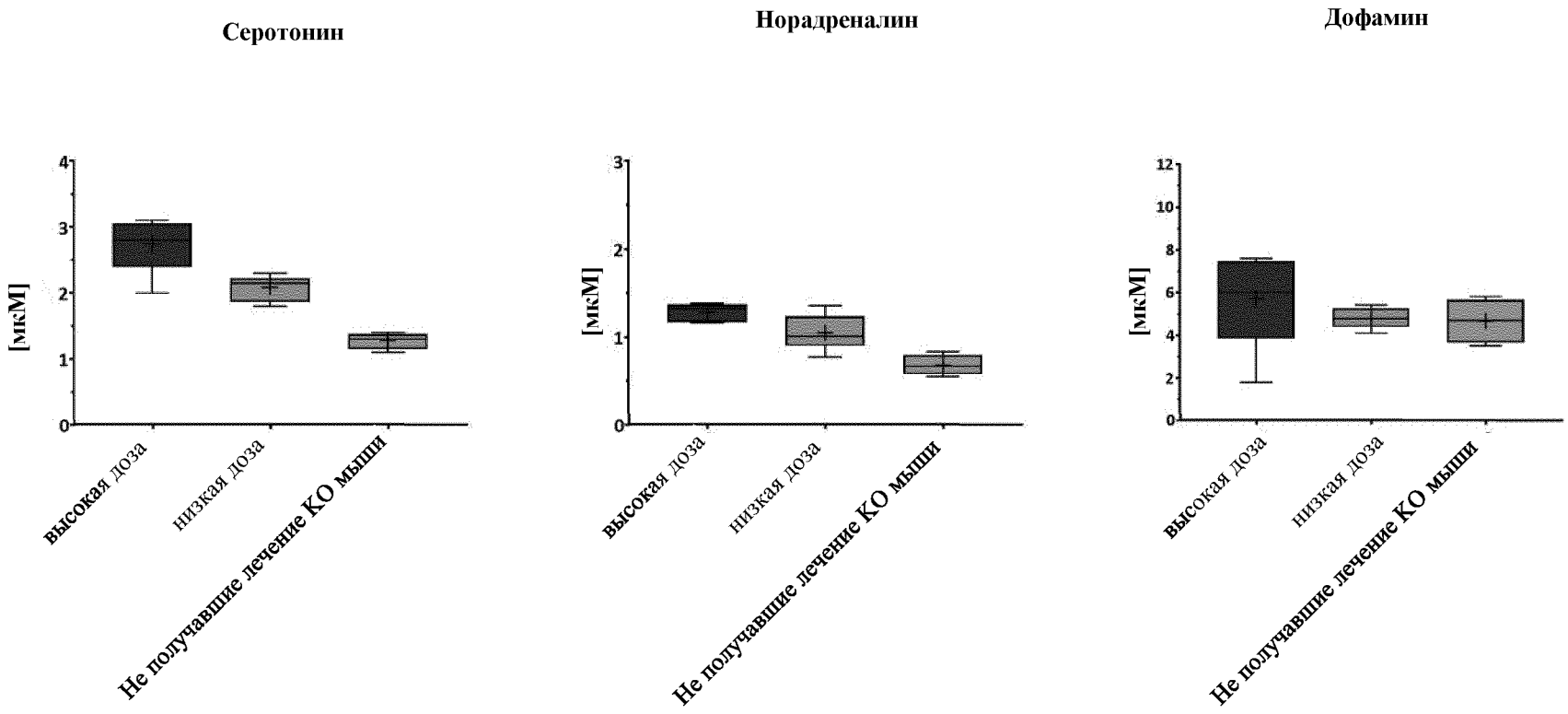
ФИГ. 5


Фенилаланин
[мкг/г сырой ткани]
150
100
50
0
ДТ
ФКУ
Тирозин
[мкг/г сырой ткани]
20
15
10
5
0
ДТ
ФКУ
Триптофан
[мкг/г сырой ткани]
6
4
2
0
ДТ
ФКУ
Дофамин
[мкг/г сырой ткани]
12
11
10
9
8
7
6
ДТ
ФКУ
Серотонин
[мкг/г сырой ткани]
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
ДТ
ФКУ
Норадреналин
[мкг/г сырой ткани]
0,040
0,035
0,030
0,025
0,020
ДТ
ФКУ

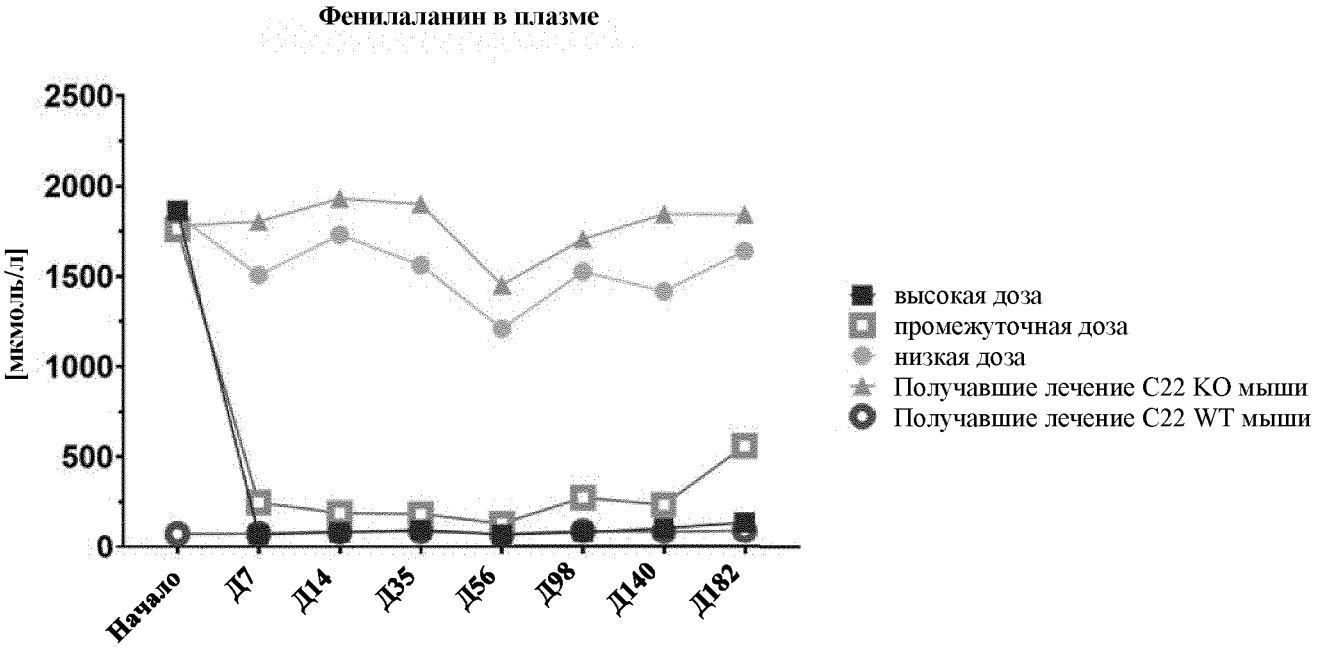
ФИГ. 6


Фенилаланин
[мкМ]
600
400
200
0
высокая доза
низкая доза
Не получавшие лечение КО мыши
Тирозин
[мкМ]
100
50
0
высокая доза
низкая доза
Не получавшие лечение КО мыши
Триптофан
[мкМ]
15
10
5
0
высокая доза
низкая доза
Не получавшие лечение КО мыши

ФИГ. 7А


Серотонин
Норадреналин
Дофамин
[мкМ]
[мкМ]
[мкМ]
0
1
2
3
4
0
1
2
3
0
2
4
6
8
10
12
высокая доза
низкая доза
Не получавшие лечение КО мыши
высокая доза
низкая доза
Не получавшие лечение КО мыши
высокая доза
низкая доза
Не получавшие лечение КО мыши

ФИГ. 7В


Фенилаланин в плазме
[мкмоль/л]
2500
2000
1500
1000
500
0
Начало
Д7
Д14
Д35
Д56
Д98
Д140
Д182
высокая доза
промежуточная доза
низкая доза
Получавшие лечение C22 KO мыши
Получавшие лечение C22 WT мыши

ФИГ. 8