

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292477 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.14

(22) Дата подачи заявки
2021.02.26

(51) Int. Cl. C12N 15/56 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

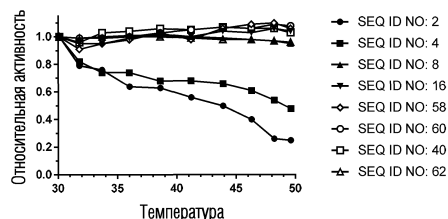
(54) ВАРИАНТЫ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ АЛЬФА-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ

(31) 62/982,949
(32) 2020.02.28
(33) US
(86) PCT/US2021/019811
(87) WO 2021/173928 2021.09.02
(88) 2021.09.30
(71) Заявитель:
КОДЕКСИС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Холлоус Вилльям Кейси, Деллас
Никки, Чжу Юй, Видия Джуди
Виктория Антонио, Чнг Чинпинг,
Серо Антуанетт, Ботэм Рэчел
Кэтлин, Хоумен Дэвид Вилльям,
Алауи Исмаили Мулей Хичам, Врум
Джонатан, Силверман Адам П.,
Валлье Кристен Джин, Редди Чару
Шакла, Макклуски Керрин (US)

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

(57) Изобретение относится к сконструированным полипептидам альфа-галактозидазы человека и к их композициям. Сконструированные полипептиды альфа-галактозидазы человека были оптимизированы для обеспечения повышенной термостабильности, стабильности в сыворотке, улучшенного поглощения клетками и стабильности как в кислотных (pH < 4), так и в основных (pH > 7) условиях, сниженной иммуногенности и улучшения выведения глоботриаозилцерамида из клеток. Настоящее изобретение также относится к применению композиций, содержащих сконструированные полипептиды альфа-галактозидазы человека, в терапевтических целях.



A1

202292477

202292477

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575578EA/23

ВАРИАНТЫ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ АЛЬФА-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ

[0001] В настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США рег. № 62/982949, поданной 28 февраля 2020 г., которая в полном объеме и во всех целях включена в настоящее описание посредством ссылки.

Область изобретения

[0002] Настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам альфа-галактозидазы человека и к их композициям. Сконструированные полипептиды альфа-галактозидазы человека были оптимизированы для обеспечения повышенной термостабильности, стабильности в сыворотке, сниженной иммуногенности, улучшенного поглощения клетками и стабильности как в кислотных ($\text{pH} < 4$), так и в основных ($\text{pH} > 7$) условиях, а также для улучшения выведения глоботриаозилцерамида из клеток. Настоящее изобретение также относится к применению композиций, содержащих сконструированные полипептиды альфа-галактозидазы человека, в терапевтических целях.

Ссылка на список последовательностей, таблицу или компьютерную программу

[0003] Официальная копия списка последовательностей представлена одновременно с описанием в виде текстового файла в формате ASCII через EFS-Web с именем файла «CX7-203WO2_ST25.txt», датой создания 22 февраля 2021 г. и размером 4,43 мегабайт. Список последовательностей, представленный через EFS-Web, является частью описания и в полном объеме включен в настоящее описание посредством ссылки.

Предпосылки создания изобретения

[0004] Альфа-галактозидаза человека («GLA»; EC 3.2.1.22) представляет собой лизосомный гликопротеин, ответственный за гидролиз концевых альфа-галактозильных фрагментов гликолипидов и гликопротеинов. Он действует на многих субстратах, присутствующих в различных тканях человека. Болезнь Фабри (также называемая диффузной ангиокератомой тела, болезнью Андерсона-Фабри, наследственным дистопическим липидозом, дефицитом альфа-галактозидазы А, дефицитом GLA и дефицитом церамид-тригексозидазы) представляет собой X-сцепленное врожденное нарушение катаболизма гликосфинголипидов, возникающее в результате недостаточной активности или отсутствия активности альфа-галактозидазы А. У пациентов с болезнью Фабри накапливается глоботриаозилцерамид (обозначаемый здесь как «Gb₃» и «Gb₃») и родственные гликосфинголипиды в плазме и в клеточных лизосомах кровеносных сосудов, тканей и органов (см., например, Nance et al., Arch. Neurol., 63:453-457 [2006]). С возрастом, кровеносные сосуды пациента постепенно сужаются из-за накопления этих липидов, что приводит к снижению притока крови и питания к тканям, особенно к коже, почкам, сердцу, головному мозгу и к нервной системе. Таким образом, болезнь Фабри представляет собой системное заболевание, проявляющееся почечной недостаточностью,

заболеванием сердца, цереброваскулярным заболеванием, периферической невропатией мелких волокон и поражением кожи, а также другими нарушениями (см., например, Schiffmann, Pharm. Ther., 122:65- 77 [2009]). У пациентов с таким заболеванием проявляются такие симптомы, как болезненность рук и ног, скопление небольших темно-красных пятен на коже, снижение потоотделения, помутнение роговицы, желудочно-кишечные расстройства, шум в ушах и потеря слуха. Потенциально опасные для жизни осложнения включают прогрессирующее повреждение почек, сердечные приступы и инсульт. Это заболевание поражает приблизительно 1 из 40000-60000 мужчин, но также встречается и у женщин. Действительно, у женщин с гетерозиготами, ассоциированными с болезнью Фабри, наблюдаются значительно угрожающие жизни состояния, включая патологии нервной системы, хронические боли, утомляемость, высокое кровяное давление, болезни сердца, почечную недостаточность и инсульт, что требует медицинского вмешательства (см., например, Want et al., Genet. Med., 13:457-484 [2011]). Признаки болезни Фабри могут проявиться в любое время, начиная с младенческого возраста, причем, такие признаки обычно начинают проявляться в возрасте от 4 до 8 лет, хотя у некоторых пациентов заболевание проявляется в более легкой форме с поздним началом. Лечение, как правило, является поддерживающим, так как болезнь Фабри неизлечима, а поэтому остается потребность в безопасном и эффективном лечении.

Сущность изобретения

[0005] Настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам альфа-галактозидазы человека и к их композициям. Сконструированные полипептиды альфа-галактозидазы человека были оптимизированы для обеспечения повышенной термостабильности, стабильности в сыворотке, сниженной иммуногенности, улучшенного поглощения клетками и стабильности как в кислотных ($\text{pH} < 4$), так и в основных ($\text{pH} > 7$) условиях, а также для улучшения выведения глоботриаозилцерамида из клеток. Настоящее изобретение также относится к применению композиций, содержащих сконструированные полипептиды альфа-галактозидазы человека, в терапевтических целях.

[0006] Настоящее изобретение относится к фрагменту рекомбинантной альфа-галактозидазы А и/или биологически активной рекомбинантной альфа-галактозидазы А, содержащему аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 91%, по меньшей мере приблизительно на 92%, по меньшей мере приблизительно на 93%, по меньшей мере приблизительно на 94%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, или по меньшей мере приблизительно на 99% идентична последовательности SEQ ID NO:8. Настоящее изобретение относится к фрагменту рекомбинантной альфа-галактозидазы А и/или биологически активной рекомбинантной

альфа-галактозидазы А, содержащему аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 8.

[0007] Настоящее изобретение также относится к рекомбинантной альфа-галактозидазе А, где указанная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 8 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 44, 44/217, 44/217/316, 44/217/322, 44/217/322/337, 44/247, 44/247/302, 44/247/302/322, 44/247/322, 44/247/337, 44/247/362, 44/302, 44/337, 44/373, 217/322, 217/373, 247/322, 247/362, 302/322/362/373, 302/337, 316, 316/337, 322, 322/337, 362/373 и 373, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 8 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 44L, 44L/217F, 44L/217F/316L, 44L/217F/322M, 44L/217F/322M/337A, 44L/247N, 44L/247N/302Q, 44L/247N/302Q/322M, 44L/247N/322M, 44L/247N/337A, 44L/247N/362K, 44L/302Q, 44L/337A, 44L/373R, 217F/322M, 217F/373R, 247N/322M, 247N/362K, 302Q/322M/362K/373R, 302Q/337A, 316L, 316L/337A, 322M, 322M/337A, 362K/373R и 373R, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 8, или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из R44L, R44L/R217F, R44L/R217F/D316L, R44L/R217F/I322M, R44L/R217F/I322M/P337A, R44L/D247N, R44L/D247N/K302Q, R44L/D247N/K302Q/I322M, R44L/D247N/I322M, R44L/D247N/P337A, R44L/D247N/Q362K, R44L/K302Q, R44L/P337A, R44L/K373R, R217F/I322M, R217F/K373R, D247N/I322M, D247N/Q362K, K302Q/I322M/Q362K/K373R, K302Q/P337A, D316L, D316L/P337A, I322M, I322M/P337A, Q362K/K373R и K373R, где положения аминокислот в указанной полипептидной последовательности пронумерованы

со ссылкой на SEQ ID NO: 8.

[0008] Настоящее изобретение также относится к рекомбинантной альфа-галактозидазе А, где указанная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 8 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 10/39/44/47/92/166/206/217/247/261/271/302/316/322/337/362/368/373/392, 44/217/316, 44/217/322/337, 166/362, 217/373 и 362/373, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична SEQ ID NO: 8 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 10T/39M/44L/47S/92Y/166S/206K/217F/247N/261A/271H/302Q/316L/322M/337A/362K/368W/373R/392M, 44L/217F/316L, 44L/217F/322M/337A, 166A/362K, 217F/373R и 362K/373R, где положения аминокислот в указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 8 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из P10T/E39M/R44L/T47S/H92Y/P166S/A206K/R217F/D247N/G261A/A271H/K302Q/D316L/I322M/P337A/Q362K/A368W/K373R/T392M, R44L/R217F/D316L, R44L/R217F/I322M/P337A, P166A/Q362K, R217F/K373R и Q362K/K373R где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 8.

[0009] Настоящее изобретение также относится к рекомбинантной альфа-галактозидазе А, где указанная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 58 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 7, 7/48/68, 7/48/68/120/282/299, 7/48/130/282, 7/48/180, 7/68/130/282/365, 7/68/180, 7/88/120/305/365, 7/120, 7/130, 7/282, 7/305, 7/305/365, 7/365, 39,

47, 47/87/95/96/158/162, 47/95, 47/273, 47/343, 48, 48/68, 48/180/282, 48/282, 48/282/305, 67/180, 68, 68/299/300, 71, 87/91/95/96/158/162, 87/91/95/96/206/343, 87/96/155/273/343, 88, 91/95, 91/95/96, 92, 93, 96, 96/273, 96/312/343, 120, 120/299/305, 151, 158, 158/162/273, 162, 162/273, 162/343, 166, 178, 180, 181, 206, 217, 271, 273, 273/343, 282, 282/365, 293/391, 299/300, 299/300/305/365, 300, 301, 305, 305/365, 314, 333, 336, 337, 343, 345, 363, 365, 370, 389, 393, 394, 396/398, 397 и 398, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 58 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 7L, 7L/48D/68E, 7L/48D/68E/120H/282N/299R, 7L/48D/130E/282N, 7L/48D/180G, 7L/68E/130E/282N/365V, 7L/68E/180G, 7L/88A/120H/305G/365V, 7L/120H, 7L/130E, 7L/282N, 7L/305G, 7L/305G/365V, 7L/365V, 39V, 47D, 47D/87K/95E/96L/158R/162H, 47D/95E, 47D/273P, 47D/343G, 47V, 48D, 48D/68E, 48D/180G/282N, 48D/282N, 48D/282N/305G, 67T/180G, 68E, 68E/299R/300I, 71P, 87K/91Q/95E/96L/158A/162K, 87K/91Q/95E/96L/206S/343G, 87K/96I/155N/273P/343G, 88A, 91Q/95E, 91Q/95E/96L, 92F, 92T, 93I, 96L, 96L/273P, 96L/312Q/343G, 120H, 120H/299R/305G, 151L, 158A, 158A/162K/273G, 158R, 162H/343D, 162K, 162K/273P, 162S, 166K, 178G, 178S, 180G, 180L, 180T, 180V, 181A, 206K, 206S, 217K, 271R, 273P, 273P/343G, 282N, 282N/365V, 293P/391A, 299R/300I, 299R/300I/305G/365V, 300I, 301M, 305G, 305G/365V, 314A, 333F, 333G, 336V, 337R, 343D, 343G, 345A, 345Q, 363Q, 365A, 365Q, 365V, 370G, 389K, 393V, 394K, 396G/398T, 397A, 398A, 398P, 398S и 398V, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 58 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из R7L, R7L/E48D/Q68E, R7L/E48D/Q68E/Y120H/D282N/Q299R, R7L/E48D/D130E/D282N, R7L/E48D/F180G, R7L/Q68E/D130E/D282N/F365V, R7L/Q68E/F180G, R7L/Q88A/Y120H/N305G/F365V, R7L/Y120H, R7L/D130E, R7L/D282N, R7L/N305G, R7L/N305G/F365V, R7L/F365V, E39V, T47D, T47D/R87K/S95E/K96L/L158R/R162H, T47D/S95E, T47D/S273P, T47D/K343G, T47V, E48D, E48D/Q68E, E48D/F180G/D282N, E48D/D282N, E48D/D282N/N305G, P67T/F180G, Q68E, Q68E/Q299R/L300I, S71P, R87K/N91Q/S95E/K96L/L158A/R162K, R87K/N91Q/S95E/K96L/A206S/K343G, R87K/K96I/H155N/S273P/K343G, Q88A, N91Q/S95E, N91Q/S95E/K96L, H92F, H92T, V93I, K96L, K96L/S273P, K96L/P312Q/K343G,

Y120H, Y120H/Q299R/N305G, D151L, L158A, L158A/R162K/S273G, L158R, R162H/K343D, R162K, R162K/S273P, R162S, P166K, W178G, W178S, F180G, F180L, F180T, F180V, Q181A, A206K, A206S, R217K, A271R, S273P, S273P/K343G, D282N, D282N/F365V, L293P/Q391A, Q299R/L300I, Q299R/L300I/N305G/F365V, L300I, R301M, N305G, N305G/F365V, S314A, S333F, S333G, I336V, P337R, K343D, K343G, V345A, V345Q, L363Q, F365A, F365Q, F365V, S370G, T389K, S393V, L394K, D396G/L398T, L397A, L398A, L398P, L398S и L398V, где положения аминокислот в указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 58.

[0010] Настоящее изобретение также относится к рекомбинантной альфа-галактозидазе А, где указанная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 158 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 24/202, 39/47, 39/47/217, 39/151, 39/282/337/398, 39/337/343/398, 39/393/398, 47/130, 47/151, 47/343/345/393, 48, 48/68, 48/68/217/333/391/393, 48/68/333, 48/217, 48/333, 48/345/393, 48/393, 59/143, 68, 68/345, 130, 130/158, 130/158/393, 130/345/393, 143/271, 143/333, 143/387, 151, 151/158/217/343/345/393, 151/206/282/337/343/345/398, 151/282/393, 151/345/393/398, 151/393, 158, 158/393, 202, 206, 206/217, 217, 217/333, 217/337/345/398, 271, 282/393, 333, 333/345, 337/343/345/398, 343, 343/345/393/398, 393 и 393/398, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 158. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 158 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 24S/202N, 39V/47D, 39V/47V/217K, 39V/151L, 39V/282N/337R/398A, 39V/337R/343G/398A, 39V/393V/398A, 47V/130E, 47V/151L, 47V/343D/345Q/393V, 48D, 48D/68E, 48D/68E/217K/333F/391A/393V, 48D/68E/333F, 48D/217K, 48D/333F, 48D/333G, 48D/345Q/393V, 48D/393V, 59A/143S, 68E, 68E/345Q, 130E, 130E/158R, 130E/158R/393V, 130E/345Q/393V, 143S/271N, 143S/333N, 143S/387N, 151L, 151L/158R/217K/343G/345Q/393V, 151L/206S/282N/337R/343D/345Q/398A, 151L/282N/393V, 151L/345Q/393V/398A, 151L/393V, 158R, 158R/393V, 202N, 206S, 206S/217K, 217K, 217K/333F, 217K/333G, 217K/337R/345Q/398A, 271N, 282N/393V, 333F/345Q, 333G, 333N, 337R/343G/345Q/398A, 343D, 343D/345Q/393V/398A, 393V и 393V/398A, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 158. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит

полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 8 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из D24S/D202N, E39V/T47D, E39V/T47V/R217K, E39V/D151L, E39V/D282N/P337R/L398A, E39V/P337R/K343G/L398A, E39V/S393V/L398A, T47V/D130E, T47V/D151L, T47V/K343D/V345Q/S393V, E48D, E48D/Q68E, E48D/Q68E/R217K/S333F/Q391A/S393V, E48D/Q68E/S333F, E48D/R217K, E48D/S333F, E48D/S333G, E48D/V345Q/S393V, E48D/S393V, C59A/C143S, Q68E, Q68E/V345Q, D130E, D130E/L158R, D130E/L158R/S393V, D130E/V345Q/S393V, C143S/A271N, C143S/S333N, C143S/E387N, D151L, D151L/L158R/R217K/K343G/V345Q/S393V, D151L/A206S/D282N/P337R/K343D/V345Q/L398A, D151L/D282N/S393V, D151L/V345Q/S393V/L398A, D151L/S393V, L158R, L158R/S393V, D202N, A206S, A206S/R217K, R217K, R217K/S333F, R217K/S333G, R217K/P337R/V345Q/L398A, A271N, D282N/S393V, S333F/V345Q, S333G, S333N, P337R/K343G/V345Q/L398A, K343D, K343D/V345Q/S393V/L398A, S393V и S393V/L398A, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 158.

[0011] Настоящее изобретение также относится к рекомбинантной альфа-галактозидазе А, где указанная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 372 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 10, 10/39/44/322, 10/39/92/206/217/271, 10/39/92/247, 10/39/92/247/271/316, 10/44, 10/44/47/92/247, 10/44/47/261/302/322/368, 10/44/92/316/322, 10/44/261/302/316, 10/44/302/337/368, 10/47/217/247/316/392, 10/47/217/322, 10/47/271, 10/92, 10/92/206/217/247, 10/92/206/247/316/322/392, 10/92/206/247/322/368, 10/92/217/261/302/337, 10/206/217/271, 10/206/247, 10/206/261/271/316, 10/261, 10/271/302, 10/302, 10/302/316, 10/302/322/337, 10/316/322, 10/337/392, 10/368, 39/44/92/162/247/302/316/322, 39/44/92/217/322, 39/44/92/247/271/302, 39/47/92/247/302/316/322, 39/47/217/247/368, 39/47/247, 39/92/247/302/316/337/368, 39/92/316/322, 39/247/271, 39/247/271/316, 39/322, 44/47/92/206/217/316/322, 44/47/92/247/261/271/316/337/368, 44/47/206/217/247/271/322, 44/47/247/322/368, 44/47/302/316/322, 44/92/206/247/368, 44/206/337, 44/247/261/302/316, 44/247/261/302/316/322, 47/92/247/271, 47/217/302, 47/247, 47/247/271, 89/217/247/261/302/316, 92/217/271, 92/247, 92/247/271/322, 92/247/302/322/337, 92/271/337, 92/302, 92/316, 206/217/271/392, 217/247/316/322/337/368, 247, 247/271, 247/302, 271, 271/302/322, 271/316/322, 302/322/368 и 368, где аминокислотные положения указанной полипептидной

последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 372. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 372 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 10P, 10P/39E/44R/322I, 10P/39E/92H/206A/217R/271A, 10P/39E/92H/247D, 10P/39E/92H/247D/271A/316D, 10P/44R, 10P/44R/47T/92H/247D, 10P/44R/47T/261G/302K/322I/368A, 10P/44R/92H/316D/322I, 10P/44R/261G/302K/316D, 10P/44R/302K/337P/368A, 10P/47T/217R/247D/316D/392T, 10P/47T/217R/322I, 10P/47T/271A, 10P/92H, 10P/92H/206A/217R/247D, 10P/92H/206A/247D/316D/322I/392T, 10P/92H/206A/247D/322I/368A, 10P/92H/217R/261G/302K/337P, 10P/206A/217R/271A, 10P/206A/247D, 10P/206A/261G/271A/316D, 10P/261G, 10P/271A/302K, 10P/302K, 10P/302K/316D, 10P/302K/322I/337P, 10P/316D/322I, 10P/337P/392T, 10P/368A, 39E/44R/92H/162M/247D/302K/316D/322I, 39E/44R/92H/217R/322I, 39E/44R/92H/247D/271A/302K, 39E/47T/92H/247D/302K/316D/322I, 39E/47T/217R/247D/368A, 39E/47T/247D, 39E/92H/247D/302K/316D/337P/368A, 39E/92H/316D/322I, 39E/247D/271A, 39E/247D/271A/316D, 39E/322I, 44R/47T/92H/206A/217R/316D/322I, 44R/47T/92H/247D/261G/271A/316D/337P/368A, 44R/47T/206A/217R/247D/271A/322I, 44R/47T/247D/322I/368A, 44R/47T/302K/316D/322I, 44R/92H/206A/247D/368A, 44R/206A/337P, 44R/247D/261G/302K/316D, 44R/247D/261G/302K/316D/322I, 47T/92H/247D/271A, 47T/217R/302K, 47T/247D, 47T/247D/271A, 89I/217R/247D/261G/302K/316D, 92H/217R/271A, 92H/247D, 92H/247D/271A/322I, 92H/247D/302K/322I/337P, 92H/271A/337P, 92H/302K, 92H/316D, 206A/217R/271A/392T, 217R/247D/316D/322I/337P/368A, 247D, 247D/271A, 247D/302K, 271A, 271A/302K/322I, 271A/316D/322I, 302K/322I/368A и 368A, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 372. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 372 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из T10P, T10P/M39E/L44R/M322I, T10P/M39E/Y92H/K206A/F217R/H271A, T10P/M39E/Y92H/N247D, T10P/M39E/Y92H/N247D/H271A/L316D, T10P/L44R, T10P/L44R/S47T/Y92H/N247D, T10P/L44R/S47T/A261G/Q302K/M322I/W368A, T10P/L44R/Y92H/L316D/M322I, T10P/L44R/A261G/Q302K/L316D, T10P/L44R/Q302K/A337P/W368A, T10P/S47T/F217R/N247D/L316D/M392T, T10P/S47T/F217R/M322I, T10P/S47T/H271A, T10P/Y92H,

T10P/Y92H/K206A/F217R/N247D, T10P/Y92H/K206A/N247D/L316D/M322I/M392T,
T10P/Y92H/K206A/N247D/M322I/W368A, T10P/Y92H/F217R/A261G/Q302K/A337P,
T10P/K206A/F217R/H271A, T10P/K206A/N247D, T10P/K206A/A261G/H271A/L316D,
T10P/A261G, T10P/H271A/Q302K, T10P/Q302K, T10P/Q302K/L316D,
T10P/Q302K/M322I/A337P, T10P/L316D/M322I, T10P/A337P/M392T, T10P/W368A,
M39E/L44R/Y92H/R162M/N247D/Q302K/L316D/M322I, M39E/L44R/Y92H/F217R/M322I,
M39E/L44R/Y92H/N247D/H271A/Q302K, M39E/S47T/Y92H/N247D/Q302K/L316D/M322I,
M39E/S47T/F217R/N247D/W368A, M39E/S47T/N247D,
M39E/Y92H/N247D/Q302K/L316D/A337P/W368A, M39E/Y92H/L316D/M322I,
M39E/N247D/H271A, M39E/N247D/H271A/L316D, M39E/M322I,
L44R/S47T/Y92H/K206A/F217R/L316D/M322I,
L44R/S47T/Y92H/N247D/A261G/H271A/L316D/A337P/W368A,
L44R/S47T/K206A/F217R/N247D/H271A/M322I, L44R/S47T/N247D/M322I/W368A,
L44R/S47T/Q302K/L316D/M322I, L44R/Y92H/K206A/N247D/W368A, L44R/K206A/A337P,
L44R/N247D/A261G/Q302K/L316D, L44R/N247D/A261G/Q302K/L316D/M322I,
S47T/Y92H/N247D/H271A, S47T/F217R/Q302K, S47T/N247D, S47T/N247D/H271A,
L89I/F217R/N247D/A261G/Q302K/L316D, Y92H/F217R/H271A, Y92H/N247D,
Y92H/N247D/H271A/M322I, Y92H/N247D/Q302K/M322I/A337P, Y92H/H271A/A337P,
Y92H/Q302K, Y92H/L316D, K206A/F217R/H271A/M392T,
F217R/N247D/L316D/M322I/A337P/W368A, N247D, N247D/H271A, N247D/Q302K,
H271A, H271A/Q302K/M322I, H271A/L316D/M322I, Q302K/M322I/W368A и W368A, где
аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности
пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 372.

[0012] Настоящее изобретение также относится к рекомбинантной альфа-
галактозидазе А, где указанная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную
последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%,
92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ
ID NO: 374 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-
галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или
более положениях, выбранных из 10/36/92/166/247/261/316/392, 10/39,
10/39/44/47/92/206/217, 10/39/44/47/316, 10/39/44/47/337, 10/39/44/92/166/261/316/322,
10/39/44/92/166/302/322, 10/39/44/92/166/392, 10/39/44/92/217/302/322, 10/39/44/92/302/322,
10/39/44/166/261/271/316/322, 10/39/44/392, 10/39/47/92/337, 10/39/92/131/166/271/316/322,
10/39/92/166/217/247/271, 10/39/92/217/316, 10/44/47/166/261/271,
10/44/47/166/271/322/368, 10/44/47/217/271/316/322, 10/44/92,
10/44/92/217/247/271/302/316/392, 10/44/166/302, 10/44/206/316/322,
10/47/92/166/271/316/337, 10/47/92/271/302, 47/10/92/316/322/392, 10/47/166/271,
10/47/166/316, 10/92/166, 10/92/166/217/247/261/271, 10/92/166/261/271/392,
10/92/166/261/316/322/337, 10/92/166/337/368, 10/92/302/337, 10/92/316/322, 10/206,
10/206/247/261, 10/217/322, 10/261, 10/261/337/392, 10/316/392, 10/368,

39/44/47/92/166/206/392, 39/44/47/92/206/247/261, 39/44/47/92/206/392, 39/44/47/206/337/368/392, 39/44/92/166/24 7/261/302/337, 39 /44/166/271, 39/44/166/271/337/368/392, 39/47/92/316/322, 39/47/92/392, 39/47/166/217/261/392, 39/47/217/247/368, 39/47/247, 39/92/166/217/392, 39/92/261/302, 39/166/217/261/316/368, 39/322, 39/392, 44/47, 44/47/92/217/271, 44/47/92/217/316/322/392, 44/47/92/392, 44/47/166, 44/47 /166/271, 44/47/247/271/392, 44/316/322/392, 44/337, 47/166/206/217/247/337, 47/166/217/271/337, 47/206, 47/217/247/261, 47/271, 52/217/302/316, 92/166/206/271/316, 92/166/217/261/271/392, 92/166/217/316/337/392, 92/166/247, 92/166/316, 92/206/322, 92/217, 92/217/271/337, 92/261/271, 92/271, 166/217 /316/322/337, 166/247/271/316, 166/316/322 /337, 206/217, 217/392, 247/316, 316/322/368 и 316/337/392, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 374. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 374 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 10T/36M/92Y/166S/247N/261A/316L/392M, 10T/39M, 10T/39M/44L/47S/92Y/206K/217F, 10T/39M/44L/47S/316L, 10T/39M/44L/47S/337A, 10T/39M/44L/92Y/166S/261A/316L/322M, 10T/39M/44L/92Y/166S/302Q/322M, 10T/39M/44L/92Y/166S/392M, 10T/39M/44L/92Y/217F/302Q/322M, 10T/39M/44L/92Y/302Q/322M, 10T/39M/44L/166S/261A/271H/316L/322M, 10T/39M/44L/392M, 10T/39M/47S/92Y/337A, 10T/39M/92Y/131G/166S/271H/316L/322M, 10T/39M/92Y/166S/217F/247N/271H, 10T/39M/92Y/217F/316L, 10T/44L/47S/166S/261A/271H, 10T/44L/47S/166S/271H/322M/368W, 10T/44L/47S/217F/271H/316L/322M, 10T/44L/92Y, 10T/44L/92Y/217F/247N/271H/302Q/316L/392M, 10T/44L/166S/302Q, 10T/44L/206K/316L/322M, 10T/47S/92Y/166S/271H/316L/337A, 10T/47S/92Y/271H/302Q, 10T/47S/92Y/316L/322M/392M, 10T/47S/166S/271H, 10T/47S/166S/316L, 10T/92Y/166S, 10T/92Y/166S/217F/247N/261A/271H, 10T/92Y/166S/261A/271H/392M, 10T/92Y/166S/261A/316L/322M/337A, 10T/92Y/166S/337A/368W, 10T/92Y/302Q/337A, 10T/92Y/316L/322M, 10T/206K, 10T/206K/247N/261A, 10T/217F/322M, 10T/261A, 10T/261A/337A/392M, 10T/316L/392M, 10T/368W, 39M/44L/47S/92Y/166S/206K/392M, 39M/44L/47S/92Y/206K/247N/261A, 39M/44L/47S/92Y/206K/392M, 39M/44L/47S/206K/337A/368W/392M, 39M/44L/92Y/166S/247N/261A/302Q/337A, 39M/44L/166S/271H, 39M/44L/166S/271H/337A/368W/392M, 39M/47S/92Y/316L/322M, 39M/47S/92Y/392M, 39M/47S/166S/217F/261A/392M, 39M/47S/217F/247N/368W, 39M/47S/247N, 39M/92Y/166S/217F/392M, 39M/92Y/261A/302Q, 39M/166S/217F/261A/316L/368W, 39M/322M, 39M/392M, 44L/47S, 44L/47S/92Y/217F/271H, 44L/47S/92Y/217F/316L/322M/392M, 44L/47S/92Y/392M,

44L/47S/166S, 44L/47S/166S/271H, 44L/47S/247N/271H/392M, 44L/316L/322M/392M, 44L/337A, 47S/166S/206K/217F/247N/337A, 47S/166S/217F/271H/337A, 47S/206K, 47S/217F/247N/261A, 47S/271H, 52N/217F/302Q/316L, 92Y/166S/206K/271H/316L, 92Y/166S/217F/261A/271H/392M, 92Y/166S/217F/316L/337A/392M, 92Y/166S/247N, 92Y/166S/316L, 92Y/206K/322M, 92Y/217F, 92Y/217F/271H/337A, 92Y/261A/271H, 92Y/271H, 166S/217F/316L/322M/337A, 166S/247N/271H/316L, 166S/316L/322M/337A, 206K/217F, 217F/392M, 247N/316L, 316L/322M/368W и 316L/337A/392M, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 374. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 374 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из P10T/K36M/H92Y/P166S/D247N/G261A/D316L/T392M, P10T/E39M, P10T/E39M/R44L/T47S/H92Y/A206K/R217F, P10T/E39M/R44L/T47S/D316L, P10T/E39M/R44L/T47S/P337A, P10T/E39M/R44L/H92Y/P166S/G261A/D316L/I322M, P10T/E39M/R44L/H92Y/P166S/K302Q/I322M, P10T/E39M/R44L/H92Y/P166S/T392M, P10T/E39M/R44L/H92Y/R217F/K302Q/I322M, P10T/E39M/R44L/H92Y/K302Q/I322M, P10T/E39M/R44L/P166S/G261A/A271H/D316L/I322M, P10T/E39M/R44L/T392M, P10T/E39M/T47S/H92Y/P337A, P10T/E39M/H92Y/W131G/P166S/A271H/D316L/I322M, P10T/E39M/H92Y/P166S/R217F/D247N/A271H, P10T/E39M/H92Y/R217F/D316L, P10T/R44L/T47S/P166S/G261A/A271H, P10T/R44L/T47S/P166S/A271H/I322M/A368W, P10T/R44L/T47S/R217F/A271H/D316L/I322M, P10T/R44L/H92Y, P10T/R44L/H92Y/R217F/D247N/A271H/K302Q/D316L/T392M, P10T/R44L/P166S/K302Q, P10T/R44L/A206K/D316L/I322M, P10T/T47S/H92Y/P166S/A271H/D316L/P337A, P10T/T47S/H92Y/A271H/K302Q, P10T/T47S/H92Y/D316L/I322M/T392M, P10T/T47S/P166S/A271H, P10T/T47S/P166S/D316L, P10T/H92Y/P166S, P10T/H92Y/P166S/R217F/D247N/G261A/A271H, P10T/H92Y/P166S/G261A/A271H/T392M, P10T/H92Y/P166S/G261A/D316L/I322M/P337A, P10T/H92Y/P166S/P337A/A368W, P10T/H92Y/K302Q/P337A, P10T/H92Y/D316L/I322M, P10T/A206K, P10T/A206K/D247N/G261A, P10T/R217F/I322M, P10T/G261A, P10T/G261A/P337A/T392M, P10T/D316L/T392M, P10T/A368W, E39M/R44L/T47S/H92Y/P166S/A206K/T392M, E39M/R44L/T47S/H92Y/A206K/D247N/G261A, E39M/R44L/T47S/H92Y/A206K/T392M, E39M/R44L/T47S/A206K/P337A/A368W/T392M, E39M/R44L/H92Y/P166S/D247N/G261A/K302Q/P337A, E39M/R44L/P166S/A271H, E39M/R44L/P166S/A271H/P337A/A368W/T392M, E39M/T47S/H92Y/D316L/I322M, E39M/T47S/H92Y/T392M, E39M/T47S/P166S/R217F/G261A/T392M, E39M/T47S/R217F/D247N/A368W, E39M/T47S/D247N, E39M/H92Y/P166S/R217F/T392M, E39M/H92Y/G261A/K302Q, E39M/P166S/R217F/G261A/D316L/A368W, E39M/I322M,

E39M/T392M, R44L/T47S, R44L/T47S/H92Y/R217F/A271H,
 R44L/T47S/H92Y/R217F/D316L/I322M/T392M, R44L/T47S/H92Y/T392M,
 R44L/T47S/P166S, R44L/T47S/P166S/A271H, R44L/T47S/D247N/A271H/T392M,
 R44L/D316L/I322M/T392M, R44L/P337A, T47S/P166S/A206K/R217F/D247N/P337A,
 T47S/P166S/R217F/A271H/P337A, T47S/A206K, T47S/R217F/D247N/G261A, T47S/A271H,
 D52N/R217F/K302Q/D316L, H92Y/P166S/A206K/A271H/D316L,
 H92Y/P166S/R217F/G261A/A271H/T392M, H92Y/P166S/R217F/D316L/P337A/T392M,
 H92Y/P166S/D247N, H92Y/P166S/D316L, H92Y/A206K/I322M, H92Y/R217F,
 H92Y/R217F/A271H/P337A, H92Y/G261A/A271H, H92Y/A271H,
 P166S/R217F/D316L/I322M/P337A, P166S/D247N/A271H/D316L,
 P166S/D316L/I322M/P337A, A206K/R217F, R217F/T392M, D247N/D316L,
 D316L/I322M/A368W и D316L/P337A/T392M, где положения аминокислот в указанной
 полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 374.

[0013] Настоящее изобретение также относится к рекомбинантной альфа-галактозидазе А, где указанная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 704 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 2, 4, 5, 24/59, 24/143/144, 24/143/202/333, 24/143/202/352/390/391, 24/143/333/352/387/390/391, 24/143/390/391, 24/202, 24/202/271, 24/202/333/352, 24/271/352, 24/352/387/390/391, 24/387/391, 31, 40, 59, 59/143, 59/143/202, 59/143/202/271/333, 59/143/271, 59/143/333, 59/202, 59/202/333, 59/271/387/390, 73, 76, 80, 83, 84, 91/215/361, 122, 123, 143, 143/202, 143/271, 143/271/352/390, 143/333, 143/333/387/390, 143/387/391, 147, 155, 164, 165, 179, 186, 202, 202/333, 210, 215/218, 218, 218/361, 218/361/398, 218/398, 246, 254/398, 271, 271/333, 271/333/390/391, 271/333/391, 271/352/391, 273, 275, 277, 278, 280, 281, 283, 284, 287, 300, 303, 304, 325, 331, 332, 333/352, 333/390/391, 333/391, 334, 335, 336, 338, 339, 340, 341, 343, 359, 360, 361, 362, 367, 369, 371, 373, 375, 377, 382, 382/398, 385, 387/391, 390 и 398, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 704. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 704 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 2S, 4L, 5M, 5V, 24S/59A, 24S/143S/144N, 24S/143S/202N/333N, 24S/143S/202N/352N/390N/391N, 24S/143S/333N/352N/387N/390T/391N, 24S/143S/390T/391N, 24S/202N, 24S/202N/271N, 24S/202N/333N/352N, 24S/271N/352N, 24S/352N/387N/390N/391N, 24S/387N/391N, 31F, 31H, 31L, 31T, 31W, 40Q, 59A, 59A/143S,

59A/143S/271N, 59A/202N, 59T, 59T/143S/202N, 59T/143S/333N, 59T/202N/333N, 59V/143S/202N/271N/333N, 59V/271N/387N/390T, 73A, 76A, 76F, 76M, 76S, 80T, 83R, 83S, 84G, 84K, 84R, 91S/215S/361T, 122E, 122N, 122S, 123Q, 123R, 123S, 123T, 143S, 143S/202N, 143S/271N, 143S/271N/352N/390N, 143S/333N, 143S/333N/387N/390T, 143S/387N/391N, 147L, 147S, 155A, 155D, 155F, 155L, 155R, 155T, 164E, 165I, 179H, 179L, 179R, 179W, 186E, 186F, 186M, 186P, 186R, 186S, 186Y, 202N, 202N/333N, 210I, 215S/218Y, 218Y, 218Y/361T, 218Y/361T/398F, 218Y/398F, 246Y, 254T/398F, 271N, 271N/333N, 271N/333N/390N/391N, 271N/333N/391N, 271N/352N/391N, 273L, 275A, 275G, 277Q, 277V, 278N, 278R, 278S, 280G, 281I, 281M, 283L, 283P, 283T, 283V, 284A, 284E, 284G, 284L, 284M, 284R, 284S, 287R, 300F, 303A, 303C, 303W, 304T, 304V, 304W, 325A, 331M, 332G, 332H, 333N/352N, 333N/390N/391N, 333N/390S/391N, 333N/391N, 334C, 334V, 335A, 335L, 336F, 336G, 336S, 336T, 338L, 339G, 339N, 339Q, 339V, 340H, 340I, 340K, 340M, 340P, 340W, 341F, 341M, 343L, 343R, 343S, 343W, 359F, 359L, 359R, 360H, 360V, 361T, 361V, 362H, 367A, 367D, 367L, 367M, 369D, 371G, 373L, 373S, 375L, 375Q, 377Q, 382I, 382I/398F, 385R, 387N/391N, 390S и 398F, где положения аминокислот в указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 704. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 704 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из D2S, G4L, L5M, L5V, D24S/C59A, D24S/C143S/D144N, D24S/C143S/D202N/G333N, D24S/C143S/D202N/F352N/M390N/Q391N, D24S/C143S/G333N/F352N/E387N/M390T/Q391N, D24S/C143S/M390T/Q391N, D24S/D202N, D24S/D202N/A271N, D24S/D202N/G333N/F352N, D24S/A271N/F352N, D24S/F352N/E387N/M390N/Q391N, D24S/E387N/Q391N, S31F, S31H, S31L, S31T, S31W, E40Q, C59A, C59A/C143S, C59A/C143S/A271N, C59A/D202N, C59T, C59T/C143S/D202N, C59T/C143S/G333N, C59T/D202N/G333N, C59V/C143S/D202N/A271N/G333N, C59V/A271N/E387N/M390T, G73A, Q76A, Q76F, Q76M, Q76S, Q80T, P83R, P83S, H84G, H84K, H84R, N91S/T215S/R361T, D122E, D122N, D122S, I123Q, I123R, I123S, I123T, C143S, C143S/D202N, C143S/A271N, C143S/A271N/F352N/M390N, C143S/G333N, C143S/G333N/E387N/M390T, C143S/E387N/Q391N, E147L, E147S, H155A, H155D, H155F, H155L, H155R, H155T, G164E, R165I, P179H, P179L, P179R, P179W, T186E, T186F, T186M, T186P, T186R, T186S, T186Y, D202N, D202N/G333N, S210I, T215S/N218Y, N218Y, N218Y/R361T, N218Y/R361T/L398F, N218Y/L398F, W246Y, A254T/L398F, A271N, A271N/G333N, A271N/G333N/M390N/Q391N, A271N/G333N/Q391N, A271N/F352N/Q391N, S273L, Q275A, Q275G, K277Q, K277V, A278N, A278R, A278S, L280G, Q281I, Q281M, K283L, K283P, K283T, K283V, D284A, D284E, D284G, D284L, D284M, D284R, D284S, A287R, L300F, G303A, G303C, G303W, D304T, D304V, D304W,

R325A, P331M, R332G, R332H, G333N/F352N, G333N/M390N/Q391N, G333N/M390S/Q391N, G333N/Q391N, Y334C, Y334V, T335A, T335L, I336F, I336G, I336S, I336T, V338L, A339G, A339N, A339Q, A339V, S340H, S340I, S340K, S340M, S340P, S340W, L341F, L341M, K343L, K343R, K343S, K343W, V359F, V359L, V359R, K360H, K360V, R361T, R361V, K362H, E367A, E367D, E367L, E367M, T369D, R371G, R373L, R373S, H375L, H375Q, N377Q, V382I, V382I/L398F, Q385R, E387N/Q391N, M390S и L398F, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 704.

[0014] Настоящее изобретение также относится к рекомбинантной альфа-галактозидазе А, где указанная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 374 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 10, 39, 44, 47, 92, 166, 206, 217, 247, 261, 271, 302, 316, 322, 337, 368 и 392, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 374. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 374 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 10A, 10C, 10D, 10E, 10F, 10G, 10H, 10I, 10K, 10L, 10M, 10N, 10Q, 10R, 10S, 10T, 10V, 10W, 10Y, 39A, 39C, 39D, 39F, 39G, 39H, 39I, 39K, 39L, 39M, 39N, 39P, 39Q, 39R, 39S, 39T, 39V, 39W, 39Y, 44A, 44C, 44D, 44E, 44F, 44G, 44H, 44I, 44K, 44L, 44N, 44P, 44Q, 44S, 44T, 44V, 44W, 44Y, 47A, 47C, 47D, 47E, 47F, 47G, 47H, 47I, 47K, 47L, 47M, 47N, 47P, 47Q, 47R, 47S, 47V, 47W, 47Y, 92A, 92C, 92D, 92E, 92F, 92G, 92I, 92K, 92L, 92M, 92N, 92P, 92Q, 92R, 92S, 92T, 92V, 92W, 92Y, 166A, 166C, 166D, 166E, 166F, 166G, 166H, 166I, 166K, 166L, 166M, 166N, 166Q, 166R, 166S, 166T, 166V, 166W, 166Y, 206C, 206D, 206E, 206F, 206G, 206H, 206I, 206K, 206L, 206M, 206N, 206P, 206Q, 206R, 206S, 206T, 206V, 206W, 206Y, 217A, 217C, 217D, 217E, 217F, 217G, 217H, 217I, 217K, 217L, 217M, 217N, 217P, 217Q, 217S, 217T, 217V, 217W, 217Y, 247A, 247C, 247E, 247F, 247G, 247H, 247I, 247K, 247L, 247M, 247N, 247P, 247Q, 247R, 247S, 247T, 247V, 247W, 247Y, 261A, 261C, 261D, 261E, 261F, 261H, 261I, 261K, 261L, 261M, 261N, 261P, 261Q, 261R, 261S, 261T, 261V, 261W, 261Y, 271C, 271D, 271E, 271F, 271G, 271H, 271I, 271K, 271L, 271M, 271N, 271P, 271Q, 271R, 271S, 271T, 271V, 271W, 271Y, 302A, 302C, 302D, 302E, 302F, 302G, 302H, 302I, 302L, 302M, 302N, 302P, 302Q, 302R, 302S, 302T, 302V, 302W, 302Y, 316A, 316C, 316E, 316F, 316G, 316H, 316I, 316K, 316L, 316M, 316N, 316P, 316Q, 316R, 316S, 316T, 316V, 316W, 316Y, 322A, 322C, 322D, 322E, 322F, 322G, 322H, 322K, 322L, 322M, 322N, 322P, 322Q, 322R, 322S, 322T,

322V, 322W, 322Y, 337A, 337C, 337D, 337E, 337F, 337G, 337H, 337I, 337K, 337L, 337M, 337N, 337Q, 337R, 337S, 337T, 337V, 337W, 337Y, 368C, 368D, 368E, 368F, 368G, 368H, 368I, 368K, 368L, 368M, 368N, 368P, 368Q, 368R, 368S, 368T, 368V, 368W, 368Y, 392A, 392C, 392D, 392E, 392F, 392G, 392H, 392I, 392K, 392L, 392M, 392N, 392P, 392Q, 392R, 392S, 392V, 392W и 392Y, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 374. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 374 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из P10A, P10C, P10D, P10E, P10F, P10G, P10H, P10I, P10K, P10L, P10M, P10N, P10Q, P10R, P10S, P10T, P10V, P10W, P10Y, E39A, E39C, E39D, E39F, E39G, E39H, E39I, E39K, E39L, E39M, E39N, E39P, E39Q, E39R, E39S, E39T, E39V, E39W, E39Y, R44A, R44C, R44D, R44E, R44F, R44G, R44H, R44I, R44K, R44L, R44N, R44P, R44Q, R44S, R44T, R44V, R44W, R44Y, T47A, T47C, T47D, T47E, T47F, T47G, T47H, T47I, T47K, T47L, T47M, T47N, T47P, T47Q, T47R, T47S, T47V, T47W, T47Y, H92A, H92C, H92D, H92E, H92F, H92G, H92I, H92K, H92L, H92M, H92N, H92P, H92Q, H92R, H92S, H92T, H92V, H92W, H92Y, P166A, P166C, P166D, P166E, P166F, P166G, P166H, P166I, P166K, P166L, P166M, P166N, P166Q, P166R, P166S, P166T, P166V, P166W, P166Y, A206C, A206D, A206E, A206F, A206G, A206H, A206I, A206K, A206L, A206M, A206N, A206P, A206Q, A206R, A206S, A206T, A206V, A206W, A206Y, R217A, R217C, R217D, R217E, R217F, R217G, R217H, R217I, R217K, R217L, R217M, R217N, R217P, R217Q, R217S, R217T, R217V, R217W, R217Y, D247A, D247C, D247E, D247F, D247G, D247H, D247I, D247K, D247L, D247M, D247N, D247P, D247Q, D247R, D247S, D247T, D247V, D247W, D247Y, G261A, G261C, G261D, G261E, G261F, G261H, G261I, G261K, G261L, G261M, G261N, G261P, G261Q, G261R, G261S, G261T, G261V, G261W, G261Y, A271C, A271D, A271E, A271F, A271G, A271H, A271I, A271K, A271L, A271M, A271N, A271P, A271Q, A271R, A271S, A271T, A271V, A271W, A271Y, K302A, K302C, K302D, K302E, K302F, K302G, K302H, K302I, K302L, K302M, K302N, K302P, K302Q, K302R, K302S, K302T, K302V, K302W, K302Y, D316A, D316C, D316E, D316F, D316G, D316H, D316I, D316K, D316L, D316M, D316N, D316P, D316Q, D316R, D316S, D316T, D316V, D316W, D316Y, I322A, I322C, I322D, I322E, I322F, I322G, I322H, I322K, I322L, I322M, I322N, I322P, I322Q, I322R, I322S, I322T, I322V, I322W, I322Y, P337A, P337C, P337D, P337E, P337F, P337G, P337H, P337I, P337K, P337L, P337M, P337N, P337Q, P337R, P337S, P337T, P337V, P337W, P337Y, A368C, A368D, A368E, A368F, A368G, A368H, A368I, A368K, A368L, A368M, A368N, A368P, A368Q, A368R, A368S, A368T, A368V, A368W, A368Y, T392A, T392C, T392D, T392E, T392F, T392G, T392H, T392I, T392K, T392L, T392M, T392N, T392P, T392Q, T392R, T392S, T392V, T392W и T392Y, где положения аминокислот в указанной полипептидной последовательности пронумерованы

со ссылкой на SEQ ID NO: 374.

[0015] Настоящее изобретение также относится к рекомбинантной альфа-галактозидазе А, где указанная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 1022 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 10, 10/392, 31, 31/39/44/166/302, 31/47, 31/283/284, 39, 39/44, 39/44/47, 39/44 /47/261/283/284, 39/44/283, 39/44/339, 39/47/261, 39/92, 39/206, 39/284, 44, 44/284/302, 84, 84/92, 84/284/302/392, 84/316, 84/368/392, 92, 92/206/217, 92/206/275, 92/206/284, 92/206/302/368, 92/271, 92/271/277, 92/275/284, 92/283, 92/283/392, 92/284, 92/302, 92/316, 92/368, 155, 155/217, 155/368, 166, 166/283/284, 166/302, 206, 206/217, 206/334, 261, 261/283, 271, 271/368, 275, 283, 283/284, 283/392, 284, 302, 316, 334, 339, 368, 368/392 и 392, где положения аминокислот указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 1022. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 1022 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из P10G, P10G/T392D, S31T, S31T/E39V/R44V/P166D/K302Y, S31T/T47R, S31T/K283L/D284A, E39L, E39L/H92V, E39L/A206E, E39L/D284S, E39V/R44V, E39V/R44V/T47R, E39V/R44V/T47R/G261S/K283L/D284A, E39V/R44V/K283T, E39V/R44V/A339N, E39V/T47R/G261S, R44V, R44V/D284E/K302Y, H84K, H84K/H92V, H84K/D284S/K302L/T392A, H84K/D316H, H84K/A368E/T392A, H92Q, H92T, H92T/A206E/R217N, H92T/A206E/K302T/A368E, H92T/A271K, H92T/A271K/K277R, H92T/K283P, H92T/K283V/T392W, H92T/D284M, H92T/K302L, H92T/A368E, H92V, H92V/A206E/D284S, H92V/A206Y/Q275A, H92V/Q275A/D284S, H92V/D284S, H92V/K302L, H92V/D316H, H155F, H155F/R217I, H155F/A368E, P166D, P166D/K283L/D284A, P166D/K302Y, A206E, A206E/R217N, A206I, A206Q, A206T/Y334C, A206Y, G261S, G261S/K283L, A271K, A271K/A368E, Q275A, K283L, K283P/T392W, K283T, K283T/D284E, D284E, D284M, D284S, K302L, K302Y, D316H, Y334C, A339N, A368E, A368E/T392W, T392A, T392D и T392W, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 1022. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 1022 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей

мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 10G, 10G/392D, 31T, 31T/39V/44V/166D/302Y, 31T/47R, 31T/283L/284A, 39L, 39L/92V, 39L/206E, 39L/284S, 39V/44V, 39V/44V/47R, 39V/44V/47R/261S/283L/284A, 39V/44V/283T, 39V/44V/339N, 39V/47R/261S, 44V, 44V/284E/302Y, 84K, 84K/92V, 84K/284S/302L/392A, 84K/316H, 84K/368E/392A, 92Q, 92T, 92T/206E/217N, 92T/206E/302T/368E, 92T/271K, 92T/271K/277R, 92T/283P, 92T/283V/392W, 92T/284M, 92T/302L, 92T/368E, 92V, 92V/206E/284S, 92V/206Y/275A, 92V/275A/284S, 92V/284S, 92V/302L, 92V/316H, 155F, 155F/217I, 155F/368E, 166D, 166D/283L/284A, 166D/302Y, 206E, 206E/217N, 206I, 206Q, 206T/334C, 206Y, 261S, 261S/283L, 271K, 271K/368E, 275A, 283L, 283P/392W, 283T, 283T/284E, 284E, 284M, 284S, 302L, 302Y, 316H, 334C, 339N, 368E, 368E/392W, 392A, 392D и 392W, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 1022.

[0016] В некоторых вариантах осуществления изобретения, альфа-галактозидаза А согласно изобретению содержит по меньшей мере одну мутацию по меньшей мере в одном положении, как показано в таблицах 2-1, 5-1, 6-1, 7-1, 8-1, 9-1, 11-1, 12-1 и/или 13-1, где положения пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 2 или на другую эталонную последовательность, как указано в таблицах. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А происходит от альфа-галактозидазы А человека. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 8, 58, 158, 372, 374, 704 и/или 1022.

[0017] В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А является более термостабильной, чем альфа-галактозидаза А SEQ ID NO: 2, 8, 58, 158, 372, 374, 704 и/или 1022. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А является более стабильной при pH 7, чем альфа-галактозидаза А SEQ ID NO: 2, 8, 58, 158, 372, 374, 704 и/или 1022. В еще некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А является более стабильной при pH 4, чем альфа-галактозидаза А SEQ ID NO: 2, 8, 58, 158, 372, 374, 704 и/или 1022. В еще некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А является более стабильной при pH 7 и более стабильной при pH 4, чем альфа-галактозидаза А SEQ ID NO: 2, 8, 58, 158, 372, 374, 704 и/или 1022. В дополнительных вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А является более устойчивой к воздействию сыворотки, чем альфа-галактозидаза А SEQ ID NO: 2, 8, 58, 158, 372, 374, 704 и/или 1022. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А является более стабильной в лизосомах, чем альфа-галактозидаза А SEQ ID NO: 2, 8, 58, 158, 372, 374, 704 и/или 1022. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А демонстрирует улучшенное поглощение клетками по сравнению с альфа-галактозидазой А SEQ ID NO: 2,

8, 58, 158, 372, 374, 704 и/или 1022. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А демонстрирует большее истощение глоботриаозилцерамида из клеток по сравнению с альфа-галактозидазой А SEQ ID NO: 2, 8, 58, 158, 372, 374, 704 и/или 1022. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А демонстрирует повышенное поглощение клетками по сравнению с SEQ ID NO: 2, 8, 58, 158, 372, 374, 704 и/или 1022. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А является менее иммуногенной, чем альфа-галактозидаза А SEQ ID NO: 2, 8, 58, 158, 372, 374, 704 и/или 1022. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А обладает по меньшей мере одним улучшенным свойством, выбранным из: i) повышенной каталитической активности; ii) повышенной толерантности к pH 7; iii) повышенной толерантности к pH 4; iv) повышенной толерантности к сыворотке; v) улучшенного поглощения клетками; vi) пониженной иммуногенности; или vii) повышенного истощения глоботриаозилцерамида из клеток; или комбинации любых из i), ii), iii), iv), v), vi) или vii), по сравнению с эталонной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эталонная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 2, 8, 58, 158, 372, 374, 704 и/или 1022. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А является очищенной.

[0018] Настоящее изобретение также относится к рекомбинантным полинуклеотидным последовательностям, кодирующим по меньшей мере одну рекомбинантную альфа-галактозидазу А, представленную в настоящей заявке (например, в Таблицах 2-1, 5-1, 6-1, 7-1, 8-1, 9-1, 11-1, 12-1 и/или 13-1). В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотидная последовательность выбрана из ДНК, РНК и мРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная полинуклеотидная последовательность оптимизирована по кодонам.

[0019] Настоящее изобретение также относится к экспрессионным векторам, содержащим рекомбинантную полинуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере одну рекомбинантную альфа-галактозидазу А, представленную в настоящей заявке (например, в Таблицах 2-1, 5-1, 6-1, 7-1, 8-1, 9-1), 11-1, 12-1 и/или 13-1). В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная полинуклеотидная последовательность функционально связана с регуляторной последовательностью. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, регуляторная последовательность представляет собой промотор. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, промотор представляет собой гетерологичный промотор. В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессионный вектор дополнительно содержит сигнальную последовательность, представленную в настоящей заявке.

[0020] Настоящее изобретение также относится к клеткам-хозяевам, содержащим

по меньшей мере один экспрессионный вектор, представленный в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка-хозяин содержит экспрессионный вектор, содержащий рекомбинантную полинуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере одну рекомбинантную альфа-галактозидазу А, представленную в настоящей заявке (например, в Таблицах 2-1, 5-1, 6-1, 7-1, 8-1), 9-1, 11-1, 12-1 и/или 13-1). В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка-хозяин выбрана из эукариот и прокариот. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка-хозяин является эукариотической. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего.

[0021] Настоящее изобретение также относится к способам получения варианта альфа-галактозидазы А, включающим культивирование клетки-хозяина согласно изобретению в условиях, при которых продуцируется альфа-галактозидаза А, кодируемая рекомбинантным полинуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способы дополнительно включают стадию выделения альфа-галактозидазы А. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, способы дополнительно включают стадию очистки альфа-галактозидазы А. Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим по меньшей мере одну рекомбинантную альфа-галактозидазу А, как указано в настоящей заявке (например, в Таблицах 2-1, 5-1, 6-1, 7-1, 8-1, 9-1, 11-1, 12-1 и/или 13-1). В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям. В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим по меньшей мере один рекомбинантный полинуклеотид, представленный в настоящей заявке. В некоторых своих дополнительных вариантах, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям для лечения болезни Фабри, включающим ферментную композицию, представленную в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фармацевтические композиции дополнительно содержат фармацевтически приемлемый носитель и/или наполнитель. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, фармацевтическая композиция является подходящей для парентеральной инъекции или инфузии человеку.

[0022] Настоящее изобретение также относится к способам лечения и/или профилактики симптомов болезни Фабри у индивидуума, включающим диагностику у индивидуума болезни Фабри, и получение по меньшей мере одной фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одну рекомбинантную альфа-галактозидазу А, представленную в настоящей заявке (например, в Таблицах 2-1, 5-1, 6-1, 7-1, 8-1, 9-1, 11-1, 12-1 и/или 13-1), и введение этому индивидууму фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления изобретения, симптомы болезни Фабри у индивидуума являются ослабленными. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, индивидуум, которому вводили фармацевтическую композицию согласно изобретению, может соблюдать диету с меньшим ограничением

содержания жира, чем диета, необходимая индивидуумам, имеющим симптомы болезни Фабри. В некоторых вариантах осуществления изобретения, индивидуумом является младенец или ребенок, а в некоторых альтернативных вариантах осуществления изобретения, индивидуумом является взрослый или молодой человек.

[0023] Настоящее изобретение также относится к применению представленных здесь композиций.

Краткое описание чертежей

[0024] На фигуре 1 представлен график, иллюстрирующий относительную активность вариантов GLA после инкубирования в течение 1 часа при температуре 30-50°C.

[0025] На фигуре 2 представлен график, иллюстрирующий относительную активность вариантов GLA после заражения человеческой сывороткой при 37°C в течение 0-24 часов.

[0026] На Фигуре 3 представлен график, иллюстрирующий относительную активность вариантов GLA после заражения лизосомным экстрактом человека при 37°C в течение 0-24 часов.

[0027] На Фигуре 4 представлен график, иллюстрирующий поглощение клетками различных очищенных вариантов GLA, выраженное в виде относительной активности по сравнению с диким типом после 4-часового инкубирования при 37°C с культивируемыми фибробластами пациента с болезнью Фабри.

[0028] На Фигуре 5 представлен график, иллюстрирующий активность вариантов GLA в сердце мышей с болезнью Фабри по сравнению с SEQ ID NO: 2 через 1, 2 и 4 недели после введения.

[0029] На Фигуре 6 представлен график, иллюстрирующий остаточный Gb₃ в сердце мышей с болезнью Фабри, обработанных вариантами GLA через 1 и 2 недели после введения.

[0030] На Фигуре 7 представлен график, иллюстрирующий остаточную активность вариантов GLA после заражения человеческой сывороткой в течение 0-24 часов.

[0031] На Фигуре 8 представлен график, иллюстрирующий поглощение клетками очищенных вариантов GLA в культивируемых фибробластах пациентов с болезнью Фабри после 4-часового инкубирования и 3-дневной промывки при 37°C.

[0032] На Фигуре 9 представлен график, иллюстрирующий активность фермента *in vivo* в сердце мышей с моделью болезни Фабри через 7 дней после последней обработки.

[0033] На Фигуре 10 представлен график, иллюстрирующий активность фермента *in vivo* в почках мышей с моделью болезни Фабри через 7 дней после последней обработки.

[0034] На фигуре 11 представлен график, иллюстрирующий разложение Gb₃ в ткани сердца.

[0035] На Фигуре 12 представлен график, иллюстрирующий разложение Gb₃ в ткани почек.

[0036] На Фигуре 13 представлен график, иллюстрирующий разложение лизо-Gb3 в ткани сердца.

[0037] На Фигуре 14 представлен график, иллюстрирующий разложение лизо-Gb3 в ткани почек.

Описание изобретения

[0038] Настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам альфа-галактозидазы человека и к их композициям. Сконструированные полипептиды альфа-галактозидазы человека были оптимизированы для обеспечения повышенной термостабильности, стабильности в сыворотке, улучшенного поглощения клетками и стабильности как в кислотных (pH <4), так и в основных (pH >7) условиях, сниженной иммуногенности, а также для улучшения выведения глоботриаозилцерамида из клеток. Настоящее изобретение также относится к применению композиций, содержащих сконструированные полипептиды альфа-галактозидазы человека, в терапевтических целях. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированные полипептиды альфа-галактозидазы человека были оптимизированы для обеспечения улучшенного поглощения клетками при сохранении стабильности. Настоящее изобретение также относится к применению композиций, содержащих сконструированные полипептиды альфа-галактозидазы человека, в терапевтических целях.

[0039] В некоторых случаях, заместительная ферментная терапия для лечения болезни Фабри (например, с использованием агалсидазы-бета FABRAZYME®; Genzyme) рассматривается как подходящая для пациентов, включенных в программу исследования. Используемая в настоящее время заместительная ферментная терапия представляют собой терапию, проводимую с использованием рекомбинантно экспрессированных форм человеческой GLA дикого типа. Известно, что внутривенно введенная GLA циркулирует в кровотоке, проникает в клетки посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза, главным образом посредством маннозо-6-фосфатных рецепторов (M6PR), и доставляется к эндосомам/лизосомам органов-мишеней, где происходит очистка от накопленного Gb3. Эти препараты полностью не облегчают симптомы у пациента, поскольку невропатическая боль и транзиторные ишемические атаки продолжают возникать, но с меньшей частотой. Кроме того, поглощение GLA большинством органов-мишеней является недостаточным по сравнению с печенью с высокой васкуляризацией и богатой M6PR, и этот фермент является нестабильным при pH крови и лизосом. Таким образом, проблемы с доступными методами лечения все еще остаются актуальными. Кроме того, у пациентов может развиваться иммунный ответ (вырабатывание антител IgG и IgE, нацеленных на введенное лекарство), и эти пациенты могут страдать тяжелыми аллергическими (анафилактическими) реакциями, тяжелыми инфузионными реакциями и даже со смертельным исходом. Настоящее изобретение относится к получению более стабильных и эффективных ферментов, подходящих для лечения болезни Фабри, но с уменьшенными побочными эффектами и улучшенными результатами по сравнению с

доступными в настоящее время методами лечения. Действительно, настоящее изобретение предназначено для получения рекомбинантных ферментов GLA, обладающих повышенной стабильностью в крови (pH 7,4), где указанный фермент действует при введении в кровоток. Кроме того, фермент обладает повышенной стабильностью при pH лизосомы (pH 4,3), то есть, в месте, где фермент является активным во время терапии. Таким образом, направленная эволюция рекомбинантно экспрессируемой GLA человека в клетках HEK293T человека, оцененная посредством крупномасштабного скрининга различных библиотек вариантов ферментов, была взята за основу для получения новых вариантов GLA с сохраненными свойствами стабильности, улучшенным клиренсом глоботриаозилцерамида и поглощением клетками. В некоторых вариантах осуществления изобретения, варианты GLA обладают пониженной иммуногенностью.

Сокращения и определения:

[0040] Если это не оговорено особо, все используемые здесь технические и научные термины обычно имеют общепринятое значение, понятное специалистам в области, к которой относится настоящее изобретение. Обычно, используемая здесь номенклатура и описанные ниже лабораторные процедуры, относящиеся к области культивирования клеток, молекулярной генетики, микробиологии, биохимии, органической химии, аналитической химии и химии нуклеиновых кислот, хорошо известны специалистам и обычно используются в данной области. Такие методики хорошо известны и описаны в многочисленных публикациях и документах, известных специалистам в данной области. Стандартные методики или их модификации применяются для химического синтеза и химического анализа. Все патенты, патентные заявки, статьи и публикации, упомянутые здесь как выше, так и ниже, в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки.

[0041] Хотя любые подходящие способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным здесь способам и материалам, находят практическое применение в настоящем изобретении, однако, в настоящей заявке описаны лишь некоторые из них. Следует отметить, что настоящее изобретение не ограничивается описанием конкретных методик, протоколов и реагентов, поскольку они могут варьироваться в зависимости от ситуации, в которой они используются специалистами в данной области. Соответственно, термины, определенные непосредственно ниже, более подробно описаны со ссылкой на заявку в целом. Все патенты, патентные заявки, статьи и публикации, упомянутые здесь как выше, так и ниже, в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки.

[0042] Кроме того, используемые здесь артикли «a», «an» и «the», употребляемые с существительными в единственном числе, могут относиться и к существительным во множественном числе, если из контексте явно не следует иное.

[0043] Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Таким образом, каждый числовой диапазон, раскрытый в настоящей заявке, охватывает каждый более узкий числовой диапазон, который подпадает под такой более широкий числовой

диапазон, как если бы все такие более узкие числовые диапазоны были здесь указаны конкретно. Также предполагается, что каждое максимальное (или минимальное) числовое ограничение, раскрытое в настоящей заявке, включает каждое более низкое (или более высокое) числовое ограничение, как если бы такое более низкое (или более высокое) числовое ограничение было бы непосредственно указано в настоящей заявке.

[0044] Термин «приблизительно» означает допустимую ошибку для конкретного значения. В некоторых случаях, «приблизительно» означает в пределах 0,05%, 0,5%, 1,0% или 2,0% от заданного диапазона значений. В некоторых случаях, «приблизительно» означает в пределах 1, 2, 3 или 4 стандартных отклонений от заданного значения.

[0045] Кроме того, приведенные здесь заголовки не являются ограничениями различных аспектов или вариантов осуществления изобретения, которые могут быть указаны со ссылкой на заявку в целом. Соответственно, термины, определенные непосредственно ниже, более полно определены применительно к заявке в целом. Тем не менее, для облегчения понимания изобретения, ниже определен ряд терминов.

[0046] Если это не оговорено особо, то нуклеиновые кислоты записываются слева направо в ориентации от 5' до 3'; а аминокислотные последовательности записываются слева направо в ориентации от амино- до карбокси-конца, соответственно.

[0047] Используемый здесь термин «содержащий» и родственные ему термины используются в их инклюзивном смысле (то есть, эквивалентны термину «включая» и соответствующим родственным ему терминам).

[0048] Используемый здесь номер «ЕС» относится к номенклатуре ферментов, утвержденной Комитетом по номенклатуре Международного сообщества специалистов в области биохимии и молекулярной биологии (NC-IUBMB). Биохимическая классификация IUBMB представляет собой числовую систему классификации ферментов, основанную на катализируемых ими химических реакциях.

[0049] Используемый здесь термин «ATCC» означает Американскую коллекцию типовых культур, и такая коллекция биодепозитариев включает гены и штаммы.

[0050] Используемый здесь термин «NCBI» означает Национальный Центр биологической информации и представленные в нем базы данных последовательностей.

[0051] Используемые здесь термины «белок», «полипептид» и «пептид» являются синонимами и означают полимер, состоящий по меньшей мере из двух аминокислот, ковалентно связанных амидной связью, независимо от длины или посттрансляционной модификации (например, гликозилирования или фосфорилирования).

[0052] «Аминокислоты» указаны здесь либо их общеизвестными трехбуквенными обозначениями, либо однобуквенными обозначениями, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB. Аналогичным образом, нуклеотиды также могут обозначаться их общепринятыми однобуквенными кодами. Сокращения, используемые для генетически кодируемых аминокислот, являются общепринятыми и представляют собой следующие сокращения: аланин (Ala или A), аргинин (Arg или R), аспарагин (Asn или N), аспартат (Asp или D), цистеин (Cys или C), глутамат (Glu или E),

глутамин (Gln или Q), гистидин (His или H), изолейцин (Ile или I), лейцин (Leu или L), лизин (Lys или K), метионин (Met или M), фенилаланин (Phe или F), пролин (Pro или P), серин (Ser или S), треонин (Thr или T), триптофан (Trp или W), тирозин (Tyr или Y) и валин (Val или V). При использовании трехбуквенных аббревиатур, если только им не предшествует буква «L» или «D» или это не следует из контекста, в котором используется такая аббревиатура, то аминокислота может находиться либо в L-, либо в D-конфигурации относительно α -углерода (C_α). Так, например, если «Ala» обозначает аланин без указания конфигурации относительно α -углерода, то «D-Ala» и «L-Ala» означают D-аланин и L-аланин, соответственно. Если полипептидные последовательности представлены в виде цепочки однобуквенных или трехбуквенных сокращений (или их смесей), то последовательности представлены в направлении от amino-конца (N) до карбокси-конца (C) в соответствии с общепринятым соглашением.

[0053] Сокращения, используемые для генетически кодирующих нуклеозидов, являются общепринятыми и представляют собой следующие сокращения: аденозин (A); гуанозин (G); цитидин (C); тимидин (T); и уридин (U). Если это не оговорено особо, то сокращенные нуклеозиды могут быть либо рибонуклеозидами, либо 2'-дезоксирибонуклеозидами. Нуклеозиды могут быть указаны либо как рибонуклеозиды, либо как 2'-дезоксирибонуклеозиды по отдельности или в совокупности. Если последовательности нуклеиновых кислот представлены в виде цепочки однобуквенных сокращений, то последовательности представлены в направлении от 5' до 3' в соответствии с общепринятым соглашением, а фосфаты не указаны.

[0054] Термины «сконструированный», «рекомбинантный», «не встречающийся в природе» и «вариант», если они употребляются по отношению к клетке, полинуклеотиду или полипептиду, относятся к веществу или к материалу, соответствующему природной или нативной форме материалов, которые были модифицированы таким образом, чтобы они отличались от материалов, существующих в природе или идентичных им, но были продуцированы или получены из синтетических материалов и/или путем манипуляции с применением рекомбинантных технологий.

[0055] Используемый здесь термин «UTR» относится к нетранслируемым областям полинуклеотида мРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, «5'-нетранслируемая область» или «5'UTR» упоминается здесь как «лидерная последовательность» или «лидерная РНК». Эта область мРНК находится непосредственно выше иницирующего кодона. В некоторых вариантах осуществления изобретения, «3'-нетранслируемая область» или «3'UTR» представляет собой область мРНК, расположенную непосредственно ниже стоп-кодона. У различных организмов (например, у прокариот, эукариот и вирусов), обе эти области играют важную роль в регуляции трансляции и во внутриклеточном транспорте.

[0056] Используемые здесь термины «дикий тип», «WT» и «встречающийся в природе» относятся к форме, встречающейся в природе. Так, например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность дикого типа представляет собой

последовательность, присутствующую в организме, которая может быть выделена из природного источника, и которая не была предварительно модифицирована человеком.

[0057] Используемый здесь термин «кодирующая последовательность» относится к той части нуклеиновой кислоты (например, к гену), которая кодирует аминокислотную последовательность белка.

[0058] Термин «процент (%) идентичности последовательностей» используется здесь для сравнения между полинуклеотидами и полипептидами и определяется путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, где часть полинуклеотидной или полипептидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (то есть, пробелы) по сравнению с эталонной последовательностью для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент может быть вычислен путем определения числа положений, в которых идентичное основание нуклеиновой кислоты или аминокислотный остаток встречается в обеих последовательностях, с получением количества совпадающих положений, и последующим делением числа совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения и умножением результата на 100 с получением процента идентичности последовательностей. Альтернативно, процент может быть вычислен путем определения числа положений, в которых либо идентичное основание нуклеиновой кислоты, либо аминокислотный остаток встречаются в обеих последовательностях, либо основание нуклеиновой кислоты или аминокислотный остаток выровнены с пробелами, с получением числа совпадающих положений, и последующим делением числа совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения и умножением результата на 100 с получением процента идентичности последовательностей. Специалистам в данной области известно, что существует множество установленных алгоритмов, доступных для выравнивания двух последовательностей. Может быть проведено оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения, например, с помощью алгоритма локальной гомологии Смита и Вотермана (Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482 [1981]), с помощью алгоритма выравнивания гомологии Нидлмана и Вюнша (Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443 [1970], методом поиска подобия Пирсона и Липмана (Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 [1988]), с помощью компьютерных реализаций этих алгоритмов (например, GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программ GCG Wisconsin) или путем визуального наблюдения, как это известно специалистам в данной области. Примерами алгоритмов, подходящих для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются, но не ограничиваются ими, алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны Altschul et al. (См. Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410 [1990]; и Altschul et al., 1977, *Nucleic Acids Res.*, 3389-3402 [1977], соответственно). Программное обеспечение для проведения анализов BLAST имеется в открытом доступе на веб-сайте Национального Центра биотехнологической информации. Этот алгоритм включает сначала идентификацию пар последовательностей с высокой оценкой (HSP) путем

определения коротких слов длины W в последовательности запроса, которые либо соответствуют, либо удовлетворяют некоторому положительному пороговому показателю T при сопоставлении со словом той же длины в последовательности базы данных. T упоминается как порог оценки соседнего слова (см. Altschul et al., см. выше). Эти начальные совпадения соседних слов используются как исходные данные для инициирования поиска в целях нахождения более длинных HSP, содержащих эти совпадения. Затем совпадения слов расширяют в обоих направлениях вдоль каждой последовательности настолько, насколько может быть увеличена совокупная оценка выравнивания. Совокупные баллы вычисляют с использованием, для нуклеотидных последовательностей, параметров M (поощрительного балла за пару совпадающих остатков; всегда >0) и N (штрафного балла за несовпадающие остатки; всегда <0). Для аминокислотных последовательностей используется матрица оценок для расчета кумулятивной оценки. Расширение совпадений слов в каждом направлении прекращают, если: кумулятивный показатель выравнивания падает на величину X от максимально достигнутого значения; совокупная оценка становится равной нулю или ниже из-за накопления одного или более выравниваний остатков с отрицательной оценкой; или достигнут конец любой последовательности. Параметры алгоритма BLAST W , T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) используют по умолчанию: длину слова (W), равную 11, ожидание (E), равное 10, $M=5$, $N=-4$ и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей, в программе BLASTP используют по умолчанию: длину слова (W), равную 3, ожидание (E), равное 10, и оценочную матрицу BLOSUM62 (см. Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 [1989]). В качестве примера определения выравнивания последовательностей и % идентичности последовательностей можно использовать программы BESTFIT или GAP в пакете программ GCG Wisconsin Software (Accelrys, Madison WI) с использованием имеющихся параметров по умолчанию.

[0059] Используемый здесь термин «эталонная последовательность» относится к определенной последовательности, используемой в качестве основы для сравнения последовательностей. Эталонная последовательность может быть частью более крупной последовательности, например, сегментом полноразмерного гена или полипептидной последовательности. Обычно, эталонная последовательность имеет длину по меньшей мере 20 нуклеотидных или аминокислотных остатков, по меньшей мере 25 остатков, по меньшей мере 50 остатков, по меньшей мере 100 остатков или полную длину нуклеиновой кислоты или полипептида. Поскольку каждый из двух полинуклеотидов или полипептидов (1) может содержать последовательность (то есть, часть полной последовательности), сходную между двумя последовательностями, и (2) может дополнительно содержать последовательность, отличающуюся от другой последовательности, то сравнение последовательностей между двумя (или более) полинуклеотидами или полипептидами обычно проводят путем сравнения последовательностей двух полинуклеотидов или полипептидов в «окне сравнения» для

идентификации и сравнения локальных участков сходства последовательностей. В некоторых вариантах осуществления изобретения, «эталонная последовательность» может быть основана на первичной аминокислотной последовательности, где эталонная последовательность представляет собой последовательность, которая может иметь одно или более изменений в первичной последовательности. «Окно сравнения» относится к концептуальному сегменту, состоящему по меньшей мере приблизительно из 20 последовательных положений нуклеотидов или аминокислотных остатков, в котором последовательность может сравниваться с эталонной последовательностью, состоящей по меньшей мере из 20 последовательных нуклеотидов или аминокислот, и где часть последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (то есть, пробелы) на 20 процентов или менее по сравнению с эталонной последовательностью (которая не содержит добавлений или делеций) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Окно сравнения может быть длиннее, чем 20 смежных остатков, и может включать, но необязательно, 30, 40, 50, 100 или более остатков.

[0060] При использовании в отношении нумерации данной аминокислотной или полинуклеотидной последовательности, термины «соответствует», «ссылка на» и «относительно» относятся к нумерации остатков указанной эталонной последовательности, если данная аминокислотная или полинуклеотидная последовательность сравнивается с эталонной последовательностью. Другими словами, номер остатка или положение остатка данного полимера обозначается по отношению к эталонной последовательности, а не по фактическому числовому положению остатка в данной аминокислотной или полинуклеотидной последовательности. Так, например, данная аминокислотная последовательность, такая как последовательность сконструированной GLA, может быть выровнена с эталонной последовательностью путем введения пробелов для оптимизации соответствия остатков между двумя последовательностями. В этих случаях, несмотря на наличие пробелов, нумерация остатка в данной аминокислотной или полинуклеотидной последовательности производится относительно эталонной последовательности, с которой он был выровнен.

[0061] Используемые здесь термины «различие аминокислот» и «различие остатков» относятся к различию аминокислотных остатков в положении полипептидной последовательности относительно аминокислотного остатка в соответствующем положении эталонной последовательности. Положения аминокислотных различий обычно обозначаются здесь как «X_n», где n относится к соответствующему положению в эталонной последовательности, на которой основано различие остатков. Так, например, «различие остатков в положении X₄₄ по сравнению с SEQ ID NO: 8» относится к различию аминокислотных остатков в полипептидном положении, соответствующем положению 44 SEQ ID NO: 8. Таким образом, если эталонный полипептид из SEQ ID NO: 8 имеет аргинин в положении 44, то «различие остатков в положении X₄₄ по сравнению с SEQ ID NO: 8» относится к аминокислотной замене любого остатка, отличающегося от аргинина, в положении полипептида, соответствующем положению 44 SEQ ID NO: 8. В

большинстве случаев, в настоящей заявке, различие конкретных аминокислотных остатков в положении указано как «X_nY», где «X_n» указывает на соответствующее положение, как описано выше, а «Y» представляет собой однобуквенный идентификатор аминокислоты, обнаруженной в сконструированном полипептиде (то есть, в остатке, отличающемся от остатка в эталонном полипептиде). В некоторых случаях (например, как показано в Таблицах 2-1, 5-1, 6-1, 7-1, 8-1, 9-1, 11-1, 12-1 и 13-1), в настоящем описании также представлены специфические отличия аминокислот, обозначенные общепринятым обозначением «A_nB», где A представляет собой однобуквенный идентификатор остатка в эталонной последовательности, «n» представляет собой номер положения остатка в эталонной последовательности, а B представляет собой однобуквенный идентификатор замены остатка в последовательности сконструированного полипептида. В некоторых случаях, полипептид согласно изобретению может включать одно или более отличий аминокислотных остатков по сравнению с эталонной последовательностью, на что указывает список определенных положений, в которых присутствуют различия остатков по сравнению с эталонной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения, где в конкретном положении остатка полипептида может использоваться более, чем одна аминокислота, различные аминокислотные остатки, которые могут быть использованы, разделены символом «/» (например, X247D/X247N или X247D/N). В некоторых вариантах осуществления изобретения, варианты фермента содержат более, чем одну замену. Эти замены разделены косой чертой для удобства чтения (например, D24S/D202N). Настоящая заявка включает сконструированные полипептидные последовательности, содержащие одно или более отличий аминокислот, которые включают консервативные и/или неконсервативные аминокислотные замены.

[0062] Используемый здесь термин «мутация» относится к заменам, инсерциям, делециям и другим модификациям полипептидных и полинуклеотидных последовательностей. При этом, не предполагается, что настоящее изобретение ограничивается каким-либо конкретным типом мутаций.

[0063] «Консервативная аминокислотная замена» означает замену остатка другим остатком, имеющим аналогичную боковую цепь, и, таким образом, обычно включает замену аминокислоты в полипептиде аминокислотами того же или подобного определенного класса аминокислот. В качестве неограничивающего примера, аминокислота с алифатической боковой цепью может быть заменена другой алифатической аминокислотой (например, аланином, валином, лейцином и изолейцином); аминокислота с гидроксильной боковой цепью может быть заменена другой аминокислотой с гидроксильной боковой цепью (например, серином и треонином); аминокислота, имеющая ароматические боковые цепи, может быть заменена другой аминокислотой, имеющей ароматическую боковую цепь (например, фенилаланином, тирозином, триптофаном и гистидином); аминокислота с основной боковой цепью может быть заменена другой аминокислотой с основной боковой цепью (например, лизином и аргинином); аминокислота с кислотной боковой цепью может быть заменена другой

аминокислотой с кислотной боковой цепью (например, аспарагиновой кислотой или глутаминовой кислотой); и/или гидрофобная или гидрофильная аминокислота может быть заменена другой гидрофобной или гидрофильной аминокислотой, соответственно.

[0064] «Неконсервативная замена» означает замену аминокислоты в полипептиде аминокислотой со значительно отличающимися свойствами боковой цепи. Неконсервативные замены могут представлять собой замены аминокислот между определенными группами, а не внутри них, и эти замены влияют на (а) структуру пептидного остова в области замены (например, пролин вместо глицина) (b) заряд или гидрофобность, или (с) основную часть боковой цепи. Неограничивающим примером может служить типичная неконсервативная замена, которая может представлять собой замену кислотной аминокислоты на основную или алифатическую аминокислоту; замену ароматической аминокислоты на небольшую аминокислоту; и замену гидрофильной аминокислоты на гидрофобную аминокислоту.

[0065] Используемый здесь термин «делеция» относится к модификации полипептида путем удаления одной или более аминокислот из эталонного полипептида. Делеции могут включать удаление 1 или более аминокислот, 2 или более аминокислот, 5 или более аминокислот, 10 или более аминокислот, 15 или более аминокислот или 20 или более аминокислот, до 10% от общего количества аминокислот, или до 20% от общего количества аминокислот, составляющих эталонный фермент, при сохранении ферментативной активности и/или сохранении улучшенных свойств сконструированного фермента. Делеции могут быть сделаны во внутренних участках и/или в концевых участках полипептида. В различных вариантах осуществления изобретения, делеция может включать непрерывный сегмент или может быть прерывистой.

[0066] Используемый здесь термин «инсерция» относится к модификации полипептида путем добавления одной или более аминокислот из эталонного полипептида. Инсерции могут быть введены во внутренние части полипептида или на карбокси- или amino-конце. Инсерции, используемые в настоящей заявке, включают слитые белки, как известно специалистам в данной области. Инсерция может представлять собой непрерывный сегмент аминокислот или может быть разделена одной или более аминокислотами в природном полипептиде.

[0067] Используемые здесь термины «функциональный фрагмент» и «биологически активный фрагмент» являются синонимами и означают полипептид, который имеет amino-концевую и/или карбокси-концевую делецию (делеции) и/или внутренние делеции, но имеет оставшуюся аминокислотную последовательность, которая идентична соответствующим положениям в последовательности, с которой его сравнивают (например, полноразмерный сконструированный GLA согласно изобретению), и сохраняет по существу всю активность полноразмерного полипептида.

[0068] Используемый здесь термин «выделенный полипептид» относится к полипептиду, который в значительной степени отделен от других примесей, встречающихся в природе (например, белков, липидов и полинуклеотидов). Этот термин

охватывает полипептиды, которые были удалены или очищены от их природного окружения или экспрессионной системы (например, клетки-хозяина или синтеза *in vitro*). Рекомбинантные полипептиды GLA могут находиться внутри клетки, присутствовать в клеточной среде или могут быть получены в различных формах, таких как лизаты или выделенные препараты. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантные полипептиды GLA могут представлять собой выделенный полипептид.

[0069] Используемый здесь термин «практически чистый полипептид» относится к композиции, в которой преобладают полипептиды определенных видов (то есть, в молярном или массовом отношении они присутствуют в большем количестве, чем любые другие отдельные виды макромолекул в композиции), и такая композиция обычно считается в значительной степени очищенной, если нужные виды составляют по меньшей мере приблизительно 50% от присутствующих видов макромолекул в молях или % по массе. Обычно, по существу чистая композиция GLA включает приблизительно 60% или более, приблизительно 70% или более, приблизительно 80% или более, приблизительно 90% или более, приблизительно 95% или более и приблизительно 98% или более всех макромолекулярных частиц в молярном соотношении или в % по массе, присутствующих в композиции. В некоторых вариантах осуществления изобретения, соединения нужных видов очищают до значительной гомогенности (то есть, это означает, что загрязняющие вещества не могут быть обнаружены в композиции с применением обычных методов детектирования), при этом, композиция состоит по существу из макромолекул одного вида. Растворители, небольшие молекулы (<500 дальтон) и элементарные ионы не считаются макромолекулярными соединениями. В некоторых вариантах осуществления изобретения, выделенные рекомбинантные полипептиды GLA представляют собой по существу чистые полипептидные композиции.

[0070] Используемый здесь термин «улучшенные ферментативные свойства» относится к сконструированному полипептиду GLA, который демонстрирует улучшение любого ферментативного свойства по сравнению с эталонным полипептидом GLA и/или полипептидом GLA дикого типа или с другим сконструированным полипептидом GLA. Улучшенные свойства включают, но не ограничиваются ими, такие свойства, как повышенная экспрессия генов, повышенный уровень продуцирования белка, повышенная термоактивность, повышенная термостабильность, повышенная активность при различных уровнях pH, повышенная стабильность, повышенная ферментативная активность, повышенная специфичность к субстрату или аффинность, повышенная удельная активность, повышенная устойчивость к ингибированию субстрата и/или продукта, повышенная химическая стабильность, улучшенная химиоелективность, повышенная устойчивость к растворителям, повышенная толерантность к кислотному, нейтральному или основному pH, повышенная толерантность к протеолитической активности (то есть, сниженная чувствительность к протеолизу), сниженная агрегация, повышенная растворимость, сниженная иммуногенность, улучшенная

посттрансляционная модификация (например, гликозилирование), измененный температурный профиль, повышенное поглощение клетками, повышенная стабильность в лизосомах, повышенная способность клеток истощать Gb3, повышенная секреция клетками, продуцирующими GLA, и т.п.

[0071] Используемые здесь термины «повышенная ферментативная активность» и «повышенная каталитическая активность» относятся к улучшенным свойствам сконструированных полипептидов GLA, которые могут быть представлены увеличением удельной активности (например, количеством продуцированного продукта/время/массу белка) или увеличением процента превращения субстрата в продукт (например, процента превращения исходного количества субстрата в продукт за определенный период времени с использованием определенного количества GLA) по сравнению с эталонным ферментом GLA.

[0072] Репрезентативные способы определения ферментативной активности приведены в Примерах. Любое свойство, относящееся к ферментативной активности, может быть изменено, включая классические ферментативные свойства K_m , V_{max} или k_{cat} , изменение которых может приводить к повышению ферментативной активности. Улучшение ферментативной активности может быть приблизительно в 1,1 раза выше ферментативной активности соответствующего фермента дикого типа вплоть до 2-кратного, 5-кратного, 10-кратного, 20-кратного, 25-кратного, 50-кратного, 75-кратного, 100-кратного, 150-кратного, 200-кратного или более увеличения ферментативной активности, по сравнению с природной GLA или другой сконструированной GLA, из которой были получены полипептиды GLA.

[0073] В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированные полипептиды GLA имеют k_{cat} по меньшей мере 0,1/сек, по меньшей мере 0,5/сек, по меньшей мере 1,0/сек, по меньшей мере 5,0/сек, по меньшей мере 10,0/сек, а в некоторых предпочтительных вариантах, более 10,0/сек. В некоторых вариантах осуществления изобретения, K_m находится в диапазоне от приблизительно 1 мкМ до приблизительно 5 мМ; в диапазоне приблизительно от 5 мкМ до приблизительно 2 мМ; в диапазоне от приблизительно 10 мкМ до приблизительно 2 мМ; или в диапазоне от приблизительно 10 мкМ до приблизительно 1 мМ. В некоторых конкретных вариантах осуществления изобретения, сконструированный фермент GLA обладает повышенной ферментативной активностью после воздействия определенных условий в диапазоне от 1,5 до 10 раз, от 1,5 до 25 раз, от 1,5 до 50 раз, от 1,5 до 100 раз или более, чем у эталонного фермента GLA (например, GLA дикого типа или любого другого эталонного GLA, такого как SEQ ID NO: 8). Активность GLA может быть оценена любым подходящим способом, известным специалистам в данной области (например, с помощью стандартных анализов, таких как мониторинг изменений спектрофотометрических свойств реагентов или продуктов). В некоторых вариантах осуществления изобретения, количество полученного продукта может быть оценено с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в сочетании с УФ-поглощением или флуоресцентным детектированием непосредственно

или после дериватизации о-фталдигальдегидом (ОФА). В некоторых вариантах осуществления изобретения, количество продуцируемого продукта может быть оценено путем мониторинга флуоресценции (на длине волны возбуждения 355 нм, на длине волны излучения 460 нм) после гидролиза молекулы 4-метилумбеллиферил-альфа-D-галактопиранозид (4-MUGal). Сравнения ферментативной активности проводят с использованием определенного препарата фермента, определенного анализа в заданных условиях и одного или более определенных субстратов, как подробно описано далее в настоящей заявке. Обычно, при сравнении лизатов определяют количество клеток и количество анализируемого белка, а также используют идентичные системы экспрессии и идентичные клетки-хозяева для минимизации различий в количестве фермента, продуцируемого клетками-хозяевами и присутствующего в лизатах.

[0074] Используемый здесь термин «улучшенная толерантность к кислотному pH» означает, что рекомбинантная GLA согласно изобретению будет иметь повышенную стабильность (более высокую сохраняемую активность приблизительно при pH 4,8 после воздействия кислотного pH в течение определенного периода времени (от 1 часа до 24 часов)) по сравнению с эталонной GLA или другим ферментом.

[0075] Используемый здесь термин «улучшенное поглощение клетками» означает, что рекомбинантная GLA, описанная в настоящей заявке, обладает повышенным эндоцитозом в клетках по сравнению с эталонной GLA (включая GLA дикого типа) или другим ферментом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки представляют собой культивируемые фибробласты пациента с болезнью Фабри (более высокая сохраняющаяся внутриклеточная активность после инкубирования с культивируемыми клетками в течение определенного периода времени по сравнению с эталонной GLA или другим ферментом). В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная GLA, описанная в настоящей заявке, обладает более высокой внутриклеточной активностью в отношении культивируемых клеток в течение определенного периода времени по сравнению с эталонной GLA (включая GLA дикого типа) или другим ферментом. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, период времени составляет приблизительно 4 часа, а в некоторых других вариантах осуществления изобретения, период времени составляет менее 4 часов (например, 1, 2 или 3 часа), а в некоторых альтернативных вариантах осуществления изобретения, период времени составляет более 4 часов (например, 5, 6, 7, 8 или более часов).

[0076] Используемый здесь термин «физиологический pH» означает диапазон pH, обычно обнаруживаемый в крови индивидуума (например, человека).

[0077] Термин «основной pH» (например, используемый в отношении повышенной стабильности в основных условиях pH или повышенной толерантности к основному pH) означает диапазон pH приблизительно от 7 до 11.

[0078] Термин «кислотный pH» (например, используемый в отношении повышенной стабильности в условиях кислотного pH или повышенной устойчивости к

кислотному pH) означает диапазон pH приблизительно от 1,5 до 4,5.

[0079] Используемый здесь термин «превращение» относится к ферментативному превращению (или биотрансформации) субстрата(ов) в соответствующий(е) продукт(ы). «Процент превращения» относится к проценту субстрата, который превращается в продукт в течение определенного периода времени при определенных условиях. Таким образом, «ферментативная активность» или «активность» полипептида GLA может быть выражена как «процент превращения» субстрата в продукт за определенный период времени.

[0080] Используемый здесь термин «жесткость гибридизации» относится к условиям гибридизации, таким как условия промывки, при гибридизации нуклеиновых кислот. Обычно, реакции гибридизации проводят в условиях более низкой жесткости с последующими промывками различной, но более высокой жесткости. Термин «умеренно жесткая гибридизация» относится к условиям, которые позволяют ДНК-мишени связываться с комплементарной нуклеиновой кислотой, которая приблизительно на 60% идентична, а предпочтительно приблизительно на 75%, приблизительно на 85% идентична ДНК-мишени, и более, чем приблизительно на 90% идентична полинуклеотиду-мишени. Примерами умеренно жестких условий являются условия, эквивалентные условиям гибридизации в 50% формамиде, 5× растворе Денхардта, 5×SSPE, 0,2% ДСН при 42°C с последующей промывкой в 0,2×SSPE, 0,2% ДСН, при 42°C. «Гибридизация высокой жесткости» обычно относится к условиям, которые приблизительно на 10°C или менее отличаются от температуры плавления T_m , определенной в условиях раствора для определенной полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения, условия высокой жесткости относятся к условиям, которые позволяют осуществлять гибридизацию только тех последовательностей нуклеиновых кислот, которые образуют стабильные гибриды в 0,018 M NaCl при 65°C (то есть, если гибрид является нестабильным в 0,018 M NaCl при 65°C, то он не будет стабильным в условиях высокой жесткости, как описано в настоящей заявке). Условия высокой жесткости могут быть обеспечены, например, путем гибридизации в условиях, эквивалентных условиям в 50% формамиде, 5× растворе Денхардта, 5×SSPE, 0,2% ДСН при 42°C с последующей промывкой в 0,1×SSPE и 0,1% ДСН при 65°C. Другим условием высокой жесткости является гибридизация в условиях, эквивалентных гибридизации в 5×SSC, содержащем 0,1% (масса:объем) ДСН, при 65°C и промывке в 0,1×SSC, содержащем 0,1% ДСН, при 65°C. Другие условия гибридизации высокой жесткости, а также условия умеренной жесткости описаны в цитированных выше документах.

[0081] Используемый здесь термин «оптимизированный по кодонам» относится к изменениям в кодонах полинуклеотида, кодирующего белок, таким образом, что кодируемый белок более эффективно экспрессируется в представляющем интерес организме и/или в представляющих интерес клетках. Хотя генетический код является вырожденным в том смысле, что большинство аминокислот представлены несколькими кодонами, называемыми «синонимами» или «синонимичными» кодонами, однако, хорошо

известно, что использование кодонов конкретными организмами является не случайным и смещено в сторону определенных триплетов кодонов. Это смещение использования кодонов может быть выше по отношению к данному гену, генам с общей функцией или наследственным происхождением, белкам с высоким уровнем экспрессии по сравнению с белками с низким числом копий и к совокупным кодирующим белок областям генома организма. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотиды, кодирующие ферменты GLA, могут быть оптимизированы по кодомам для оптимального продуцирования продукта организм(ами)-хозяином(хозяевами) и/или клеткой(клетками) определенного типа, выбранными для экспрессии с учетом содержания GC, скрытых сайтов сплайсинга, сигналов терминации транскрипции, мотивов, которые могут влиять на стабильность РНК, и вторичных структур нуклеиновых кислот, а также с учетом любых других представляющих интерес факторов.

[0082] Используемый здесь термин «регуляторная последовательность» включает все компоненты, которые необходимы или благоприятны для экспрессии полинуклеотида и/или полипептида согласно изобретению. Каждая регуляторная последовательность может быть нативной или чужеродной по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. Такие регуляторные последовательности включают, но не ограничиваются ими, лидерную последовательность, последовательность полиаденилирования, последовательность пропептида, последовательность промотора, последовательность сигнального пептида, последовательность инициации и терминации транскрипции. Как минимум, регуляторные последовательности включают промотор и сигналы терминации транскрипции и трансляции. Регуляторные последовательности могут быть снабжены линкерами для введения специфических рестрикционных сайтов, облегчающих лигирование регуляторных последовательностей с кодирующей областью последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид.

[0083] Используемый здесь термин «функционально связанный» относится к конфигурации, при которой регуляторная последовательность соответствующим образом размещена (то есть, в функциональном соотношении) в положении относительно представляющего интерес полинуклеотида, таким образом, что регуляторная последовательность направляет или регулирует экспрессию представляющего интерес полинуклеотида и/или полипептида.

[0084] Используемый здесь термин «промоторная последовательность» означает последовательность нуклеиновой кислоты, которая распознается клеткой-хозяином для экспрессии представляющего интерес полинуклеотида, такой как кодирующая последовательность. Промоторная последовательность содержит последовательности регуляции транскрипции, которые опосредуют экспрессию представляющего интерес полинуклеотида. Промотор может представлять собой любую последовательность нуклеиновой кислоты, которая обладает транскрипционной активностью в выбранной клетке-хозяине, включая мутантные, усеченные и гибридные промоторы, и может быть получен из генов, кодирующих внеклеточные или внутриклеточные полипептиды,

которые являются гомологичными или гетерологичными для клетки-хозяина.

[0085] Используемый здесь термин «подходящие условия проведения реакции» относится к условиям в растворе для реакции ферментативного превращения (например, к диапазонам загрузки фермента, температуре, pH, буферам, сорастворителям и т.п.), при которых полипептид GLA согласно изобретению способен превращать субстрат в желаемое соединение-продукт. Типичные «подходящие условия реакции» представлены в настоящей заявке и проиллюстрированы в Примерах. «Загрузка фермента» относится к концентрации или к количеству компонента в реакционной смеси в начале реакции. «Субстрат», если он относится к реакции ферментативного превращения, означает соединение или молекулу, на которые действует полипептид GLA. «Продукт», если он относится к реакции ферментативного превращения, означает соединение или молекулу, образующиеся в результате действия полипептида GLA на субстрат.

[0086] Используемый здесь термин «культивирование» относится к выращиванию популяции микроорганизмов, клеток млекопитающих или других подходящих клеток в любых подходящих условиях (например, с использованием жидкой, гелеобразной или твердой среды).

[0087] Рекомбинантные полипептиды могут быть получены с применением любых подходящих способов, известных специалистам в данной области. Гены, кодирующие представляющий интерес полипептид дикого типа, могут быть клонированы в векторах, таких как плазмиды, и экспрессированы в желаемых хозяевах, таких как *E. coli*, *S. cerevisiae* или клеточные линии млекопитающих (например, клетки НЕК или СНО) и т.п. Варианты рекомбинантных полипептидов могут быть получены различными способами, известными специалистам в данной области. Действительно, существует широкий спектр различных методов мутагенеза, хорошо известных специалистам в данной области. Кроме того, наборы для мутагенеза также поставляются многими коммерческими поставщиками биологических материалов. Существуют методы введения специфических замен в определенных аминокислотах (сайт-направленных), специфических или случайных мутаций в локализованной области гена (региоспецифических) или случайного мутагенеза по всему гену (например, мутагенеза с насыщением). Специалистам в данной области известны многочисленные подходящие способы получения вариантов ферментов, включая, но не ограничиваясь ими, сайт-направленный мутагенез одноцепочечной ДНК или двухцепочечной ДНК посредством ПЦР, кластерный мутагенез, генный синтез, ПЦР с вероятностью ошибки, перестановку, и химический мутагенез с насыщением или любой другой подходящий метод, известный специалистам в данной области. Неограничивающие примеры методов, применяемых для конструирования ДНК и белков, представлены в следующих патентах: в патенте США № 6117679; в патенте США № 6420175; в патенте США № 6376246; в патенте США № 6586182; в патенте США № 7747391; в патенте США № 7747393; в патенте США № 7783428; и в патенте США № 8383346. После получения вариантов, они могут быть подвергнуты скринингу на любое желаемое свойство (например, высокую или повышенную активность, или низкую или

пониженную активность, повышенную термоактивность, повышенную термостабильность и/или устойчивость к кислотному pH и т.п.). В некоторых вариантах осуществления изобретения могут быть использованы «рекомбинантные полипептиды GLA» (также называемые в настоящей заявке «сконструированными полипептидами GLA», «вариантами ферментов GLA» и «вариантами GLA»).

[0088] Используемый здесь термин «вектор» означает конструкцию ДНК для введения последовательности ДНК в клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектор представляет собой экспрессионный вектор, который функционально связан с подходящей регуляторной последовательностью, способной влиять на экспрессию полипептида, кодируемого в последовательности ДНК, в подходящем хозяине. В некоторых вариантах осуществления изобретения, «экспрессионный вектор» имеет промоторную последовательность, функционально связанную с последовательностью ДНК (например, трансгеном) для регуляции экспрессии в клетке-хозяине, а в некоторых вариантах осуществления изобретения, он также содержит последовательность терминации транскрипции.

[0089] Используемый здесь термин «вектор для генотерапии» относится к наполнителям или носителям, подходящим для доставки полинуклеотидных последовательностей в клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, векторы инкапсулируют гены (например, терапевтические гены) или полинуклеотидные последовательности для доставки в клетки или ткани, включая, но не ограничиваясь ими, аденовирус (AV), аденоассоциированный вирус (AAV), лентивирус (LV) и невирусные векторы, такие как липосомы. При этом, не предполагается, что настоящее изобретение ограничивается каким-либо конкретным вектором для генотерапии, поскольку может быть применен любой носитель, подходящий для данных условий. Вектор для генотерапии может быть предназначен для доставки генов в конкретные виды или конкретному хозяину, или он может найти более широкое применение.

[0090] Используемый здесь термин «экспрессия» включает любую стадию, связанную с продуцированием полипептида, включая, но не ограничиваясь ими, транскрипцию, посттранскрипционную модификацию, трансляцию и посттрансляционную модификацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения, этот термин также включает секрецию полипептида из клетки.

[0091] Используемый здесь термин «продуцирует» относится к продуцированию белков и/или других соединений клетками. Предполагается, что этот термин охватывает любую стадию, связанную с продуцированием полипептидов, включая, но не ограничиваясь ими, транскрипцию, посттранскрипционную модификацию, трансляцию и посттрансляционную модификацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения, этот термин также включает секрецию полипептида из клетки.

[0092] Используемая здесь аминокислотная или нуклеотидная последовательность (например, промоторная последовательность, сигнальный пептид, терминаторная последовательность и т.п.) является «рекомбинантной» или «гетерологичной» по

отношению к другой последовательности, с которой она функционально связана, если эти две последовательности не связаны друг с другом в природе.

[0093] Используемые здесь термины «клетка-хозяин» и «штамм-хозяин» относятся к подходящим хозяевам для экспрессионных векторов, содержащих представленную здесь ДНК (например, полинуклеотиды, кодирующие варианты GLA). В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки-хозяева представляют собой прокариотические или эукариотические клетки, которые были трансформированы или трансфицированы векторами, сконструированными с применением методов рекомбинантных ДНК, известных специалистам в данной области.

[0094] Термин «аналог» означает полипептид, имеющий последовательность, которая более, чем на 70%, но менее, чем на 100% (например, более, чем на 75%, 78%, 80%, 83%, 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) идентична последовательности эталонного полипептида. В некоторых вариантах осуществления изобретения, «аналоги» означают полипептиды, которые содержат один или более не встречающихся в природе аминокислотных остатков, включая, но не ограничиваясь ими, гомоаргинин, орнитин и норвалин, а также встречающиеся в природе аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аналоги также включают один или более остатков D-аминокислот и непептидные связи между двумя или более аминокислотными остатками.

[0095] Используемый здесь термин «терапевтический» относится к соединению, вводимому индивидууму, у которого имеются признаки или симптомы патологии, в целях достижения полезных или желательных терапевтических эффектов.

[0096] Используемый здесь термин «фармацевтическая композиция» относится к композиции, подходящей для фармацевтического применения у индивидуума-млекопитающего (например, человека), и содержащей фармацевтически эффективное количество сконструированного полипептида GLA согласно изобретению и приемлемый носитель.

[0097] Используемый здесь термин «генотерапия» относится к доставке гена, полидезоксирибонуклеотидной или полинуклеотидной последовательности (последовательностей) с помощью вектора для генотерапии в клетки или ткани в целях модификации этих клеток или тканей для лечения или профилактики заболевания. Генотерапия может включать замену мутированного гена, вызывающего заболевание, нормальной копией гена или инактивацию или «выключение» мутантного гена, который имеет несоответствующие функции. В некоторых вариантах осуществления изобретения, генотерапия применяется для лечения заболеваний у пациентов.

[0098] Используемый здесь термин «мРНК-терапия» относится к доставке полирибонуклеотидной последовательности мРНК в клетки или ткани для модификации этих клеток или тканей в целях лечения или профилактики заболевания. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотидные последовательности мРНК для доставки в клетки или ткани приготавливают, например, в липосомах, но не

ограничиваясь ими. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мРНК-терапия применяется для лечения заболевания у пациентов.

[0099] Используемый здесь термин «клеточная терапия» относится к доставке живых экзогенно модифицированных клеток пациентам в целях восполнения отсутствующего гена для лечения или профилактики заболевания. Затем модифицированные клетки повторно вводят в организм.

[0100] Используемый здесь термин «эффективное количество» означает количество, достаточное для получения желаемого результата. Специалист в данной области может определить эффективное количество с помощью рутинных экспериментов.

[0101] Используемые здесь термины «выделенный» и «очищенный» относятся к молекуле (например, выделенной нуклеиновой кислоте, полипептиду и т.п.) или к другому компоненту, который был удален по меньшей мере из одного другого компонента, с которым он связан в природе. Термин «очищенный» не указывает на абсолютную чистоту, а скорее, это относительное определение.

[0102] Используемый здесь термин «индивидуум» охватывает млекопитающих, таких как человек, приматы, не являющиеся человеком, домашний скот, домашние питомцы и лабораторные животные (например, грызуны и зайцеобразные). Предполагается, что этот термин охватывает как женщин, так и мужчин.

[0103] Используемый здесь термин «пациент» относится к любому индивидууму, который проходит обследование, лечение или страдает заболеванием.

[0104] Термин «младенец» относится к ребенку в период от первого месяца после рождения до приблизительно одного (1) года. Используемый здесь термин «новорожденный» относится к ребенку в период от рождения до 28-го дня жизни. Термин «недоношенный ребенок» относится к младенцу, рожденному после двадцатой полной недели беременности, но до полного срока, обычно с массой тела от ~500 до ~2499 граммов при рождении. «Младенец с очень низкой массой тела при рождении» означает, что этот младенец имеет массу тела менее 1500 г при рождении.

[0105] Используемый здесь термин «ребенок» относится к лицу, не достигшему совершеннолетия, при котором он может давать согласие на лечение или исследовательские процедуры. В некоторых вариантах осуществления изобретения, этот термин относится к человеку в период между рождением и подростковым возрастом.

[0106] Используемый здесь термин «взрослый» относится к лицу, достигшему совершеннолетия в соответствующей юрисдикции (например, 18 лет в США). В некоторых вариантах осуществления изобретения, этот термин относится к любому полностью сложившемуся зрелому организму. В некоторых вариантах осуществления изобретения, термин «молодой взрослый» относится к лицу моложе 18 лет, но достигшему половой зрелости.

[0107] Используемые здесь термины «композиция» и «препарат» охватывают продукты, содержащие по меньшей мере одну модифицированную GLA согласно изобретению и предназначенные для любого подходящего применения (например,

фармацевтические композиции, диетические/пищевые добавки, корма и т.п.).

[0108] Используемые здесь термины «введение» и «применение» композиции означают доставку композиции согласно изобретению индивидууму (например, человеку, страдающему симптомами болезни Фабри).

[0109] Используемый здесь термин «носитель», если он употребляется в отношении фармацевтической композиции, означает любой из стандартных фармацевтических носителей, буферов и наполнителей, таких как стабилизаторы, консерванты и адъюванты.

[0110] Используемый здесь термин «фармацевтически приемлемый» относится к препарату, который может быть введен индивидууму без каких-либо нежелательных биологических эффектов или вредного взаимодействия с любым из компонентов, в которых он содержится, и который обладает желаемой биологической активностью.

[0111] Используемый здесь термин «наполнитель» относится к любой фармацевтически приемлемой добавке, носителю, разбавителю, адъюванту или другому ингредиенту, отличающемуся от активного фармацевтического ингредиента (API; например, сконструированных полипептидов GLA согласно изобретению). Наполнители обычно используют для приготовления препарата и/или для его введения в определенных целях.

[0112] Используемый здесь термин «терапевтически эффективное количество», если он употребляется в отношении симптомов заболевания/состояния, относится к количеству и/или концентрации соединения (например, сконструированных полипептидов GLA), которые облегчают, ослабляют или устраняют один или более симптомов заболевания/состояния или предотвращают или отсрочивают появление симптома(ов).

[0113] Используемый здесь термин «терапевтически эффективное количество», если он употребляется в отношении заболевания/состояния, относится к количеству и/или концентрации композиции (например, сконструированных полипептидов GLA), которые облегчают, ослабляют или устраняют заболевание/состояние. В некоторых вариантах осуществления изобретения, этот термин используется в отношении количества композиции, которое вызывает биологический (например, терапевтический) ответ ткани, системы или животного, который требуется исследователю, врачу, ветеринару или другому врачу-клиницисту.

[0114] Предполагается, что термины «лечение», «лечить» и «терапия» охватывают как профилактическое (например, превентивное), так и паллиативное лечение.

Экспрессия и активность сконструированной GLA:

[0115] Секретируемая экспрессия дрожжевой кодон-оптимизированной зрелой GLA человека была достигнута с использованием синтетического сигнального пептида мышинового IG. Клоны экспрессировали из вектора pCDNA3.1(+) в клетках HEK293T. Этот подход позволяет получить супернатанты с детектируемой активностью в отношении флуорогенного субстрата 4-метилумбеллиферил- α -D-галактопиранозида (4-MuGal).

[0116] В некоторых вариантах осуществления изобретения, для выявления

мутационного разнообразия с аналогичной стабильностью и улучшенным поглощением клетками по сравнению с SEQ ID NO: 8 была сконструирована комбинаторная библиотека, генерирующая варианты GLA, полученные из SEQ ID NO: 8. Эквивалентные объемы супернатанта подвергали скринингу в незараженном состоянии (без инкубирования, pH 4,6) или после одночасового инкубирования при низком pH (3,9-4,2), при нейтральном pH (7,0-7,6) или в человеческой сыворотке (при физиологическом pH 7,1-8,2). Варианты GLA с активностью, обусловленной повышенной экспрессией GLA или удельной активностью GLA, идентифицировали на основании кратности их повышения по сравнению с исходной GLA. Варианты GLA с повышенной стабильностью идентифицировали путем деления увеличения кратности, наблюдаемого в условиях воздействия, на увеличение кратности, наблюдаемое в условиях без такого воздействия. Этот подход позволяет снижать смещение в отношении выбора вариантов на основе повышенной экспрессии, но без изменения специфической активности при экстремальных значениях pH. Составные показатели активности (произведение кратных увеличений для всех трех условий) и стабильности (произведение показателей стабильности) использовали для ранжирования мутаций в улучшенных вариантах для их включения в последующие библиотеки GLA. В дополнительных вариантах осуществления изобретения были применены дополнительные способы и последовательности, описанные в Примерах.

Сконструированная GLA:

[0117] В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированная GLA, обладающая улучшенными свойствами, имеет последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 88%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 91%, по меньшей мере приблизительно на 92%, по меньшей мере приблизительно на 93%, по меньшей мере приблизительно на 94%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, 8, 48, 158, 372, 374, 704 и/или 1022, и имеет различия аминокислотных остатков по сравнению с SEQ ID NO: 2, 8, 48, 158, 372, 374, 704 и/или 1022, в одном или более положениях аминокислот (например, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 20 или более положениях аминокислот по сравнению с SEQ ID NO: 2, 8, 48, 158, 372, 374, 704 и/или 1022, или с последовательностью, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или более идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, 8, 48, 158, 372, 374, 704 и/или 1022). В некоторых вариантах осуществления изобретения, отличие остатков по сравнению с SEQ ID NO: 5 в одном или более положениях включает по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более консервативных аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированный полипептид GLA представляет собой полипептид, указанный в Таблицах 2-1, 5-1, 6-1, 7-1, 8-1, 9-1, 11-1, 12-1 и/или 13-1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированный полипептид GLA содержит SEQ ID NO: 2, 8, 48, 158, 372, 374, 704 и/или 1022.

[0118] Настоящее изобретение также относится к рекомбинантной альфа-галактозидазе А, где указанная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 8 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или замену в одном или более положениях, выбранных из 44, 44/217, 44/217/316, 44/217/322, 44/217/322/337, 44/247, 44/247/302, 44/247/302/322, 44/247/322, 44/247/337, 44/247/362, 44/302, 44/337, 44/373, 217/322, 217/373, 247/322, 247/362, 302/322/362/373, 302/337, 316, 316/337, 322, 322/337, 362/373 и 373, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 8 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 44L, 44L/217F, 44L/217F/316L, 44L/217F/322M, 44L/217F/322M/337A, 44L/247N, 44L/247N/302Q, 44L/247N/302Q/322M, 44L/247N/322M, 44L/247N/337A, 44L/247N/362K, 44L/302Q, 44L/337A, 44L/373R, 217F/322M, 217F/373R, 247N/322M, 247N/362K, 302Q/322M/362K/373R, 302Q/337A, 316L, 316L/337A, 322M, 322M/337A, 362K/373R и 373R, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 8, или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из R44L, R44L/R217F, R44L/R217F/D316L, R44L/R217F/I322M, R44L/R217F/I322M/P337A, R44L/D247N, R44L/D247N/K302Q, R44L/D247N/K302Q/I322M, R44L/D247N/I322M, R44L/D247N/P337A, R44L/D247N/Q362K, R44L/K302Q, R44L/P337A, R44L/K373R, R217F/I322M, R217F/K373R, D247N/I322M, D247N/Q362K, K302Q/I322M/Q362K/K373R, K302Q/P337A, D316L, D316L/P337A, I322M, I322M/P337A, Q362K/K373R и K373R, где положения аминокислот в указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 8.

[0119] Настоящее изобретение также относится к рекомбинантной альфа-галактозидазе А, где указанная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 8 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 10/39/44/47/92/166/206/217/247/261/271/302/316/322/337/362/368/373/392, 44/217/316, 44/217/322/337, 166/362, 217/373 и 362/373, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична SEQ ID NO: 8 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 10T/39M/44L/47S/92Y/166S/206K/217F/247N/261A/271H/302Q/316L/322M/337A/362K/368W/373R/392M, 44L/217F/316L, 44L/217F/322M/337A, 166A/362K, 217F/373R и 362K/373R, где положения аминокислот в указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 8 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из P10T/E39M/R44L/T47S/H92Y/P166S/A206K/R217F/D247N/G261A/A271H/K302Q/D316L/I322M/P337A/Q362K/A368W/K373R/T392M, R44L/R217F/D316L, R44L/R217F/I322M/P337A, P166A/Q362K, R217F/K373R и Q362K/K373R где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 8.

[0120] Настоящее изобретение также относится к рекомбинантной альфа-галактозидазе А, где указанная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 58 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 7, 7/48/68, 7/48/68/120/282/299, 7/48/130/282, 7/48/180, 7/68/130/282/365, 7/68/180, 7/88/120/305/365, 7/120, 7/130, 7/282, 7/305, 7/305/365, 7/365, 39, 47, 47/87/95/96/158/162, 47/95, 47/273, 47/343, 48, 48/68, 48/180/282, 48/282, 48/282/305,

67/180, 68, 68/299/300, 71, 87/91/95/96/158/162, 87/91/95/96/206/343, 87/96/155/273/343, 88, 91/95, 91/95/96, 92, 93, 96, 96/273, 96/312/343, 120, 120/299/305, 151, 158, 158/162/273, 162, 162/273, 162/343, 166, 178, 180, 181, 206, 217, 271, 273, 273/343, 282, 282/365, 293/391, 299/300, 299/300/305/365, 300, 301, 305, 305/365, 314, 333, 336, 337, 343, 345, 363, 365, 370, 389, 393, 394, 396/398, 397 и 398, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 58 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положений, выбранных из 7L, 7L/48D/68E, 7L/48D/68E/120H/282N/299R, 7L/48D/130E/282N, 7L/48D/180G, 7L/68E/130E/282N/365V, 7L/68E/180G, 7L/88A/120H/305G/365V, 7L/120H, 7L/130E, 7L/282N, 7L/305G, 7L/305G/365V, 7L/365V, 39V, 47D, 47D/87K/95E/96L/158R/162H, 47D/95E, 47D/273P, 47D/343G, 47V, 48D, 48D/68E, 48D/180G/282N, 48D/282N, 48D/282N/305G, 67T/180G, 68E, 68E/299R/300I, 71P, 87K/91Q/95E/96L/158A/162K, 87K/91Q/95E/96L/206S/343G, 87K/96I/155N/273P/343G, 88A, 91Q/95E, 91Q/95E/96L, 92F, 92T, 93I, 96L, 96L/273P, 96L/312Q/343G, 120H, 120H/299R/305G, 151L, 158A, 158A/162K/273G, 158R, 162H/343D, 162K, 162K/273P, 162S, 166K, 178G, 178S, 180G, 180L, 180T, 180V, 181A, 206K, 206S, 217K, 271R, 273P, 273P/343G, 282N, 282N/365V, 293P/391A, 299R/300I, 299R/300I/305G/365V, 300I, 301M, 305G, 305G/365V, 314A, 333F, 333G, 336V, 337R, 343D, 343G, 345A, 345Q, 363Q, 365A, 365Q, 365V, 370G, 389K, 393V, 394K, 396G/398T, 397A, 398A, 398P, 398S и 398V, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 58.

[0121] В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 58 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из R7L, R7L/E48D/Q68E, R7L/E48D/Q68E/Y120H/D282N/Q299R, R7L/E48D/D130E/D282N, R7L/E48D/F180G, R7L/Q68E/D130E/D282N/F365V, R7L/Q68E/F180G, R7L/Q88A/Y120H/N305G/F365V, R7L/Y120H, R7L/D130E, R7L/D282N, R7L/N305G, R7L/N305G/F365V, R7L/F365V, E39V, T47D, T47D/R87K/S95E/K96L/L158R/R162H, T47D/S95E, T47D/S273P, T47D/K343G, T47V, E48D, E48D/Q68E, E48D/F180G/D282N, E48D/D282N, E48D/D282N/N305G, P67T/F180G, Q68E, Q68E/Q299R/L300I, S71P, R87K/N91Q/S95E/K96L/L158A/R162K, R87K/N91Q/S95E/K96L/A206S/K343G, R87K/K96I/H155N/S273P/K343G, Q88A, N91Q/S95E, N91Q/S95E/K96L, H92F, H92T, V93I, K96L, K96L/S273P, K96L/P312Q/K343G, Y120H, Y120H/Q299R/N305G, D151L, L158A,

L158A/R162K/S273G, L158R, R162H/K343D, R162K, R162K/S273P, R162S, P166K, W178G, W178S, F180G, F180L, F180T, F180V, Q181A, A206K, A206S, R217K, A271R, S273P, S273P/K343G, D282N, D282N/F365V, L293P/Q391A, Q299R/L300I, Q299R/L300I/N305G/F365V, L300I, R301M, N305G, N305G/F365V, S314A, S333F, S333G, I336V, P337R, K343D, K343G, V345A, V345Q, L363Q, F365A, F365Q, F365V, S370G, T389K, S393V, L394K, D396G/L398T, L397A, L398A, L398P, L398S и L398V, где положения аминокислот в указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 58.

[0122] Настоящее изобретение также относится к рекомбинантной альфа-галактозидазе А, где указанная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 158 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 24/202, 39/47, 39/47/217, 39/151, 39/282/337/398, 39/337/343/398, 39/393/398, 47/130, 47/151, 47/343/345/393, 48, 48/68, 48/68/217/333/391/393, 48/68/333, 48/217, 48/333, 48/345/393, 48/393, 59/143, 68, 68/345, 130, 130/158, 130/158/393, 130/345/393, 143/271, 143/333, 143/387, 151, 151/158/217/343/345/393, 151/206/282/337/343/345/398, 151/282/393, 151/345/393/398, 151/393, 158, 158/393, 202, 206, 206/217, 217, 217/333, 217/337/345/398, 271, 282/393, 333, 333/345, 337/343/345/398, 343, 343/345/393/398, 393 и 393/398, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 158. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 158 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 24S/202N, 39V/47D, 39V/47V/217K, 39V/151L, 39V/282N/337R/398A, 39V/337R/343G/398A, 39V/393V/398A, 47V/130E, 47V/151L, 47V/343D/345Q/393V, 48D, 48D/68E, 48D/68E/217K/333F/391A/393V, 48D/68E/333F, 48D/217K, 48D/333F, 48D/333G, 48D/345Q/393V, 48D/393V, 59A/143S, 68E, 68E/345Q, 130E, 130E/158R, 130E/158R/393V, 130E/345Q/393V, 143S/271N, 143S/333N, 143S/387N, 151L, 151L/158R/217K/343G/345Q/393V, 151L/206S/282N/337R/343D/345Q/398A, 151L/282N/393V, 151L/345Q/393V/398A, 151L/393V, 158R, 158R/393V, 202N, 206S, 206S/217K, 217K, 217K/333F, 217K/333G, 217K/337R/345Q/398A, 271N, 282N/393V, 333F/345Q, 333G, 333N, 337R/343G/345Q/398A, 343D, 343D/345Q/393V/398A, 393V и 393V/398A, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 158. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит

полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 158 или его функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из D24S/D202N, E39V/T47D, E39V/T47V/R217K, E39V/D151L, E39V/D282N/P337R/L398A, E39V/P337R/K343G/L398A, E39V/S393V/L398A, T47V/D130E, T47V/D151L, T47V/K343D/V345Q/S393V, E48D, E48D/Q68E, E48D/Q68E/R217K/S333F/Q391A/S393V, E48D/Q68E/S333F, E48D/R217K, E48D/S333F, E48D/S333G, E48D/V345Q/S393V, E48D/S393V, C59A/C143S, Q68E, Q68E/V345Q, D130E, D130E/L158R, D130E/L158R/S393V, D130E/V345Q/S393V, C143S/A271N, C143S/S333N, C143S/E387N, D151L, D151L/L158R/R217K/K343G/V345Q/S393V, D151L/A206S/D282N/P337R/K343D/V345Q/L398A, D151L/D282N/S393V, D151L/V345Q/S393V/L398A, D151L/S393V, L158R, L158R/S393V, D202N, A206S, A206S/R217K, R217K, R217K/S333F, R217K/S333G, R217K/P337R/V345Q/L398A, A271N, D282N/S393V, S333F/V345Q, S333G, S333N, P337R/K343G/V345Q/L398A, K343D, K343D/V345Q/S393V/L398A, S393V и S393V/L398A, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 158.

[0123] Настоящее изобретение также относится к рекомбинантной альфа-галактозидазе А, где указанная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 372 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 10, 10/39/44/322, 10/39/92/206/217/271, 10/39/92/247, 10/39/92/247/271/316, 10/44, 10/44/47/92/247, 10/44/47/261/302/322/368, 10/44/92/316/322, 10/44/261/302/316, 10/44/302/337/368, 10/47/217/247/316/392, 10/47/217/322, 10/47/271, 10/92, 10/92/206/217/247, 10/92/206/247/316/322/392, 10/92/206/247/322/368, 10/92/217/261/302/337, 10/206/217/271, 10/206/247, 10/206/261/271/316, 10/261, 10/271/302, 10/302, 10/302/316, 10/302/322/337, 10/316/322, 10/337/392, 10/368, 39/44/92/162/247/302/316/322, 39/44/92/217/322, 39/44/92/247/271/302, 39/47/92/247/302/316/322, 39/47/217/247/368, 39/47/247, 39/92/247/302/316/337/368, 39/92/316/322, 39/247/271, 39/247/271/316, 39/322, 44/47/92/206/217/316/322, 44/47/92/247/261/271/316/337/368, 44/47/206/217/247/271/322, 44/47/247/322/368, 44/47/302/316/322, 44/92/206/247/368, 44/206/337, 44/247/261/302/316, 44/247/261/302/316/322, 47/92/247/271, 47/217/302, 47/247, 47/247/271, 89/217/247/261/302/316, 92/217/271, 92/247, 92/247/271/322, 92/247/302/322/337, 92/271/337, 92/302, 92/316, 206/217/271/392, 217/247/316/322/337/368, 247, 247/271, 247/302, 271, 271/302/322, 271/316/322, 302/322/368 и 368, где аминокислотные положения указанной полипептидной

последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 372. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 158 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 10P, 10P/39E/44R/322I, 10P/39E/92H/206A/217R/271A, 10P/39E/92H/247D, 10P/39E/92H/247D/271A/316D, 10P/44R, 10P/44R/47T/92H/247D, 10P/44R/47T/261G/302K/322I/368A, 10P/44R/92H/316D/322I, 10P/44R/261G/302K/316D, 10P/44R/302K/337P/368A, 10P/47T/217R/247D/316D/392T, 10P/47T/217R/322I, 10P/47T/271A, 10P/92H, 10P/92H/206A/217R/247D, 10P/92H/206A/247D/316D/322I/392T, 10P/92H/206A/247D/322I/368A, 10P/92H/217R/261G/302K/337P, 10P/206A/217R/271A, 10P/206A/247D, 10P/206A/261G/271A/316D, 10P/261G, 10P/271A/302K, 10P/302K, 10P/302K/316D, 10P/302K/322I/337P, 10P/316D/322I, 10P/337P/392T, 10P/368A, 39E/44R/92H/162M/247D/302K/316D/322I, 39E/44R/92H/217R/322I, 39E/44R/92H/247D/271A/302K, 39E/47T/92H/247D/302K/316D/322I, 39E/47T/217R/247D/368A, 39E/47T/247D, 39E/92H/247D/302K/316D/337P/368A, 39E/92H/316D/322I, 39E/247D/271A, 39E/247D/271A/316D, 39E/322I, 44R/47T/92H/206A/217R/316D/322I, 44R/47T/92H/247D/261G/271A/316D/337P/368A, 44R/47T/206A/217R/247D/271A/322I, 44R/47T/247D/322I/368A, 44R/47T/302K/316D/322I, 44R/92H/206A/247D/368A, 44R/206A/337P, 44R/247D/261G/302K/316D, 44R/247D/261G/302K/316D/322I, 47T/92H/247D/271A, 47T/217R/302K, 47T/247D, 47T/247D/271A, 89I/217R/247D/261G/302K/316D, 92H/217R/271A, 92H/247D, 92H/247D/271A/322I, 92H/247D/302K/322I/337P, 92H/271A/337P, 92H/302K, 92H/316D, 206A/217R/271A/392T, 217R/247D/316D/322I/337P/368A, 247D, 247D/271A, 247D/302K, 271A, 271A/302K/322I, 271A/316D/322I, 302K/322I/368A и 368A, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 372. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 372 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из T10P, T10P/M39E/L44R/M322I, T10P/M39E/Y92H/K206A/F217R/H271A, T10P/M39E/Y92H/N247D, T10P/M39E/Y92H/N247D/H271A/L316D, T10P/L44R, T10P/L44R/S47T/Y92H/N247D, T10P/L44R/S47T/A261G/Q302K/M322I/W368A, T10P/L44R/Y92H/L316D/M322I, T10P/L44R/A261G/Q302K/L316D, T10P/L44R/Q302K/A337P/W368A, T10P/S47T/F217R/N247D/L316D/M392T, T10P/S47T/F217R/M322I, T10P/S47T/H271A, T10P/Y92H,

T10P/Y92H/K206A/F217R/N247D, T10P/Y92H/K206A/N247D/L316D/M322I/M392T,
 T10P/Y92H/K206A/N247D/M322I/W368A, T10P/Y92H/F217R/A261G/Q302K/A337P,
 T10P/K206A/F217R/H271A, T10P/K206A/N247D, T10P/K206A/A261G/H271A/L316D,
 T10P/A261G, T10P/H271A/Q302K, T10P/Q302K, T10P/Q302K/L316D,
 T10P/Q302K/M322I/A337P, T10P/L316D/M322I, T10P/A337P/M392T, T10P/W368A,
 M39E/L44R/Y92H/R162M/N247D/Q302K/L316D/M322I, M39E/L44R/Y92H/F217R/M322I,
 M39E/L44R/Y92H/N247D/H271A/Q302K, M39E/S47T/Y92H/N247D/Q302K/L316D/M322I,
 M39E/S47T/F217R/N247D/W368A, M39E/S47T/N247D,
 M39E/Y92H/N247D/Q302K/L316D/A337P/W368A, M39E/Y92H/L316D/M322I,
 M39E/N247D/H271A, M39E/N247D/H271A/L316D, M39E/M322I,
 L44R/S47T/Y92H/K206A/F217R/L316D/M322I,
 L44R/S47T/Y92H/N247D/A261G/H271A/L316D/A337P/W368A,
 L44R/S47T/K206A/F217R/N247D/H271A/M322I, L44R/S47T/N247D/M322I/W368A,
 L44R/S47T/Q302K/L316D/M322I, L44R/Y92H/K206A/N247D/W368A, L44R/K206A/A337P,
 L44R/N247D/A261G/Q302K/L316D, L44R/N247D/A261G/Q302K/L316D/M322I,
 S47T/Y92H/N247D/H271A, S47T/F217R/Q302K, S47T/N247D, S47T/N247D/H271A,
 L89I/F217R/N247D/A261G/Q302K/L316D, Y92H/F217R/H271A, Y92H/N247D,
 Y92H/N247D/H271A/M322I, Y92H/N247D/Q302K/M322I/A337P, Y92H/H271A/A337P,
 Y92H/Q302K, Y92H/L316D, K206A/F217R/H271A/M392T,
 F217R/N247D/L316D/M322I/A337P/W368A, N247D, N247D/H271A, N247D/Q302K,
 H271A, H271A/Q302K/M322I, H271A/L316D/M322I, Q302K/M322I/W368A и W368A, где
 аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности
 пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 372.

[0124] Настоящее изобретение также относится к рекомбинантной альфа-галактозидазе А, где указанная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 374 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 10/36/92/166/247/261/316/392, 10/39, 10/39/44/47/92/206/217, 10/39/44/47/316, 10/39/44/47/337, 10/39/44/92/166/261/316/322, 10/39/44/92/166/302/322, 10/39/44/92/166/392, 10/39/44/92/217/302/322, 10/39/44/92/302/322, 10/39/44/166/261/271/316/322, 10/39/44/392, 10/39/47/92/337, 10/39/92/131/166/271/316/322, 10/39/92/166/217/247/271, 10/39/92/217/316, 10/44/47/166/261/271, 10/44/47/166/271/322/368, 10/44/47/217/271/316/322, 10/44/92, 10/44/92/217/247/271/302/316/392, 10/44/166/302, 10/44/206/316/322, 10/47/92/166/271/316/337, 10/47/92/271/302, 47/10/92/316/322/392, 10/47/166/271, 10/47/166/316, 10/92/166, 10/92/166/217/247/261/271, 10/92/166/261/271/392, 10/92/166/261/316/322/337, 10/92/166/337/368, 10/92/302/337, 10/92/316/322, 10/206, 10/206/247/261, 10/217/322, 10/261, 10/261/337/392, 10/316/392, 10/368,

39/44/47/92/166/206/392, 39/44/47/92/206/247/261, 39/44/47/92/206/392, 39/44/47/206/337/368/392, 39/44/92/166/24 7/261/302/337, 39 /44/166/271, 39/44/166/271/337/368/392, 39/47/92/316/322, 39/47/92/392, 39/47/166/217/261/392, 39/47/217/247/368, 39/47/247, 39/92/166/217/392, 39/92/261/302, 39/166/217/261/316/368, 39/322, 39/392, 44/47, 44/47/92/217/271, 44/47/92/217/316/322/392, 44/47/92/392, 44/47/166, 44/47 /166/271, 44/47/247/271/392, 44/316/322/392, 44/337, 47/166/206/217/247/337, 47/166/217/271/337, 47/206, 47/217/247/261, 47/271, 52/217/302/316, 92/166/206/271/316, 92/166/217/261/271/392, 92/166/217/316/337/392, 92/166/247, 92/166/316, 92/206/322, 92/217, 92/217/271/337, 92/261/271, 92/271, 166/217 /316/322/337, 166/247/271/316, 166/316/322 /337, 206/217, 217/392, 247/316, 316/322/368 и 316/337/392, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 374. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 374 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 10T/36M/92Y/166S/247N/261A/316L/392M, 10T/39M, 10T/39M/44L/47S/92Y/206K/217F, 10T/39M/44L/47S/316L, 10T/39M/44L/47S/337A, 10T/39M/44L/92Y/166S/261A/316L/322M, 10T/39M/44L/92Y/166S/302Q/322M, 10T/39M/44L/92Y/166S/392M, 10T/39M/44L/92Y/217F/302Q/322M, 10T/39M/44L/92Y/302Q/322M, 10T/39M/44L/166S/261A/271H/316L/322M, 10T/39M/44L/392M, 10T/39M/47S/92Y/337A, 10T/39M/92Y/131G/166S/271H/316L/322M, 10T/39M/92Y/166S/217F/247N/271H, 10T/39M/92Y/217F/316L, 10T/44L/47S/166S/261A/271H, 10T/44L/47S/166S/271H/322M/368W, 10T/44L/47S/217F/271H/316L/322M, 10T/44L/92Y, 10T/44L/92Y/217F/247N/271H/302Q/316L/392M, 10T/44L/166S/302Q, 10T/44L/206K/316L/322M, 10T/47S/92Y/166S/271H/316L/337A, 10T/47S/92Y/271H/302Q, 10T/47S/92Y/316L/322M/392M, 10T/47S/166S/271H, 10T/47S/166S/316L, 10T/92Y/166S, 10T/92Y/166S/217F/247N/261A/271H, 10T/92Y/166S/261A/271H/392M, 10T/92Y/166S/261A/316L/322M/337A, 10T/92Y/166S/337A/368W, 10T/92Y/302Q/337A, 10T/92Y/316L/322M, 10T/206K, 10T/206K/247N/261A, 10T/217F/322M, 10T/261A, 10T/261A/337A/392M, 10T/316L/392M, 10T/368W, 39M/44L/47S/92Y/166S/206K/392M, 39M/44L/47S/92Y/206K/247N/261A, 39M/44L/47S/92Y/206K/392M, 39M/44L/47S/206K/337A/368W/392M, 39M/44L/92Y/166S/247N/261A/302Q/337A, 39M/44L/166S/271H, 39M/44L/166S/271H/337A/368W/392M, 39M/47S/92Y/316L/322M, 39M/47S/92Y/392M, 39M/47S/166S/217F/261A/392M, 39M/47S/217F/247N/368W, 39M/47S/247N, 39M/92Y/166S/217F/392M, 39M/92Y/261A/302Q, 39M/166S/217F/261A/316L/368W, 39M/322M, 39M/392M, 44L/47S, 44L/47S/92Y/217F/271H, 44L/47S/92Y/217F/316L/322M/392M, 44L/47S/92Y/392M,

44L/47S/166S, 44L/47S/166S/271H, 44L/47S/247N/271H/392M, 44L/316L/322M/392M, 44L/337A, 47S/166S/206K/217F/247N/337A, 47S/166S/217F/271H/337A, 47S/206K, 47S/217F/247N/261A, 47S/271H, 52N/217F/302Q/316L, 92Y/166S/206K/271H/316L, 92Y/166S/217F/261A/271H/392M, 92Y/166S/217F/316L/337A/392M, 92Y/166S/247N, 92Y/166S/316L, 92Y/206K/322M, 92Y/217F, 92Y/217F/271H/337A, 92Y/261A/271H, 92Y/271H, 166S/217F/316L/322M/337A, 166S/247N/271H/316L, 166S/316L/322M/337A, 206K/217F, 217F/392M, 247N/316L, 316L/322M/368W и 316L/337A/392M, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 374. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 374 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из P10T/K36M/H92Y/P166S/D247N/G261A/D316L/T392M, P10T/E39M, P10T/E39M/R44L/T47S/H92Y/A206K/R217F, P10T/E39M/R44L/T47S/D316L, P10T/E39M/R44L/T47S/P337A, P10T/E39M/R44L/H92Y/P166S/G261A/D316L/I322M, P10T/E39M/R44L/H92Y/P166S/K302Q/I322M, P10T/E39M/R44L/H92Y/P166S/T392M, P10T/E39M/R44L/H92Y/R217F/K302Q/I322M, P10T/E39M/R44L/H92Y/K302Q/I322M, P10T/E39M/R44L/P166S/G261A/A271H/D316L/I322M, P10T/E39M/R44L/T392M, P10T/E39M/T47S/H92Y/P337A, P10T/E39M/H92Y/W131G/P166S/A271H/D316L/I322M, P10T/E39M/H92Y/P166S/R217F/D247N/A271H, P10T/E39M/H92Y/R217F/D316L, P10T/R44L/T47S/P166S/G261A/A271H, P10T/R44L/T47S/P166S/A271H/I322M/A368W, P10T/R44L/T47S/R217F/A271H/D316L/I322M, P10T/R44L/H92Y, P10T/R44L/H92Y/R217F/D247N/A271H/K302Q/D316L/T392M, P10T/R44L/P166S/K302Q, P10T/R44L/A206K/D316L/I322M, P10T/T47S/H92Y/P166S/A271H/D316L/P337A, P10T/T47S/H92Y/A271H/K302Q, P10T/T47S/H92Y/D316L/I322M/T392M, P10T/T47S/P166S/A271H, P10T/T47S/P166S/D316L, P10T/H92Y/P166S, P10T/H92Y/P166S/R217F/D247N/G261A/A271H, P10T/H92Y/P166S/G261A/A271H/T392M, P10T/H92Y/P166S/G261A/D316L/I322M/P337A, P10T/H92Y/P166S/P337A/A368W, P10T/H92Y/K302Q/P337A, P10T/H92Y/D316L/I322M, P10T/A206K, P10T/A206K/D247N/G261A, P10T/R217F/I322M, P10T/G261A, P10T/G261A/P337A/T392M, P10T/D316L/T392M, P10T/A368W, E39M/R44L/T47S/H92Y/P166S/A206K/T392M, E39M/R44L/T47S/H92Y/A206K/D247N/G261A, E39M/R44L/T47S/H92Y/A206K/T392M, E39M/R44L/T47S/A206K/P337A/A368W/T392M, E39M/R44L/H92Y/P166S/D247N/G261A/K302Q/P337A, E39M/R44L/P166S/A271H, E39M/R44L/P166S/A271H/P337A/A368W/T392M, E39M/T47S/H92Y/D316L/I322M, E39M/T47S/H92Y/T392M, E39M/T47S/P166S/R217F/G261A/T392M, E39M/T47S/R217F/D247N/A368W, E39M/T47S/D247N, E39M/H92Y/P166S/R217F/T392M, E39M/H92Y/G261A/K302Q, E39M/P166S/R217F/G261A/D316L/A368W, E39M/I322M,

E39M/T392M, R44L/T47S, R44L/T47S/H92Y/R217F/A271H,
 R44L/T47S/H92Y/R217F/D316L/I322M/T392M, R44L/T47S/H92Y/T392M,
 R44L/T47S/P166S, R44L/T47S/P166S/A271H, R44L/T47S/D247N/A271H/T392M,
 R44L/D316L/I322M/T392M, R44L/P337A, T47S/P166S/A206K/R217F/D247N/P337A,
 T47S/P166S/R217F/A271H/P337A, T47S/A206K, T47S/R217F/D247N/G261A, T47S/A271H,
 D52N/R217F/K302Q/D316L, H92Y/P166S/A206K/A271H/D316L,
 H92Y/P166S/R217F/G261A/A271H/T392M, H92Y/P166S/R217F/D316L/P337A/T392M,
 H92Y/P166S/D247N, H92Y/P166S/D316L, H92Y/A206K/I322M, H92Y/R217F,
 H92Y/R217F/A271H/P337A, H92Y/G261A/A271H, H92Y/A271H,
 P166S/R217F/D316L/I322M/P337A, P166S/D247N/A271H/D316L,
 P166S/D316L/I322M/P337A, A206K/R217F, R217F/T392M, D247N/D316L,
 D316L/I322M/A368W и D316L/P337A/T392M, где положения аминокислот в указанной
 полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 374.

[0125] Настоящее изобретение также относится к рекомбинантной альфа-галактозидазе А, где указанная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 704 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 2, 4, 5, 24/59, 24/143/144, 24/143/202/333, 24/143/202/352/390/391, 24/143/333/352/387/390/391, 24/143/390/391, 24/202, 24/202/271, 24/202/333/352, 24/271/352, 24/352/387/390/391, 24/387/391, 31, 40, 59, 59/143, 59/143/202, 59/143/202/271/333, 59/143/271, 59/143/333, 59/202, 59/202/333, 59/271/387/390, 73, 76, 80, 83, 84, 91/215/361, 122, 123, 143, 143/202, 143/271, 143/271/352/390, 143/333, 143/333/387/390, 143/387/391, 147, 155, 164, 165, 179, 186, 202, 202/333, 210, 215/218, 218, 218/361, 218/361/398, 218/398, 246, 254/398, 271, 271/333, 271/333/390/391, 271/333/391, 271/352/391, 273, 275, 277, 278, 280, 281, 283, 284, 287, 300, 303, 304, 325, 331, 332, 333/352, 333/390/391, 333/391, 334, 335, 336, 338, 339, 340, 341, 343, 359, 360, 361, 362, 367, 369, 371, 373, 375, 377, 382, 382/398, 385, 387/391, 390 и 398, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 704. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 704 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 2S, 4L, 5M, 5V, 24S/59A, 24S/143S/144N, 24S/143S/202N/333N, 24S/143S/202N/352N/390N/391N, 24S/143S/333N/352N/387N/390T/391N, 24S/143S/390T/391N, 24S/202N, 24S/202N/271N, 24S/202N/333N/352N, 24S/271N/352N, 24S/352N/387N/390N/391N, 24S/387N/391N, 31F, 31H, 31L, 31T, 31W, 40Q, 59A, 59A/143S,

59A/143S/271N, 59A/202N, 59T, 59T/143S/202N, 59T/143S/333N, 59T/202N/333N, 59V/143S/202N/271N/333N, 59V/271N/387N/390T, 73A, 76A, 76F, 76M, 76S, 80T, 83R, 83S, 84G, 84K, 84R, 91S/215S/361T, 122E, 122N, 122S, 123Q, 123R, 123S, 123T, 143S, 143S/202N, 143S/271N, 143S/271N/352N/390N, 143S/333N, 143S/333N/387N/390T, 143S/387N/391N, 147L, 147S, 155A, 155D, 155F, 155L, 155R, 155T, 164E, 165I, 179H, 179L, 179R, 179W, 186E, 186F, 186M, 186P, 186R, 186S, 186Y, 202N, 202N/333N, 210I, 215S/218Y, 218Y, 218Y/361T, 218Y/361T/398F, 218Y/398F, 246Y, 254T/398F, 271N, 271N/333N, 271N/333N/390N/391N, 271N/333N/391N, 271N/352N/391N, 273L, 275A, 275G, 277Q, 277V, 278N, 278R, 278S, 280G, 281I, 281M, 283L, 283P, 283T, 283V, 284A, 284E, 284G, 284L, 284M, 284R, 284S, 287R, 300F, 303A, 303C, 303W, 304T, 304V, 304W, 325A, 331M, 332G, 332H, 333N/352N, 333N/390N/391N, 333N/390S/391N, 333N/391N, 334C, 334V, 335A, 335L, 336F, 336G, 336S, 336T, 338L, 339G, 339N, 339Q, 339V, 340H, 340I, 340K, 340M, 340P, 340W, 341F, 341M, 343L, 343R, 343S, 343W, 359F, 359L, 359R, 360H, 360V, 361T, 361V, 362H, 367A, 367D, 367L, 367M, 369D, 371G, 373L, 373S, 375L, 375Q, 377Q, 382I, 382I/398F, 385R, 387N/391N, 390S и 398F, где положения аминокислот в указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 704. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 704 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из D2S, G4L, L5M, L5V, D24S/C59A, D24S/C143S/D144N, D24S/C143S/D202N/G333N, D24S/C143S/D202N/F352N/M390N/Q391N, D24S/C143S/G333N/F352N/E387N/M390T/Q391N, D24S/C143S/M390T/Q391N, D24S/D202N, D24S/D202N/A271N, D24S/D202N/G333N/F352N, D24S/A271N/F352N, D24S/F352N/E387N/M390N/Q391N, D24S/E387N/Q391N, S31F, S31H, S31L, S31T, S31W, E40Q, C59A, C59A/C143S, C59A/C143S/A271N, C59A/D202N, C59T, C59T/C143S/D202N, C59T/C143S/G333N, C59T/D202N/G333N, C59V/C143S/D202N/A271N/G333N, C59V/A271N/E387N/M390T, G73A, Q76A, Q76F, Q76M, Q76S, Q80T, P83R, P83S, H84G, H84K, H84R, N91S/T215S/R361T, D122E, D122N, D122S, I123Q, I123R, I123S, I123T, C143S, C143S/D202N, C143S/A271N, C143S/A271N/F352N/M390N, C143S/G333N, C143S/G333N/E387N/M390T, C143S/E387N/Q391N, E147L, E147S, H155A, H155D, H155F, H155L, H155R, H155T, G164E, R165I, P179H, P179L, P179R, P179W, T186E, T186F, T186M, T186P, T186R, T186S, T186Y, D202N, D202N/G333N, S210I, T215S/N218Y, N218Y, N218Y/R361T, N218Y/R361T/L398F, N218Y/L398F, W246Y, A254T/L398F, A271N, A271N/G333N, A271N/G333N/M390N/Q391N, A271N/G333N/Q391N, A271N/F352N/Q391N, S273L, Q275A, Q275G, K277Q, K277V, A278N, A278R, A278S, L280G, Q281I, Q281M, K283L, K283P, K283T, K283V, D284A, D284E, D284G, D284L, D284M, D284R, D284S, A287R, L300F, G303A, G303C, G303W, D304T, D304V, D304W,

R325A, P331M, R332G, R332H, G333N/F352N, G333N/M390N/Q391N, G333N/M390S/Q391N, G333N/Q391N, Y334C, Y334V, T335A, T335L, I336F, I336G, I336S, I336T, V338L, A339G, A339N, A339Q, A339V, S340H, S340I, S340K, S340M, S340P, S340W, L341F, L341M, K343L, K343R, K343S, K343W, V359F, V359L, V359R, K360H, K360V, R361T, R361V, K362H, E367A, E367D, E367L, E367M, T369D, R371G, R373L, R373S, H375L, H375Q, N377Q, V382I, V382I/L398F, Q385R, E387N/Q391N, M390S и L398F, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 704.

[0126] Настоящее изобретение также относится к рекомбинантной альфа-галактозидазе А, где указанная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 374 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 10, 39, 44, 47, 92, 166, 206, 217, 247, 261, 271, 302, 316, 322, 337, 368 и 392, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 374. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 374 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 10A, 10C, 10D, 10E, 10F, 10G, 10H, 10I, 10K, 10L, 10M, 10N, 10Q, 10R, 10S, 10T, 10V, 10W, 10Y, 39A, 39C, 39D, 39F, 39G, 39H, 39I, 39K, 39L, 39M, 39N, 39P, 39Q, 39R, 39S, 39T, 39V, 39W, 39Y, 44A, 44C, 44D, 44E, 44F, 44G, 44H, 44I, 44K, 44L, 44N, 44P, 44Q, 44S, 44T, 44V, 44W, 44Y, 47A, 47C, 47D, 47E, 47F, 47G, 47H, 47I, 47K, 47L, 47M, 47N, 47P, 47Q, 47R, 47S, 47V, 47W, 47Y, 92A, 92C, 92D, 92E, 92F, 92G, 92I, 92K, 92L, 92M, 92N, 92P, 92Q, 92R, 92S, 92T, 92V, 92W, 92Y, 166A, 166C, 166D, 166E, 166F, 166G, 166H, 166I, 166K, 166L, 166M, 166N, 166Q, 166R, 166S, 166T, 166V, 166W, 166Y, 206C, 206D, 206E, 206F, 206G, 206H, 206I, 206K, 206L, 206M, 206N, 206P, 206Q, 206R, 206S, 206T, 206V, 206W, 206Y, 217A, 217C, 217D, 217E, 217F, 217G, 217H, 217I, 217K, 217L, 217M, 217N, 217P, 217Q, 217S, 217T, 217V, 217W, 217Y, 247A, 247C, 247E, 247F, 247G, 247H, 247I, 247K, 247L, 247M, 247N, 247P, 247Q, 247R, 247S, 247T, 247V, 247W, 247Y, 261A, 261C, 261D, 261E, 261F, 261H, 261I, 261K, 261L, 261M, 261N, 261P, 261Q, 261R, 261S, 261T, 261V, 261W, 261Y, 271C, 271D, 271E, 271F, 271G, 271H, 271I, 271K, 271L, 271M, 271N, 271P, 271Q, 271R, 271S, 271T, 271V, 271W, 271Y, 302A, 302C, 302D, 302E, 302F, 302G, 302H, 302I, 302L, 302M, 302N, 302P, 302Q, 302R, 302S, 302T, 302V, 302W, 302Y, 316A, 316C, 316E, 316F, 316G, 316H, 316I, 316K, 316L, 316M, 316N, 316P, 316Q, 316R, 316S, 316T, 316V, 316W, 316Y, 322A, 322C, 322D, 322E, 322F, 322G, 322H, 322K, 322L, 322M, 322N, 322P, 322Q, 322R, 322S, 322T,

322V, 322W, 322Y, 337A, 337C, 337D, 337E, 337F, 337G, 337H, 337I, 337K, 337L, 337M, 337N, 337Q, 337R, 337S, 337T, 337V, 337W, 337Y, 368C, 368D, 368E, 368F, 368G, 368H, 368I, 368K, 368L, 368M, 368N, 368P, 368Q, 368R, 368S, 368T, 368V, 368W, 368Y, 392A, 392C, 392D, 392E, 392F, 392G, 392H, 392I, 392K, 392L, 392M, 392N, 392P, 392Q, 392R, 392S, 392V, 392W и 392Y, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 374. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 374 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из P10A, P10C, P10D, P10E, P10F, P10G, P10H, P10I, P10K, P10L, P10M, P10N, P10Q, P10R, P10S, P10T, P10V, P10W, P10Y, E39A, E39C, E39D, E39F, E39G, E39H, E39I, E39K, E39L, E39M, E39N, E39P, E39Q, E39R, E39S, E39T, E39V, E39W, E39Y, R44A, R44C, R44D, R44E, R44F, R44G, R44H, R44I, R44K, R44L, R44N, R44P, R44Q, R44S, R44T, R44V, R44W, R44Y, T47A, T47C, T47D, T47E, T47F, T47G, T47H, T47I, T47K, T47L, T47M, T47N, T47P, T47Q, T47R, T47S, T47V, T47W, T47Y, H92A, H92C, H92D, H92E, H92F, H92G, H92I, H92K, H92L, H92M, H92N, H92P, H92Q, H92R, H92S, H92T, H92V, H92W, H92Y, P166A, P166C, P166D, P166E, P166F, P166G, P166H, P166I, P166K, P166L, P166M, P166N, P166Q, P166R, P166S, P166T, P166V, P166W, P166Y, A206C, A206D, A206E, A206F, A206G, A206H, A206I, A206K, A206L, A206M, A206N, A206P, A206Q, A206R, A206S, A206T, A206V, A206W, A206Y, R217A, R217C, R217D, R217E, R217F, R217G, R217H, R217I, R217K, R217L, R217M, R217N, R217P, R217Q, R217S, R217T, R217V, R217W, R217Y, D247A, D247C, D247E, D247F, D247G, D247H, D247I, D247K, D247L, D247M, D247N, D247P, D247Q, D247R, D247S, D247T, D247V, D247W, D247Y, G261A, G261C, G261D, G261E, G261F, G261H, G261I, G261K, G261L, G261M, G261N, G261P, G261Q, G261R, G261S, G261T, G261V, G261W, G261Y, A271C, A271D, A271E, A271F, A271G, A271H, A271I, A271K, A271L, A271M, A271N, A271P, A271Q, A271R, A271S, A271T, A271V, A271W, A271Y, K302A, K302C, K302D, K302E, K302F, K302G, K302H, K302I, K302L, K302M, K302N, K302P, K302Q, K302R, K302S, K302T, K302V, K302W, K302Y, D316A, D316C, D316E, D316F, D316G, D316H, D316I, D316K, D316L, D316M, D316N, D316P, D316Q, D316R, D316S, D316T, D316V, D316W, D316Y, I322A, I322C, I322D, I322E, I322F, I322G, I322H, I322K, I322L, I322M, I322N, I322P, I322Q, I322R, I322S, I322T, I322V, I322W, I322Y, P337A, P337C, P337D, P337E, P337F, P337G, P337H, P337I, P337K, P337L, P337M, P337N, P337Q, P337R, P337S, P337T, P337V, P337W, P337Y, A368C, A368D, A368E, A368F, A368G, A368H, A368I, A368K, A368L, A368M, A368N, A368P, A368Q, A368R, A368S, A368T, A368V, A368W, A368Y, T392A, T392C, T392D, T392E, T392F, T392G, T392H, T392I, T392K, T392L, T392M, T392N, T392P, T392Q, T392R, T392S, T392V, T392W и T392Y, где положения аминокислот в указанной полипептидной последовательности пронумерованы

со ссылкой на SEQ ID NO: 374.

[0127] Настоящее изобретение также относится к рекомбинантной альфа-галактозидазе А, где указанная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 1022 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 10, 10/392, 31, 31/39/44/166/302, 31/47, 31/283/284, 39, 39/44, 39/44/47, 39/44 /47/261/283/284, 39/44/283, 39/44/339, 39/47/261, 39/92, 39/206, 39/284, 44, 44/284/302, 84, 84/92, 84/284/302/392, 84/316, 84/368/392, 92, 92/206/217, 92/206/275, 92/206/284, 92/206/302/368, 92/271, 92/271/277, 92/275/284, 92/283, 92/283/392, 92/284, 92/302, 92/316, 92/368, 155, 155/217, 155/368, 166, 166/283/284, 166/302, 206, 206/217, 206/334, 261, 261/283, 271, 271/368, 275, 283, 283/284, 283/392, 284, 302, 316, 334, 339, 368, 368/392 и 392, где положения аминокислот указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 1022. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 1022 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из P10G, P10G/T392D, S31T, S31T/E39V/R44V/P166D/K302Y, S31T/T47R, S31T/K283L/D284A, E39L, E39L/H92V, E39L/A206E, E39L/D284S, E39V/R44V, E39V/R44V/T47R, E39V/R44V/T47R/G261S/K283L/D284A, E39V/R44V/K283T, E39V/R44V/A339N, E39V/T47R/G261S, R44V, R44V/D284E/K302Y, H84K, H84K/H92V, H84K/D284S/K302L/T392A, H84K/D316H, H84K/A368E/T392A, H92Q, H92T, H92T/A206E/R217N, H92T/A206E/K302T/A368E, H92T/A271K, H92T/A271K/K277R, H92T/K283P, H92T/K283V/T392W, H92T/D284M, H92T/K302L, H92T/A368E, H92V, H92V/A206E/D284S, H92V/A206Y/Q275A, H92V/Q275A/D284S, H92V/D284S, H92V/K302L, H92V/D316H, H155F, H155F/R217I, H155F/A368E, P166D, P166D/K283L/D284A, P166D/K302Y, A206E, A206E/R217N, A206I, A206Q, A206T/Y334C, A206Y, G261S, G261S/K283L, A271K, A271K/A368E, Q275A, K283L, K283P/T392W, K283T, K283T/D284E, D284E, D284M, D284S, K302L, K302Y, D316H, Y334C, A339N, A368E, A368E/T392W, T392A, T392D и T392W, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 1022. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 1022 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей

мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 10G, 10G/392D, 31T, 31T/39V/44V/166D/302Y, 31T/47R, 31T/283L/284A, 39L, 39L/92V, 39L/206E, 39L/284S, 39V/44V, 39V/44V/47R, 39V/44V/47R/261S/283L/284A, 39V/44V/283T, 39V/44V/339N, 39V/47R/261S, 44V, 44V/284E/302Y, 84K, 84K/92V, 84K/284S/302L/392A, 84K/316H, 84K/368E/392A, 92Q, 92T, 92T/206E/217N, 92T/206E/302T/368E, 92T/271K, 92T/271K/277R, 92T/283P, 92T/283V/392W, 92T/284M, 92T/302L, 92T/368E, 92V, 92V/206E/284S, 92V/206Y/275A, 92V/275A/284S, 92V/284S, 92V/302L, 92V/316H, 155F, 155F/217I, 155F/368E, 166D, 166D/283L/284A, 166D/302Y, 206E, 206E/217N, 206I, 206Q, 206T/334C, 206Y, 261S, 261S/283L, 271K, 271K/368E, 275A, 283L, 283P/392W, 283T, 283T/284E, 284E, 284M, 284S, 302L, 302Y, 316H, 334C, 339N, 368E, 368E/392W, 392A, 392D и 392W, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 1022.

[0128] В некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептидная последовательность рекомбинантной альфа-галактозидазы А имеет последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательностям с четными номерами SEQ ID NO: 4-1864.

[0129] В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированный полипептид GLA содержит функциональный фрагмент сконструированного полипептида GLA, входящий в объем настоящего изобретения. Функциональные фрагменты обладают активностью, которая составляет по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% от активности сконструированного полипептида GLA, из которого он был получен (то есть, исходного сконструированного GLA). Функциональный фрагмент содержит по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% и даже 99% исходной последовательности сконструированной GLA. В некоторых вариантах осуществления изобретения, функциональный фрагмент усечен менее, чем на 5, менее, чем на 10, менее, чем на 15, менее, чем на 10, менее, чем на 25, менее, чем на 30, менее, чем на 35, менее, чем на 40, менее, чем на 45 и менее, чем на 50 аминокислот.

Полинуклеотиды, кодирующие сконструированные полипептиды; экспрессионные векторы; и клетки-хозяева:

[0130] Настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим описанные здесь сконструированные полипептиды GLA. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотиды функционально связаны с одной или более гетерологичными или гомологичными регуляторными последовательностями, которые регулируют экспрессию гена, что позволяет получить рекомбинантный полинуклеотид, способный экспрессировать полипептид. Экспрессионные конструкции, содержащие гетерологичный полинуклеотид, кодирующий сконструированные полипептиды GLA, могут быть введены в соответствующие клетки-хозяева для экспрессии соответствующего

полипептида GLA.

[0131] Как будет очевидно специалисту в данной области, доступность белковой последовательности и информация о кодонах, соответствующих различным аминокислотам, позволяет идентифицировать все полинуклеотиды, способные кодировать рассматриваемые полипептиды. Вырожденность генетического кода, когда одни и те же аминокислоты кодируются альтернативными или синонимичными кодонами, позволяет получить чрезвычайно большое количество нуклеиновых кислот, каждая из которых кодирует сконструированный полипептид GLA. Таким образом, при наличии информации о конкретной аминокислотной последовательности, специалисты в данной области могут получить любое количество различных нуклеиновых кислот путем простой модификации последовательности одного или более кодонов так, чтобы не изменить аминокислотную последовательность белка. В этом отношении, в настоящем изобретении конкретно рассматривается каждая возможная вариация полинуклеотидов, которая может быть получена, и которая кодирует полипептиды, описанные в настоящей заявке, путем выбора комбинаций на основе возможного выбора кодонов, и все такие варианты следует считать конкретно раскрытыми для любого описанного здесь полипептида, включая варианты, представленные в Таблицах 2-1, 5-1, 6-1, 7-1, 8-1, 9-1, 11-1, 12-1 и/или 13-1.

[0132] В различных вариантах осуществления изобретения, кодоны предпочтительно выбирают так, чтобы они соответствовали клетке-хозяину, в которой продуцируется белок. Так, например, предпочтительные кодоны, используемые в бактериях, используются для экспрессии в бактериях. Следовательно, оптимизированные по кодам полинуклеотиды, кодирующие сконструированные полипептиды GLA, содержат предпочтительные кодоны приблизительно в 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или более, чем в 90% положений кодонов кодирующей полноразмерной области. В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к рекомбинантным полинуклеотидным последовательностям, в которых кодоны оптимизированы для экспрессии в клетках или тканях человека.

[0133] В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к рекомбинантной полинуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере приблизительно на 85%, приблизительно на 86%, приблизительно на 87%, приблизительно на 88%, приблизительно на 89%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 1. В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к рекомбинантной полинуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 1. В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к рекомбинантной полинуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере приблизительно на 85%, приблизительно

на 86%, приблизительно на 87%, приблизительно на 88%, приблизительно на 89%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 7. В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к рекомбинантной полинуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная полинуклеотидная последовательность имеет последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательностям с нечетными номерами SEQ ID NO: 3-1863.

[0134] В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотид кодирует рекомбинантную альфа-галактозидазу А, содержащую полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 8 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 44, 44/217, 44/217/316, 44/217/322, 44/217/322/337, 44/247, 44/247/302, 44/247/302/322, 44/247/322, 44/247/337, 44/247/362, 44/302, 44/337, 44/373, 217/322, 217/373, 247/322, 247/362, 302/322/362/373, 302/337, 316, 316/337, 322, 322/337, 362/373 и 373, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотид кодирует рекомбинантную альфа-галактозидазу А, содержащую полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 8 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 44L, 44L/217F, 44L/217F/316L, 44L/217F/322M, 44L/217F/322M/337A, 44L/247N, 44L/247N/302Q, 44L/247N/302Q/322M, 44L/247N/322M, 44L/247N/337A, 44L/247N/362K, 44L/302Q, 44L/337A, 44L/373R, 217F/322M, 217F/373R, 247N/322M, 247N/362K, 302Q/322M/362K/373R, 302Q/337A, 316L, 316L/337A, 322M, 322M/337A, 362K/373R и 373R, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотид кодирует рекомбинантную альфа-галактозидазу А, содержащую полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 8, или ее функциональному фрагменту, где

указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из R44L, R44L/R217F, R44L/R217F/D316L, R44L/R217F/I322M, R44L/R217F/I322M/P337A, R44L/D247N, R44L/D247N/K302Q, R44L/D247N/K302Q/I322M, R44L/D247N/I322M, R44L/D247N/P337A, R44L/D247N/Q362K, R44L/K302Q, R44L/P337A, R44L/K373R, R217F/I322M, R217F/K373R, D247N/I322M, D247N/Q362K, K302Q/I322M/Q362K/K373R, K302Q/P337A, D316L, D316L/P337A, I322M, I322M/P337A, Q362K/K373R и K373R, где положения аминокислот в указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 8.

[0135] В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотид кодирует рекомбинантную альфа-галактозидазу А, содержащую полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 8 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 10/39/44/47/92/166/206/217/247/261/271/302/316/322/337/362/368/373/392, 44/217/316, 44/217/322/337, 166/362, 217/373 и 362/373, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотид кодирует рекомбинантную альфа-галактозидазу А, содержащую полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична SEQ ID NO: 8 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 10T/39M/44L/47S/92Y/166S/206K/217F/247N/261A/271H/302Q/316L/322M/337A/362K/368W/373R/392M, 44L/217F/316L, 44L/217F/322M/337A, 166A/362K, 217F/373R и 362K/373R, где положения аминокислот в указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотид кодирует рекомбинантную альфа-галактозидазу А, содержащую полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 8 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из P10T/E39M/R44L/T47S/H92Y/P166S/A206K/R217F/D247N/G261A/A271H/K302Q/D316L/I322M/P337A/Q362K/A368W/K373R/T392M, R44L/R217F/D316L, R44L/R217F/I322M/P337A, P166A/Q362K, R217F/K373R и Q362K/K373R, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности

пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 8.

[0136] В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к рекомбинантной полинуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере приблизительно на 85%, приблизительно на 86%, приблизительно на 87%, приблизительно на 88%, приблизительно на 89%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 57. В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к рекомбинантной полинуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 57. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотид кодирует рекомбинантную альфа-галактозидазу А, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 58 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 7, 7/48/68, 7/48/68/120/282/299, 7/48/130/282, 7/48/180, 7/68/130/282/365, 7/68/180, 7/88/120/305/365, 7/120, 7/130, 7/282, 7/305, 7/305/365, 7/365, 39, 47, 47/87/95/96/158/162, 47/95, 47/273, 47/343, 48, 48/68, 48/180/282, 48/282, 48/282/305, 67/180, 68, 68/299/300, 71, 87/91/95/96/158/162, 87/91/95/96/206/343, 87/96/155/273/343, 88, 91/95, 91/95/96, 92, 93, 96, 96/273, 96/312/343, 120, 120/299/305, 151, 158, 158/162/273, 162, 162/273, 162/343, 166, 178, 180, 181, 206, 217, 271, 273, 273/343, 282, 282/365, 293/391, 299/300, 299/300/305/365, 300, 301, 305, 305/365, 314, 333, 336, 337, 343, 345, 363, 365, 370, 389, 393, 394, 396/398, 397 и 398, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 58 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 7L, 7L/48D/68E, 7L/48D/68E/120H/282N/299R, 7L/48D/130E/282N, 7L/48D/180G, 7L/68E/130E/282N/365V, 7L/68E/180G, 7L/88A/120H/305G/365V, 7L/120H, 7L/130E, 7L/282N, 7L/305G, 7L/305G/365V, 7L/365V, 39V, 47D, 47D/87K/95E/96L/158R/162H, 47D/95E, 47D/273P, 47D/343G, 47V, 48D, 48D/68E, 48D/180G/282N, 48D/282N, 48D/282N/305G, 67T/180G, 68E, 68E/299R/300I, 71P, 87K/91Q/95E/96L/158A/162K, 87K/91Q/95E/96L/206S/343G, 87K/96I/155N/273P/343G, 88A, 91Q/95E, 91Q/95E/96L, 92F, 92T, 93I, 96L, 96L/273P, 96L/312Q/343G, 120H,

120H/299R/305G, 151L, 158A, 158A/162K/273G, 158R, 162H/343D, 162K, 162K/273P, 162S, 166K, 178G, 178S, 180G, 180L, 180T, 180V, 181A, 206K, 206S, 217K, 271R, 273P, 273P/343G, 282N, 282N/365V, 293P/391A, 299R/300I, 299R/300I/305G/365V, 300I, 301M, 305G, 305G/365V, 314A, 333F, 333G, 336V, 337R, 343D, 343G, 345A, 345Q, 363Q, 365A, 365Q, 365V, 370G, 389K, 393V, 394K, 396G/398T, 397A, 398A, 398P, 398S и 398V, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 58 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из R7L, R7L/E48D/Q68E, R7L/E48D/Q68E/Y120H/D282N/Q299R, R7L/E48D/D130E/D282N, R7L/E48D/F180G, R7L/Q68E/D130E/D282N/F365V, R7L/Q68E/F180G, R7L/Q88A/Y120H/N305G/F365V, R7L/Y120H, R7L/D130E, R7L/D282N, R7L/N305G, R7L/N305G/F365V, R7L/F365V, E39V, T47D, T47D/R87K/S95E/K96L/L158R/R162H, T47D/S95E, T47D/S273P, T47D/K343G, T47V, E48D, E48D/Q68E, E48D/F180G/D282N, E48D/D282N, E48D/D282N/N305G, P67T/F180G, Q68E, Q68E/Q299R/L300I, S71P, R87K/N91Q/S95E/K96L/L158A/R162K, R87K/N91Q/S95E/K96L/A206S/K343G, R87K/K96I/H155N/S273P/K343G, Q88A, N91Q/S95E, N91Q/S95E/K96L, H92F, H92T, V93I, K96L, K96L/S273P, K96L/P312Q/K343G, Y120H, Y120H/Q299R/N305G, D151L, L158A, L158A/R162K/S273G, L158R, R162H/K343D, R162K, R162K/S273P, R162S, P166K, W178G, W178S, F180G, F180L, F180T, F180V, Q181A, A206K, A206S, R217K, A271R, S273P, S273P/K343G, D282N, D282N/F365V, L293P/Q391A, Q299R/L300I, Q299R/L300I/N305G/F365V, L300I, R301M, N305G, N305G/F365V, S314A, S333F, S333G, I336V, P337R, K343D, K343G, V345A, V345Q, L363Q, F365A, F365Q, F365V, S370G, T389K, S393V, L394K, D396G/L398T, L397A, L398A, L398P, L398S и L398V, где положения аминокислот в указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 58.

[0137] В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к рекомбинантной полинуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере приблизительно на 85%, приблизительно на 86%, приблизительно на 87%, приблизительно на 88%, приблизительно на 89%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 157. В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к рекомбинантной полинуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 157. В некоторых

вариантах осуществления изобретения, полинуклеотид кодирует рекомбинантную альфа-галактозидазу А, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 158 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 24/202, 39/47, 39/47/217, 39/151, 39/282/337/398, 39/337/343/398, 39/393/398, 47/130, 47/151, 47/343/345/393, 48, 48/68, 48/68/217/333/391/393, 48/68/333, 48/217, 48/333, 48/345/393, 48/393, 59/143, 68, 68/345, 130, 130/158, 130/158/393, 130/345/393, 143/271, 143/333, 143/387, 151, 151/158/217/343/345/393, 151/206/282/337/343/345/398, 151/282/393, 151/345/393/398, 151/393, 158, 158/393, 202, 206, 206/217, 217, 217/333, 217/337/345/398, 271, 282/393, 333, 333/345, 337/343/345/398, 343, 343/345/393/398, 393 и 393/398, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 158. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 158 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 24S/202N, 39V/47D, 39V/47V/217K, 39V/151L, 39V/282N/337R/398A, 39V/337R/343G/398A, 39V/393V/398A, 47V/130E, 47V/151L, 47V/343D/345Q/393V, 48D, 48D/68E, 48D/68E/217K/333F/391A/393V, 48D/68E/333F, 48D/217K, 48D/333F, 48D/333G, 48D/345Q/393V, 48D/393V, 59A/143S, 68E, 68E/345Q, 130E, 130E/158R, 130E/158R/393V, 130E/345Q/393V, 143S/271N, 143S/333N, 143S/387N, 151L, 151L/158R/217K/343G/345Q/393V, 151L/206S/282N/337R/343D/345Q/398A, 151L/282N/393V, 151L/345Q/393V/398A, 151L/393V, 158R, 158R/393V, 202N, 206S, 206S/217K, 217K, 217K/333F, 217K/333G, 217K/337R/345Q/398A, 271N, 282N/393V, 333F/345Q, 333G, 333N, 337R/343G/345Q/398A, 343D, 343D/345Q/393V/398A, 393V и 393V/398A, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 158. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 8 или его функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из D24S/D202N, E39V/T47D, E39V/T47V/R217K, E39V/D151L, E39V/D282N/P337R/L398A, E39V/P337R/K343G/L398A, E39V/S393V/L398A, T47V/D130E, T47V/D151L, T47V/K343D/V345Q/S393V, E48D, E48D/Q68E, E48D/Q68E/R217K/S333F/Q391A/S393V, E48D/Q68E/S333F, E48D/R217K,

E48D/S333F, E48D/S333G, E48D/V345Q/S393V, E48D/S393V, C59A/C143S, Q68E, Q68E/V345Q, D130E, D130E/L158R, D130E/L158R/S393V, D130E/V345Q/S393V, C143S/A271N, C143S/S333N, C143S/E387N, D151L, D151L/L158R/R217K/K343G/V345Q/S393V, D151L/A206S/D282N/P337R/K343D/V345Q/L398A, D151L/D282N/S393V, D151L/V345Q/S393V/L398A, D151L/S393V, L158R, L158R/S393V, D202N, A206S, A206S/R217K, R217K, R217K/S333F, R217K/S333G, R217K/P337R/V345Q/L398A, A271N, D282N/S393V, S333F/V345Q, S333G, S333N, P337R/K343G/V345Q/L398A, K343D, K343D/V345Q/S393V/L398A, S393V и S393V/L398A, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 158.

[0138] В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к рекомбинантной полинуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере приблизительно на 85%, приблизительно на 86%, приблизительно на 87%, приблизительно на 88%, приблизительно на 89%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 371. В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к рекомбинантной полинуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 371. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотид кодирует рекомбинантную альфа-галактозидазу А, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 372 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 10, 10/39/44/322, 10/39/92/206/217/271, 10/39/92/247, 10/39/92/247/271/316, 10/44, 10/44/47/92/247, 10/44/47/261/302/322/368, 10/44/92/316/322, 10/44/261/302/316, 10/44/302/337/368, 10/47/217/247/316/392, 10/47/217/322, 10/47/271, 10/92, 10/92/206/217/247, 10/92/206/247/316/322/392, 10/92/206/247/322/368, 10/92/217/261/302/337, 10/206/217/271, 10/206/247, 10/206/261/271/316, 10/261, 10/271/302, 10/302, 10/302/316, 10/302/322/337, 10/316/322, 10/337/392, 10/368, 39/44/92/162/247/302/316/322, 39/44/92/217/322, 39/44/92/247/271/302, 39/47/92/247/302/316/322, 39/47/217/247/368, 39/47/247, 39/92/247/302/316/337/368, 39/92/316/322, 39/247/271, 39/247/271/316, 39/322, 44/47/92/206/217/316/322, 44/47/92/247/261/271/316/337/368, 44/47/206/217/247/271/322, 44/47/247/322/368, 44/47/302/316/322, 44/92/206/247/368, 44/206/337, 44/247/261/302/316, 44/247/261/302/316/322, 47/92/247/271, 47/217/302, 47/247, 47/247/271, 89/217/247/2

61/302/316, 92/217/271, 92/247, 92/247/271/322, 92/247/302/322/337, 92/271/337, 92/302, 92/316, 206/217/271/392, 217/247/316/322/337/368, 247, 247/271, 247/302, 271, 271/302/322, 271/316/322, 302/322/368 и 368, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 372. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 372 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 10P, 10P/39E/44R/322I, 10P/39E/92H/206A/217R/271A, 10P/39E/92H/247D, 10P/39E/92H/247D/271A/316D, 10P/44R, 10P/44R/47T/92H/247D, 10P/44R/47T/261G/302K/322I/368A, 10P/44R/92H/316D/322I, 10P/44R/261G/302K/316D, 10P/44R/302K/337P/368A, 10P/47T/217R/247D/316D/392T, 10P/47T/217R/322I, 10P/47T/271A, 10P/92H, 10P/92H/206A/217R/247D, 10P/92H/206A/247D/316D/322I/392T, 10P/92H/206A/247D/322I/368A, 10P/92H/217R/261G/302K/337P, 10P/206A/217R/271A, 10P/206A/247D, 10P/206A/261G/271A/316D, 10P/261G, 10P/271A/302K, 10P/302K, 10P/302K/316D, 10P/302K/322I/337P, 10P/316D/322I, 10P/337P/392T, 10P/368A, 39E/44R/92H/162M/247D/302K/316D/322I, 39E/44R/92H/217R/322I, 39E/44R/92H/247D/271A/302K, 39E/47T/92H/247D/302K/316D/322I, 39E/47T/217R/247D/368A, 39E/47T/247D, 39E/92H/247D/302K/316D/337P/368A, 39E/92H/316D/322I, 39E/247D/271A, 39E/247D/271A/316D, 39E/322I, 44R/47T/92H/206A/217R/316D/322I, 44R/47T/92H/247D/261G/271A/316D/337P/368A, 44R/47T/206A/217R/247D/271A/322I, 44R/47T/247D/322I/368A, 44R/47T/302K/316D/322I, 44R/92H/206A/247D/368A, 44R/206A/337P, 44R/247D/261G/302K/316D, 44R/247D/261G/302K/316D/322I, 47T/92H/247D/271A, 47T/217R/302K, 47T/247D, 47T/247D/271A, 89I/217R/247D/261G/302K/316D, 92H/217R/271A, 92H/247D, 92H/247D/271A/322I, 92H/247D/302K/322I/337P, 92H/271A/337P, 92H/302K, 92H/316D, 206A/217R/271A/392T, 217R/247D/316D/322I/337P/368A, 247D, 247D/271A, 247D/302K, 271A, 271A/302K/322I, 271A/316D/322I, 302K/322I/368A и 368A, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 372. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 372 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из T10P, T10P/M39E/L44R/M322I, T10P/M39E/Y92H/K206A/F217R/H271A, T10P/M39E/Y92H/N247D, T10P/M39E/Y92H/N247D/H271A/L316D, T10P/L44R, T10P/L44R/S47T/Y92H/N247D, T10P/L44R/S47T/A261G/Q302K/M322I/W368A,

T10P/L44R/Y92H/L316D/M322I, T10P/L44R/A261G/Q302K/L316D,
T10P/L44R/Q302K/A337P/W368A, T10P/S47T/F217R/N247D/L316D/M392T,
T10P/S47T/F217R/M322I, T10P/S47T/H271A, T10P/Y92H,
T10P/Y92H/K206A/F217R/N247D, T10P/Y92H/K206A/N247D/L316D/M322I/M392T,
T10P/Y92H/K206A/N247D/M322I/W368A, T10P/Y92H/F217R/A261G/Q302K/A337P,
T10P/K206A/F217R/H271A, T10P/K206A/N247D, T10P/K206A/A261G/H271A/L316D,
T10P/A261G, T10P/H271A/Q302K, T10P/Q302K, T10P/Q302K/L316D,
T10P/Q302K/M322I/A337P, T10P/L316D/M322I, T10P/A337P/M392T, T10P/W368A,
M39E/L44R/Y92H/R162M/N247D/Q302K/L316D/M322I, M39E/L44R/Y92H/F217R/M322I,
M39E/L44R/Y92H/N247D/H271A/Q302K, M39E/S47T/Y92H/N247D/Q302K/L316D/M322I,
M39E/S47T/F217R/N247D/W368A, M39E/S47T/N247D,
M39E/Y92H/N247D/Q302K/L316D/A337P/W368A, M39E/Y92H/L316D/M322I,
M39E/N247D/H271A, M39E/N247D/H271A/L316D, M39E/M322I,
L44R/S47T/Y92H/K206A/F217R/L316D/M322I,
L44R/S47T/Y92H/N247D/A261G/H271A/L316D/A337P/W368A,
L44R/S47T/K206A/F217R/N247D/H271A/M322I, L44R/S47T/N247D/M322I/W368A,
L44R/S47T/Q302K/L316D/M322I, L44R/Y92H/K206A/N247D/W368A, L44R/K206A/A337P,
L44R/N247D/A261G/Q302K/L316D, L44R/N247D/A261G/Q302K/L316D/M322I,
S47T/Y92H/N247D/H271A, S47T/F217R/Q302K, S47T/N247D, S47T/N247D/H271A,
L89I/F217R/N247D/A261G/Q302K/L316D, Y92H/F217R/H271A, Y92H/N247D,
Y92H/N247D/H271A/M322I, Y92H/N247D/Q302K/M322I/A337P, Y92H/H271A/A337P,
Y92H/Q302K, Y92H/L316D, K206A/F217R/H271A/M392T,
F217R/N247D/L316D/M322I/A337P/W368A, N247D, N247D/H271A, N247D/Q302K,
H271A, H271A/Q302K/M322I, H271A/L316D/M322I, Q302K/M322I/W368A и W368A, где
аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности
пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 372.

[0139] В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к рекомбинантной полинуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере приблизительно на 85%, приблизительно на 86%, приблизительно на 87%, приблизительно на 88%, приблизительно на 89%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 373. В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к рекомбинантной полинуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 373. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотид кодирует рекомбинантную альфа-галактозидазу А, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%,

89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 374 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 10/36/92/166/247/261/316/392, 10/39, 10/39/44/47/92/206/217, 10/39/44/47/316, 10/39/44/47/337, 10/39/44/92/166/261/316/322, 10/39/44/92/166/302/322, 10/39/44/92/166/392, 10/39/44/92/217/302/322, 10/39/44/92/302/322, 10/39/44/166/261/271/316/322, 10/39/44/392, 10/39/47/92/337, 10/39/92/131/166/271/316/322, 10/39/92/166/217/247/271, 10/39/92/217/316, 10/44/47/166/261/271, 10/44/47/166/271/322/368, 10/44/47/217/271/316/322, 10/44/92, 10/44/92/217/247/271/302/316/392, 10/44/166/302, 10/44/206/316/322, 10/47/92/166/271/316/337, 10/47/92/271/302, 47/10/92/316/322/392, 10/47/166/271, 10/47/166/316, 10/92/166, 10/92/166/217/247/261/271, 10/92/166/261/271/392, 10/92/166/261/316/322/337, 10/92/166/337/368, 10/92/302/337, 10/92/316/322, 10/206, 10/206/247/261, 10/217/322, 10/261, 10/261/337/392, 10/316/392, 10/368, 39/44/47/92/166/206/392, 39/44/47/92/206/247/261, 39/44/47/92/206/392, 39/44/47/206/337/368/392, 39/44/92/166/24 7/261/302/337, 39 /44/166/271, 39/44/166/271/337/368/392, 39/47/92/316/322, 39/47/92/392, 39/47/166/217/261/392, 39/47/217/247/368, 39/47/247, 39/92/166/217/392, 39/92/261/302, 39/166/217/261/316/368, 39/322, 39/392, 44/47, 44/47/92/217/271, 44/47/92/217/316/322/392, 44/47/92/392, 44/47/166, 44/47 /166/271, 44/47/247/271/392, 44/316/322/392, 44/337, 47/166/206/217/247/337, 47/166/217/271/337, 47/206, 47/217/247/261, 47/271, 52/217/302/316, 92/166/206/271/316, 92/166/217/261/271/392, 92/166/217/316/337/392, 92/166/247, 92/166/316, 92/206/322, 92/217, 92/217/271/337, 92/261/271, 92/271, 166/217 /316/322/337, 166/247/271/316, 166/316/322 /337, 206/217, 217/392, 247/316, 316/322/368 и 316/337/392, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 374. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 374 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 10T/36M/92Y/166S/247N/261A/316L/392M, 10T/39M, 10T/39M/44L/47S/92Y/206K/217F, 10T/39M/44L/47S/316L, 10T/39M/44L/47S/337A, 10T/39M/44L/92Y/166S/261A/316L/322M, 10T/39M/44L/92Y/166S/302Q/322M, 10T/39M/44L/92Y/166S/392M, 10T/39M/44L/92Y/217F/302Q/322M, 10T/39M/44L/92Y/302Q/322M, 10T/39M/44L/166S/261A/271H/316L/322M, 10T/39M/44L/392M, 10T/39M/47S/92Y/337A, 10T/39M/92Y/131G/166S/271H/316L/322M, 10T/39M/92Y/166S/217F/247N/271H, 10T/39M/92Y/217F/316L, 10T/44L/47S/166S/261A/271H, 10T/44L/47S/166S/271H/322M/368W, 10T/44L/47S/217F/271H/316L/322M, 10T/44L/92Y,

10T/44L/92Y/217F/247N/271H/302Q/316L/392M, 10T/44L/166S/302Q,
 10T/44L/206K/316L/322M, 10T/47S/92Y/166S/271H/316L/337A, 10T/47S/92Y/271H/302Q,
 10T/47S/92Y/316L/322M/392M, 10T/47S/166S/271H, 10T/47S/166S/316L, 10T/92Y/166S,
 10T/92Y/166S/217F/247N/261A/271H, 10T/92Y/166S/261A/271H/392M,
 10T/92Y/166S/261A/316L/322M/337A, 10T/92Y/166S/337A/368W, 10T/92Y/302Q/337A,
 10T/92Y/316L/322M, 10T/206K, 10T/206K/247N/261A, 10T/217F/322M, 10T/261A,
 10T/261A/337A/392M, 10T/316L/392M, 10T/368W, 39M/44L/47S/92Y/166S/206K/392M,
 39M/44L/47S/92Y/206K/247N/261A, 39M/44L/47S/92Y/206K/392M,
 39M/44L/47S/206K/337A/368W/392M, 39M/44L/92Y/166S/247N/261A/302Q/337A,
 39M/44L/166S/271H, 39M/44L/166S/271H/337A/368W/392M, 39M/47S/92Y/316L/322M,
 39M/47S/92Y/392M, 39M/47S/166S/217F/261A/392M, 39M/47S/217F/247N/368W,
 39M/47S/247N, 39M/92Y/166S/217F/392M, 39M/92Y/261A/302Q,
 39M/166S/217F/261A/316L/368W, 39M/322M, 39M/392M, 44L/47S,
 44L/47S/92Y/217F/271H, 44L/47S/92Y/217F/316L/322M/392M, 44L/47S/92Y/392M,
 44L/47S/166S, 44L/47S/166S/271H, 44L/47S/247N/271H/392M, 44L/316L/322M/392M,
 44L/337A, 47S/166S/206K/217F/247N/337A, 47S/166S/217F/271H/337A, 47S/206K,
 47S/217F/247N/261A, 47S/271H, 52N/217F/302Q/316L, 92Y/166S/206K/271H/316L,
 92Y/166S/217F/261A/271H/392M, 92Y/166S/217F/316L/337A/392M, 92Y/166S/247N,
 92Y/166S/316L, 92Y/206K/322M, 92Y/217F, 92Y/217F/271H/337A, 92Y/261A/271H,
 92Y/271H, 166S/217F/316L/322M/337A, 166S/247N/271H/316L, 166S/316L/322M/337A,
 206K/217F, 217F/392M, 247N/316L, 316L/322M/368W и 316L/337A/392M, где
 аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности
 пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 374. В некоторых вариантах осуществления
 изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную
 последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%,
 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ
 ID NO: 374 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-
 галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или
 более положениях, выбранных из P10T/K36M/H92Y/P166S/D247N/G261A/D316L/T392M,
 P10T/E39M, P10T/E39M/R44L/T47S/H92Y/A206K/R217F, P10T/E39M/R44L/T47S/D316L,
 P10T/E39M/R44L/T47S/P337A, P10T/E39M/R44L/H92Y/P166S/G261A/D316L/I322M,
 P10T/E39M/R44L/H92Y/P166S/K302Q/I322M, P10T/E39M/R44L/H92Y/P166S/T392M,
 P10T/E39M/R44L/H92Y/R217F/K302Q/I322M, P10T/E39M/R44L/H92Y/K302Q/I322M,
 P10T/E39M/R44L/P166S/G261A/A271H/D316L/I322M, P10T/E39M/R44L/T392M,
 P10T/E39M/T47S/H92Y/P337A, P10T/E39M/H92Y/W131G/P166S/A271H/D316L/I322M,
 P10T/E39M/H92Y/P166S/R217F/D247N/A271H, P10T/E39M/H92Y/R217F/D316L,
 P10T/R44L/T47S/P166S/G261A/A271H, P10T/R44L/T47S/P166S/A271H/I322M/A368W,
 P10T/R44L/T47S/R217F/A271H/D316L/I322M, P10T/R44L/H92Y,
 P10T/R44L/H92Y/R217F/D247N/A271H/K302Q/D316L/T392M, P10T/R44L/P166S/K302Q,
 P10T/R44L/A206K/D316L/I322M, P10T/T47S/H92Y/P166S/A271H/D316L/P337A,

P10T/T47S/H92Y/A271H/K302Q, P10T/T47S/H92Y/D316L/I322M/T392M,
 P10T/T47S/P166S/A271H, P10T/T47S/P166S/D316L, P10T/H92Y/P166S,
 P10T/H92Y/P166S/R217F/D247N/G261A/A271H, P10T/H92Y/P166S/G261A/A271H/T392M,
 P10T/H92Y/P166S/G261A/D316L/I322M/P337A, P10T/H92Y/P166S/P337A/A368W,
 P10T/H92Y/K302Q/P337A, P10T/H92Y/D316L/I322M, P10T/A206K,
 P10T/A206K/D247N/G261A, P10T/R217F/I322M, P10T/G261A, P10T/G261A/P337A/T392M,
 P10T/D316L/T392M, P10T/A368W, E39M/R44L/T47S/H92Y/P166S/A206K/T392M,
 E39M/R44L/T47S/H92Y/A206K/D247N/G261A, E39M/R44L/T47S/H92Y/A206K/T392M,
 E39M/R44L/T47S/A206K/P337A/A368W/T392M,
 E39M/R44L/H92Y/P166S/D247N/G261A/K302Q/P337A, E39M/R44L/P166S/A271H,
 E39M/R44L/P166S/A271H/P337A/A368W/T392M, E39M/T47S/H92Y/D316L/I322M,
 E39M/T47S/H92Y/T392M, E39M/T47S/P166S/R217F/G261A/T392M,
 E39M/T47S/R217F/D247N/A368W, E39M/T47S/D247N, E39M/H92Y/P166S/R217F/T392M,
 E39M/H92Y/G261A/K302Q, E39M/P166S/R217F/G261A/D316L/A368W, E39M/I322M,
 E39M/T392M, R44L/T47S, R44L/T47S/H92Y/R217F/A271H,
 R44L/T47S/H92Y/R217F/D316L/I322M/T392M, R44L/T47S/H92Y/T392M,
 R44L/T47S/P166S, R44L/T47S/P166S/A271H, R44L/T47S/D247N/A271H/T392M,
 R44L/D316L/I322M/T392M, R44L/P337A, T47S/P166S/A206K/R217F/D247N/P337A,
 T47S/P166S/R217F/A271H/P337A, T47S/A206K, T47S/R217F/D247N/G261A, T47S/A271H,
 D52N/R217F/K302Q/D316L, H92Y/P166S/A206K/A271H/D316L,
 H92Y/P166S/R217F/G261A/A271H/T392M, H92Y/P166S/R217F/D316L/P337A/T392M,
 H92Y/P166S/D247N, H92Y/P166S/D316L, H92Y/A206K/I322M, H92Y/R217F,
 H92Y/R217F/A271H/P337A, H92Y/G261A/A271H, H92Y/A271H,
 P166S/R217F/D316L/I322M/P337A, P166S/D247N/A271H/D316L,
 P166S/D316L/I322M/P337A, A206K/R217F, R217F/T392M, D247N/D316L,
 D316L/I322M/A368W, и D316L/P337A/T392M, где положения аминокислот в указанной
 полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 374.

[0140] В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотид
 кодирует рекомбинантную альфа-галактозидазу А, содержащую полипептидную
 последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%,
 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ
 ID NO: 704 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-
 галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или
 более положениях, выбранных из 2, 4, 5, 24/59, 24/143/144, 24/143/202/333,
 24/143/202/352/390/391, 24/143/333/352/387/390/391, 24/143/390/391, 24/202, 24/202/271,
 24/202/333/352, 24/271/352, 24/352/387/390/391, 24/387/391, 31, 40, 59, 59/143, 59/143/202,
 59/143/202/271/333, 59/143/271, 59/143/333, 59/202, 59/202/333, 59/271/387/390, 73, 76, 80,
 83, 84, 91/215/361, 122, 123, 143, 143/202, 143/271, 143/271/352/390, 143/333,
 143/333/387/390, 143/387/391, 147, 155, 164, 165, 179, 186, 202, 202/333, 210, 215/218, 218,
 218/361, 218/361/398, 218/398, 246, 254/398, 271, 271/333, 271/333/390/391, 271/333/391,

271/352/391, 273, 275, 277, 278, 280, 281, 283, 284, 287, 300, 303, 304, 325, 331, 332, 333/352, 333/390/391, 333/391, 334, 335, 336, 338, 339, 340, 341, 343, 359, 360, 361, 362, 367, 369, 371, 373, 375, 377, 382, 382/398, 385, 387/391, 390 и 398, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 704. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 704 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 2S, 4L, 5M, 5V, 24S/59A, 24S/143S/144N, 24S/143S/202N/333N, 24S/143S/202N/352N/390N/391N, 24S/143S/333N/352N/387N/390T/391N, 24S/143S/390T/391N, 24S/202N, 24S/202N/271N, 24S/202N/333N/352N, 24S/271N/352N, 24S/352N/387N/390N/391N, 24S/387N/391N, 31F, 31H, 31L, 31T, 31W, 40Q, 59A, 59A/143S, 59A/143S/271N, 59A/202N, 59T, 59T/143S/202N, 59T/143S/333N, 59T/202N/333N, 59V/143S/202N/271N/333N, 59V/271N/387N/390T, 73A, 76A, 76F, 76M, 76S, 80T, 83R, 83S, 84G, 84K, 84R, 91S/215S/361T, 122E, 122N, 122S, 123Q, 123R, 123S, 123T, 143S, 143S/202N, 143S/271N, 143S/271N/352N/390N, 143S/333N, 143S/333N/387N/390T, 143S/387N/391N, 147L, 147S, 155A, 155D, 155F, 155L, 155R, 155T, 164E, 165I, 179H, 179L, 179R, 179W, 186E, 186F, 186M, 186P, 186R, 186S, 186Y, 202N, 202N/333N, 210I, 215S/218Y, 218Y, 218Y/361T, 218Y/361T/398F, 218Y/398F, 246Y, 254T/398F, 271N, 271N/333N, 271N/333N/390N/391N, 271N/333N/391N, 271N/352N/391N, 273L, 275A, 275G, 277Q, 277V, 278N, 278R, 278S, 280G, 281I, 281M, 283L, 283P, 283T, 283V, 284A, 284E, 284G, 284L, 284M, 284R, 284S, 287R, 300F, 303A, 303C, 303W, 304T, 304V, 304W, 325A, 331M, 332G, 332H, 333N/352N, 333N/390N/391N, 333N/390S/391N, 333N/391N, 334C, 334V, 335A, 335L, 336F, 336G, 336S, 336T, 338L, 339G, 339N, 339Q, 339V, 340H, 340I, 340K, 340M, 340P, 340W, 341F, 341M, 343L, 343R, 343S, 343W, 359F, 359L, 359R, 360H, 360V, 361T, 361V, 362H, 367A, 367D, 367L, 367M, 369D, 371G, 373L, 373S, 375L, 375Q, 377Q, 382I, 382I/398F, 385R, 387N/391N, 390S и 398F, где положения аминокислот в указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 704. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 704 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из D2S, G4L, L5M, L5V, D24S/C59A, D24S/C143S/D144N, D24S/C143S/D202N/G333N, D24S/C143S/D202N/F352N/M390N/Q391N, D24S/C143S/G333N/F352N/E387N/M390T/Q391N, D24S/C143S/M390T/Q391N, D24S/D202N, D24S/D202N/A271N, D24S/D202N/G333N/F352N, D24S/A271N/F352N,

D24S/F352N/E387N/M390N/Q391N, D24S/E387N/Q391N, S31F, S31H, S31L, S31T, S31W, E40Q, C59A, C59A/C143S, C59A/C143S/A271N, C59A/D202N, C59T, C59T/C143S/D202N, C59T/C143S/G333N, C59T/D202N/G333N, C59V/C143S/D202N/A271N/G333N, C59V/A271N/E387N/M390T, G73A, Q76A, Q76F, Q76M, Q76S, Q80T, P83R, P83S, H84G, H84K, H84R, N91S/T215S/R361T, D122E, D122N, D122S, I123Q, I123R, I123S, I123T, C143S, C143S/D202N, C143S/A271N, C143S/A271N/F352N/M390N, C143S/G333N, C143S/G333N/E387N/M390T, C143S/E387N/Q391N, E147L, E147S, H155A, H155D, H155F, H155L, H155R, H155T, G164E, R165I, P179H, P179L, P179R, P179W, T186E, T186F, T186M, T186P, T186R, T186S, T186Y, D202N, D202N/G333N, S210I, T215S/N218Y, N218Y, N218Y/R361T, N218Y/R361T/L398F, N218Y/L398F, W246Y, A254T/L398F, A271N, A271N/G333N, A271N/G333N/M390N/Q391N, A271N/G333N/Q391N, A271N/F352N/Q391N, S273L, Q275A, Q275G, K277Q, K277V, A278N, A278R, A278S, L280G, Q281I, Q281M, K283L, K283P, K283T, K283V, D284A, D284E, D284G, D284L, D284M, D284R, D284S, A287R, L300F, G303A, G303C, G303W, D304T, D304V, D304W, R325A, P331M, R332G, R332H, G333N/F352N, G333N/M390N/Q391N, G333N/M390S/Q391N, G333N/Q391N, Y334C, Y334V, T335A, T335L, I336F, I336G, I336S, I336T, V338L, A339G, A339N, A339Q, A339V, S340H, S340I, S340K, S340M, S340P, S340W, L341F, L341M, K343L, K343R, K343S, K343W, V359F, V359L, V359R, K360H, K360V, R361T, R361V, K362H, E367A, E367D, E367L, E367M, T369D, R371G, R373L, R373S, H375L, H375Q, N377Q, V382I, V382I/L398F, Q385R, E387N/Q391N, M390S и L398F, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 704.

[0141] В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотид кодирует рекомбинантную альфа-галактозидазу А, содержащую полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 374 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 10, 39, 44, 47, 92, 166, 206, 217, 247, 261, 271, 302, 316, 322, 337, 368 и 392, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 374. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 374 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 10A, 10C, 10D, 10E, 10F, 10G, 10H, 10I, 10K, 10L, 10M, 10N, 10Q, 10R, 10S, 10T, 10V, 10W, 10Y, 39A, 39C, 39D, 39F, 39G, 39H, 39I, 39K, 39L, 39M, 39N, 39P, 39Q, 39R, 39S, 39T, 39V, 39W, 39Y, 44A, 44C, 44D, 44E, 44F, 44G, 44H, 44I, 44K, 44L, 44N, 44P, 44Q, 44S, 44T, 44V, 44W, 44Y, 47A, 47C, 47D, 47E,

47F, 47G, 47H, 47I, 47K, 47L, 47M, 47N, 47P, 47Q, 47R, 47S, 47V, 47W, 47Y, 92A, 92C, 92D, 92E, 92F, 92G, 92I, 92K, 92L, 92M, 92N, 92P, 92Q, 92R, 92S, 92T, 92V, 92W, 92Y, 166A, 166C, 166D, 166E, 166F, 166G, 166H, 166I, 166K, 166L, 166M, 166N, 166Q, 166R, 166S, 166T, 166V, 166W, 166Y, 206C, 206D, 206E, 206F, 206G, 206H, 206I, 206K, 206L, 206M, 206N, 206P, 206Q, 206R, 206S, 206T, 206V, 206W, 206Y, 217A, 217C, 217D, 217E, 217F, 217G, 217H, 217I, 217K, 217L, 217M, 217N, 217P, 217Q, 217S, 217T, 217V, 217W, 217Y, 247A, 247C, 247E, 247F, 247G, 247H, 247I, 247K, 247L, 247M, 247N, 247P, 247Q, 247R, 247S, 247T, 247V, 247W, 247Y, 261A, 261C, 261D, 261E, 261F, 261H, 261I, 261K, 261L, 261M, 261N, 261P, 261Q, 261R, 261S, 261T, 261V, 261W, 261Y, 271C, 271D, 271E, 271F, 271G, 271H, 271I, 271K, 271L, 271M, 271N, 271P, 271Q, 271R, 271S, 271T, 271V, 271W, 271Y, 302A, 302C, 302D, 302E, 302F, 302G, 302H, 302I, 302L, 302M, 302N, 302P, 302Q, 302R, 302S, 302T, 302V, 302W, 302Y, 316A, 316C, 316E, 316F, 316G, 316H, 316I, 316K, 316L, 316M, 316N, 316P, 316Q, 316R, 316S, 316T, 316V, 316W, 316Y, 322A, 322C, 322D, 322E, 322F, 322G, 322H, 322K, 322L, 322M, 322N, 322P, 322Q, 322R, 322S, 322T, 322V, 322W, 322Y, 337A, 337C, 337D, 337E, 337F, 337G, 337H, 337I, 337K, 337L, 337M, 337N, 337Q, 337R, 337S, 337T, 337V, 337W, 337Y, 368C, 368D, 368E, 368F, 368G, 368H, 368I, 368K, 368L, 368M, 368N, 368P, 368Q, 368R, 368S, 368T, 368V, 368W, 368Y, 392A, 392C, 392D, 392E, 392F, 392G, 392H, 392I, 392K, 392L, 392M, 392N, 392P, 392Q, 392R, 392S, 392V, 392W и 392Y, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 374. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 374 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из P10A, P10C, P10D, P10E, P10F, P10G, P10H, P10I, P10K, P10L, P10M, P10N, P10Q, P10R, P10S, P10T, P10V, P10W, P10Y, E39A, E39C, E39D, E39F, E39G, E39H, E39I, E39K, E39L, E39M, E39N, E39P, E39Q, E39R, E39S, E39T, E39V, E39W, E39Y, R44A, R44C, R44D, R44E, R44F, R44G, R44H, R44I, R44K, R44L, R44N, R44P, R44Q, R44S, R44T, R44V, R44W, R44Y, T47A, T47C, T47D, T47E, T47F, T47G, T47H, T47I, T47K, T47L, T47M, T47N, T47P, T47Q, T47R, T47S, T47V, T47W, T47Y, H92A, H92C, H92D, H92E, H92F, H92G, H92I, H92K, H92L, H92M, H92N, H92P, H92Q, H92R, H92S, H92T, H92V, H92W, H92Y, P166A, P166C, P166D, P166E, P166F, P166G, P166H, P166I, P166K, P166L, P166M, P166N, P166Q, P166R, P166S, P166T, P166V, P166W, P166Y, A206C, A206D, A206E, A206F, A206G, A206H, A206I, A206K, A206L, A206M, A206N, A206P, A206Q, A206R, A206S, A206T, A206V, A206W, A206Y, R217A, R217C, R217D, R217E, R217F, R217G, R217H, R217I, R217K, R217L, R217M, R217N, R217P, R217Q, R217S, R217T, R217V, R217W, R217Y, D247A, D247C, D247E, D247F, D247G, D247H, D247I, D247K, D247L, D247M, D247N, D247P, D247Q, D247R, D247S, D247T, D247V, D247W, D247Y, G261A, G261C, G261D, G261E, G261F, G261H, G261I,

G261K, G261L, G261M, G261N, G261P, G261Q, G261R, G261S, G261T, G261V, G261W, G261Y, A271C, A271D, A271E, A271F, A271G, A271H, A271I, A271K, A271L, A271M, A271N, A271P, A271Q, A271R, A271S, A271T, A271V, A271W, A271Y, K302A, K302C, K302D, K302E, K302F, K302G, K302H, K302I, K302L, K302M, K302N, K302P, K302Q, K302R, K302S, K302T, K302V, K302W, K302Y, D316A, D316C, D316E, D316F, D316G, D316H, D316I, D316K, D316L, D316M, D316N, D316P, D316Q, D316R, D316S, D316T, D316V, D316W, D316Y, I322A, I322C, I322D, I322E, I322F, I322G, I322H, I322K, I322L, I322M, I322N, I322P, I322Q, I322R, I322S, I322T, I322V, I322W, I322Y, P337A, P337C, P337D, P337E, P337F, P337G, P337H, P337I, P337K, P337L, P337M, P337N, P337Q, P337R, P337S, P337T, P337V, P337W, P337Y, A368C, A368D, A368E, A368F, A368G, A368H, A368I, A368K, A368L, A368M, A368N, A368P, A368Q, A368R, A368S, A368T, A368V, A368W, A368Y, T392A, T392C, T392D, T392E, T392F, T392G, T392H, T392I, T392K, T392L, T392M, T392N, T392P, T392Q, T392R, T392S, T392V, T392W и T392Y, где положения аминокислот в указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 374.

[0142] В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотид кодирует рекомбинантную альфа-галактозидазу А, содержащую полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 1022 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 10, 10/392, 31, 31/39/44/166/302, 31/47, 31/283/284, 39, 39/44, 39/44/47, 39/44 /47/261/283/284, 39/44/283, 39/44/339, 39/47/261, 39/92, 39/206, 39/284, 44, 44/284/302, 84, 84/92, 84/284/302/392, 84/316, 84/368/392, 92, 92/206/217, 92/206/275, 92/206/284, 92/206/302/368, 92/271, 92/271/277, 92/275/284, 92/283, 92/283/392, 92/284, 92/302, 92/316, 92/368, 155, 155/217, 155/368, 166, 166/283/284, 166/302, 206, 206/217, 206/334, 261, 261/283, 271, 271/368, 275, 283, 283/284, 283/392, 284, 302, 316, 334, 339, 368, 368/392 и 392, где положения аминокислот указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 1022. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 1022 или ее функциональному фрагменту, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из P10G, P10G/T392D, S31T, S31T/E39V/R44V/P166D/K302Y, S31T/T47R, S31T/K283L/D284A, E39L, E39L/H92V, E39L/A206E, E39L/D284S, E39V/R44V, E39V/R44V/T47R, E39V/R44V/T47R/G261S/K283L/D284A, E39V/R44V/K283T, E39V/R44V/A339N, E39V/T47R/G261S, R44V, R44V/D284E/K302Y, H84K, H84K/H92V, H84K/D284S/K302L/T392A, H84K/D316H, H84K/A368E/T392A, H92Q, H92T,

H92T/A206E/R217N, H92T/A206E/K302T/A368E, H92T/A271K, H92T/A271K/K277R, H92T/K283P, H92T/K283V/T392W, H92T/D284M, H92T/K302L, H92T/A368E, H92V, H92V/A206E/D284S, H92V/A206Y/Q275A, H92V/Q275A/D284S, H92V/D284S, H92V/K302L, H92V/D316H, H155F, H155F/R217I, H155F/A368E, P166D, P166D/K283L/D284A, P166D/K302Y, A206E, A206E/R217N, A206I, A206Q, A206T/Y334C, A206Y, G261S, G261S/K283L, A271K, A271K/A368E, Q275A, K283L, K283P/T392W, K283T, K283T/D284E, D284E, D284M, D284S, K302L, K302Y, D316H, Y334C, A339N, A368E, A368E/T392W, T392A, T392D и T392W, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 1022. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 1022 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 10G, 10G/392D, 31T, 31T/39V/44V/166D/302Y, 31T/47R, 31T/283L/284A, 39L, 39L/92V, 39L/206E, 39L/284S, 39V/44V, 39V/44V/47R, 39V/44V/47R/261S/283L/284A, 39V/44V/283T, 39V/44V/339N, 39V/47R/261S, 44V, 44V/284E/302Y, 84K, 84K/92V, 84K/284S/302L/392A, 84K/316H, 84K/368E/392A, 92Q, 92T, 92T/206E/217N, 92T/206E/302T/368E, 92T/271K, 92T/271K/277R, 92T/283P, 92T/283V/392W, 92T/284M, 92T/302L, 92T/368E, 92V, 92V/206E/284S, 92V/206Y/275A, 92V/275A/284S, 92V/284S, 92V/302L, 92V/316H, 155F, 155F/217I, 155F/368E, 166D, 166D/283L/284A, 166D/302Y, 206E, 206E/217N, 206I, 206Q, 206T/334C, 206Y, 261S, 261S/283L, 271K, 271K/368E, 275A, 283L, 283P/392W, 283T, 283T/284E, 284E, 284M, 284S, 302L, 302Y, 316H, 334C, 339N, 368E, 368E/392W, 392A, 392D и 392W, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 1022.

[0143] В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных выше, полинуклеотид кодирует сконструированный полипептид, обладающий активностью GLA со свойствами, раскрытыми в настоящей заявке, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична эталонной последовательности (например, SEQ ID NO: 2, 8, 58, 158, 372, 374, 704 и 1022), или аминокислотную последовательность любого варианта, раскрытого в любой из таблиц, представленных в настоящей заявке, и имеет одно или более различий остатков по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 8, или аминокислотную последовательность любого варианта, раскрытого в Таблицах 2-1, 5-1, 6-1, 7-1, 8-1, 9-1, 11-1, 12-1 и/или 13-1 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более положений аминокислотных остатков). В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотид кодирует сконструированный полипептид, обладающий активностью GLA со свойствами, раскрытыми в настоящей заявке, где полипептид содержит

аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична эталонной последовательности SEQ ID NO: 2, 8, 58, 158, 372, 374, 704 и/или 1022, и имеет одно или более отличий остатков по сравнению с SEQ ID NO: 2, 8, 58, 158, 372, 374, 704 и/или 1022, в положениях остатков, выбранных из положений, представленных в Таблицах 2-1, 5-1, 6-1, 7-1, 8-1, 9-1, 11-1, 12-1 и/или 13-1, если они оптимально выровнены с полипептидом SEQ ID NO: 8, 58, 158, 372, 374, 704 и/или 1022.

[0144] В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотид, кодирующий сконструированные полипептиды GLA, содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8, 58, 158, 372, 374, 704 и/или 1022. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотиды способны гибридизоваться в условиях очень высокой жесткости с эталонной полинуклеотидной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эталонная последовательность выбрана из SEQ ID NO: 1, 7, 57, 157, 275, 371, 373 и/или 1019 или ее комплементарной последовательности, или полинуклеотидной последовательности, кодирующей любой из представленных здесь вариантов полипептидов GLA. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотид, способный к гибридизации в очень жестких условиях, кодирует полипептид GLA, содержащий аминокислотную последовательность, которая имеет один или более остатков, отличающихся от остатков SEQ ID NO: 2, 8, 58, 158, 372, 374, 704, и/или 1022, в положениях остатков, выбранных из любых положений, указанных в Таблицах 2-1, 5-1, 6-1, 7-1, 8-1, 9-1, 11-1, 12-1 и /или 13-1.

[0145] В некоторых вариантах осуществления изобретения, выделенный полинуклеотид, кодирующий любой из сконструированных полипептидов GLA, представленных в настоящей заявке, модифицируют различными способами для обеспечения экспрессии полипептида. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, представлены в виде экспрессионных векторов, где присутствуют одна или более регуляторных последовательностей для регуляции экспрессии полинуклеотидов и/или полипептидов. Манипуляции с выделенным полинуклеотидом перед его встраиванием в вектор могут быть желательны или необходимы в зависимости от экспрессионного вектора. Методы модификации полинуклеотидов и последовательностей нуклеиновых кислот с применением методов рекомбинантных ДНК хорошо известны специалистам в данной области.

[0146] В некоторых вариантах осуществления изобретения, регуляторные последовательности включают, среди прочих других последовательностей, промоторы, последовательность Козака, лидерные последовательности, последовательности полиаденилирования, последовательности пропептидов, последовательности сигнальных пептидов, регуляторные элементы на основе ДНК для осуществления генотерапии и терминаторы транскрипции. Как известно специалистам в данной области, подходящие промоторы могут быть выбраны на основе используемых клеток-хозяев.

Репрезентативными промоторами для клеток-хозяев нитчатых грибов являются промоторы, полученные из генов амилазы ТАКА *Aspergillus oryzae*, аспарагин-протеиназы *Rhizomucor miehei*, нейтральной альфа-амилазы *Aspergillus niger*, кислотоустойчивой альфа-амилазы *Aspergillus niger*, глюкоамилазы *Aspergillus niger* или *Aspergillus awamori* (*glaA*), липазы *Rhizomucor miehei*, щелочной протеазы *Aspergillus oryzae*, триозофосфатизомеразы *Aspergillus oryzae*, ацетамидазы *Aspergillus nidulans* и трипсиноподобной протеазы *Fusarium oxysporum* (см., например, WO 96/00787), а также промотор NA2-*trp* (гибрид промоторов из генов нейтральной альфа-амилазы *Aspergillus niger* и триозофосфатизомеразы *Aspergillus oryzae*), а также их мутантные, усеченные и гибридные промоторы. Примерами промоторов дрожжевых клеток могут быть промоторы, происходящие от генов энолазы *Saccharomyces cerevisiae* (*ENO-1*), галактокиназы *Saccharomyces cerevisiae* (*GAL1*), алкогольдегидрогеназы/глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *Saccharomyces cerevisiae* (*ADH2/GAP*) и 3-фосфоглицераткиназы *Saccharomyces cerevisiae*. Другие подходящие промоторы для дрожжевых клеток-хозяев известны специалистам в данной области (см., например, Romanos et al., Yeast 8:423-488 [1992]). Типичные промоторы для использования в клетках млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, промоторы цитомегаловируса (CMV), промотор куриного β -актина, слитый с энхансером CMV, обезьяний вакуолизирующий вирус 40 (SV40), промотор фосфоглицераткиназы *Homo sapiens*, промотор бета-актина, фактора элонгации-1a или глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, или промотор β -актина *Gallus gallus*.

[0147] В некоторых вариантах осуществления изобретения, регуляторная последовательность представляет собой подходящую последовательность терминации транскрипции, последовательность, распознаваемую клеткой-хозяином для терминации транскрипции. Последовательность терминатора функционально связана с 3'-концом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. Любой терминатор, функционирующий в выбранной клетке-хозяине, находит свое применение в настоящем изобретении. Так, например, типичные терминаторы транскрипции для клеток-хозяев нитчатых грибов могут быть получены из генов амилазы ТАКА *Aspergillus oryzae*, глюкоамилазы *Aspergillus niger*, антранилатсинтазы *Aspergillus nidulans*, альфа-глюкозидазы *Aspergillus niger* и трипсиноподобной протеазы *Fusarium oxysporum*. Типичные терминаторы для дрожжевых клеток-хозяев могут быть получены из генов энолазы *Saccharomyces cerevisiae*, цитохрома C (*CYC1*) *Saccharomyces cerevisiae* и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *Saccharomyces cerevisiae*. Другие подходящие терминаторы для дрожжевых клеток-хозяев известны специалистам в данной области (см., например, Romanos et al., см. выше). Типичными терминаторами клеток млекопитающих являются, но не ограничиваются ими, терминаторы цитомегаловируса (CMV), вакуолизирующего вируса обезьян 40 (SV40), гормона роста hGH *Homo sapiens*, бычьего гормона роста BGH и человеческого или кроличьего бета-глобулина.

[0148] В некоторых вариантах осуществления изобретения, регуляторная последовательность представляет собой подходящую лидерную последовательность,

модификацию 5'-кэпа, 5'-UTR и т.п. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эти элементы регуляторной последовательности опосредуют связывание с молекулами, участвующими в доставке и трансляции мРНК, ингибируют 5'-экзонуклеолитическое разложение и сообщают устойчивость к декэпированию. Лидерная последовательность функционально связана с 5'-концом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. При этом, может быть использована любая лидерная последовательность, которая является функциональной в выбранной клетке-хозяине. Примерами лидерных последовательностей для клеток-хозяев нитчатых грибов являются лидерные последовательности генов амилазы ТАКА *Aspergillus oryzae* и триозофосфатизомеразы *Aspergillus nidulans*. Подходящими лидерными последовательностями для дрожжевых клеток-хозяев являются, но не ограничиваются ими, последовательности, происходящие от генов энолазы *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), 3-фосфоглицераткиназы *Saccharomyces cerevisiae*, альфа-фактора *Saccharomyces cerevisiae* и алкогольдегидрогеназы/глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP). Подходящими лидерными последовательностями для клеток-хозяев млекопитающих являются, но не ограничиваются ими, элемент 5'-UTR, присутствующий в мРНК ортопоксвируса.

[0149] В некоторых вариантах осуществления изобретения, регуляторная последовательность содержит 3'-нетранслируемую область нуклеиновой кислоты и последовательность нуклеиновой кислоты полиаденилированного хвоста, последовательности, функционально связанные с 3'-концом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, которые опосредуют связывание с белками, участвующими в транспорте и трансляции мРНК, и определяют время полужизни мРНК. Любая последовательность полиаденилирования и 3'-UTR, которые являются функциональными в выбранной клетке-хозяине, могут быть использованы в настоящем изобретении. Репрезентативными последовательностями полиаденилирования для клеток-хозяев нитчатых грибов являются, но не ограничиваются ими, последовательности генов амилазы *Aspergillus oryzae* ТАКА, глюкоамилазы *Aspergillus niger*, антранилатсинтазы *Aspergillus nidulans*, трипсиноподобной протеазы *Fusarium oxysporum* и альфа-глюкозидазы *Aspergillus niger*. Подходящие последовательности полиаденилирования для дрожжевых клеток-хозяев также известны специалистам в данной области (см., например, Guo and Sherman, Mol. Cell. Biol., 15:5983-5990 [1995]). Подходящие последовательности полиаденилирования и 3'-UTR для клеток-хозяев млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, 3'-UTR мРНК α - и β -глобина, которые содержат несколько элементов последовательности, повышающих стабильность и трансляцию мРНК.

[0150] В некоторых вариантах осуществления изобретения, регуляторная последовательность представляет собой область, кодирующую сигнальный пептид, которая кодирует аминокислотную последовательность, связанную с амино-концом полипептида, и направляет кодируемый полипептид по секреторному пути клетки. 5'-конец кодирующей последовательности нуклеиновой кислоты может по своей природе

содержать область, кодирующую сигнальный пептид, которая в природе связана в трансляционной рамке считывания с сегментом кодирующей области, который кодирует секретрируемый полипептид. Альтернативно, 5'-конец кодирующей последовательности может содержать область, кодирующую сигнальный пептид, которая является чужеродной для кодирующей последовательности. Любая область, кодирующая сигнальный пептид, которая направляет экспрессируемый полипептид на секреторный путь выбранной клетки-хозяина, находит свое применение для экспрессии сконструированных полипептидов GLA, описанных в настоящей заявке. Области, кодирующие эффективные сигнальные пептиды для клеток-хозяев нитчатых грибов, включают, но не ограничиваются ими, области, кодирующие сигнальные пептиды, полученные из генов амилазы TAKA *Aspergillus oryzae*, нейтральной амилазы *Aspergillus niger*, глюкоамилазы *Aspergillus niger*, аспарагин-протеиназы *Rhizomucor miehei*, целлюлазы *Humicola insolens* и липазы *Humicola lanuginosa*. Подходящими сигнальными пептидами для дрожжевых клеток-хозяев являются, но не ограничиваются ими, пептиды, происходящие от генов альфа-фактора *Saccharomyces cerevisiae* и инвертазы *Saccharomyces cerevisiae*. Подходящими сигнальными пептидами для клеток-хозяев млекопитающих являются, но не ограничиваются ими, пептиды генов иммуноглобулина гамма (IgG).

[0151] В некоторых вариантах осуществления изобретения, регуляторная последовательность представляет собой область, кодирующую пропептид, которая кодирует аминокислотную последовательность, расположенную на аминоконце полипептида. Полученный полипептид, в некоторых случаях, называют «проферментом», «прополипептидом» или «зимогеном». Пропептид может быть превращен в зрелый активный полипептид путем каталитического или автокаталитического отщепления пропептида от прополипептида.

[0152] В другом своем аспекте, настоящее изобретение также относится к рекомбинантному экспрессионному вектору, содержащему полинуклеотид, кодирующий сконструированный полипептид GLA, и одну или более областей, регулирующих экспрессию, таких как промотор и терминатор, ориджин репликации и т.п., в зависимости от типа хозяев, в которые они должны быть введены. В некоторых вариантах осуществления изобретения, различные последовательности нуклеиновой кислоты и регуляторные последовательности, описанные выше, объединяют вместе для получения рекомбинантного экспрессионного вектора, который включает один или более удобных рестрикционных сайтов для обеспечения встраивания или замены последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вариант полипептида GLA, в таких сайтах. Альтернативно, полинуклеотидная(ые) последовательность(и) согласно изобретению экспрессируется(ются) посредством встраивания полинуклеотидной последовательности или конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей полинуклеотидную последовательность, в подходящий вектор для экспрессии. При создании экспрессионного вектора, кодирующую последовательность помещают в вектор таким образом, чтобы

кодирующая последовательность была функционально связана с соответствующими регуляторными последовательностями для экспрессии.

[0153] Рекомбинантный экспрессионный вектор может представлять собой любой вектор (например, плазмиду или вирус, включая, но не ограничиваясь ими, аденовирус (AV), аденоассоциированный вирус (AAV), лентивирус (LV) и невирусные векторы, такие как липосомы), который может быть легко подвергнут модификации методами рекомбинантных ДНК, что будет приводить к экспрессии модифицированной полинуклеотидной последовательности GLA. Выбор вектора обычно будет зависеть от совместимости вектора с клеткой-хозяином, в которую должен быть введен вектор. Векторы могут представлять собой линейные или замкнутые кольцевые плазмиды.

[0154] В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессионный вектор представляет собой автономно реплицирующийся вектор (то есть, вектор который существует как внехромосомный элемент, репликация которого не зависит от хромосомной репликации, такой как плазида, внехромосомный элемент, минихромосома или искусственная хромосома). Вектор может содержать любые элементы для обеспечения саморепликации. В некоторых альтернативных вариантах осуществления изобретения, вектор может представлять собой вектор, который при введении в клетку-хозяина интегрируется в геном и реплицируется вместе с хромосомой(ами), в которую(ые) он был интегрирован. Кроме того, могут быть использованы один вектор или плазида или два или более векторов или плазмид, которые вместе содержат полноразмерную ДНК для введения в геном клетки-хозяина, или транспозон.

[0155] В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессионный вектор предпочтительно содержит один или более селективных маркеров, которые обеспечивают легкий отбор трансформированных клеток. «Селективный маркер» представляет собой ген, продукт которого обеспечивает устойчивость к биоцидам или вирусам, устойчивость к тяжелым металлам, прототрофность к ауксотрофам и т.п. Подходящими маркерами для дрожжевых клеток-хозяев являются, но не ограничиваются ими, ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 и URA3. Селективными маркерами для использования в клетке-хозяине нитчатых грибов являются, но не ограничиваются ими, amdS (ацетамидаза), argB (орнитинкарбамоилтрансфераза), bar (фосфинотрицинацетилтрансфераза), hph (гигромицинфосфотрансфераза), niaD (нитратредуктаза), pyrG (оротидин-5'-фосфатдекарбоксилаза), sC (сульфатаденилтрансфераза) и trpC (антранилатсинтаза), а также их эквиваленты. В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один сконструированный полипептид GLA согласно изобретению, то есть, полинуклеотид, функционально связанный с одной или более регуляторными последовательностями для экспрессии сконструированного(ых) фермента(ов) GLA в клетке-хозяине. Клетки-хозяева для их использования в целях экспрессии полипептидов, кодируемых экспрессионными векторами согласно изобретению, хорошо известны специалистам в данной области, и такими клетками являются, но не ограничиваются ими, клетки грибов, такие как

дрожжевые клетки (например, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris* [например, ATCC, № доступа 201178]); клетки насекомых (например, клетки *Drosophila* S2 и *Spodoptera* Sf9), клетки растений, клетки животных (например, CHO, CHO-K1, COS и ВНК) и клетки человека (например, HEK293T, человеческие фибробласты, THP-1, Jurkat и линии клеток меланомы Боуэса).

[0156] Соответственно, в другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способам получения сконструированных полипептидов GLA, где указанные способы включают культивирование клетки-хозяина, способной экспрессировать полинуклеотид, кодирующий сконструированный полипептид GLA, в условиях, подходящих для экспрессии полипептида. В некоторых вариантах осуществления изобретения, такие способы дополнительно включают стадии выделения и/или очистки полипептидов GLA, как описано в настоящей заявке.

[0157] Подходящие культуральные среды и условия культивирования для вышеописанных клеток-хозяев хорошо известны специалистам в данной области. Полинуклеотиды для экспрессии полипептидов GLA могут быть введены в клетки различными способами, известными специалистам в данной области. Эти методы включают, среди прочих, электропорацию, бомбардировку биобаллистическими частицами, трансфекцию, опосредованную липосомами, трансфекцию хлоридом кальция и слияние протопластов.

[0158] Сконструированная GLA со свойствами, описанными в настоящей заявке, может быть получена путем мутагенеза полинуклеотида, кодирующего природный или сконструированный полипептид GLA, и/или методами направленной эволюции, известными специалистам в данной области и описанными в настоящей заявке. Типичным методом направленной эволюции является мутагенез и/или перестановка ДНК (см., например, Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751 [1994]; WO 95/22625; WO 97/0078; WO 97/35966; WO 98/27230; WO 00/42651; WO 01/75767 и патент США 6537746). Другие методы направленной эволюции, которые могут быть применены, включают, среди прочих, метод ступенчатого удлинения (StEP), рекомбинацию *in vitro* (см., например, Zhao et al., Nat. Biotechnol., 16:258-261 [1998]), мутагенную ПЦР (см., например, Caldwell et al., PCR Methods Appl., 3:S136-S140 [1994]) и кластерный мутагенез (см., например, Black et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:3525-3529 [1996]).

[0159] Так, например, методы мутагенеза и направленной эволюции могут быть легко применены к полинуклеотидам для создания библиотек вариантов, которые могут быть экспрессированы, подвергнуты скринингу и анализу. Методы мутагенеза и направленной эволюции хорошо известны специалистам (см. например, патенты США Nos. 5605793, 5811238, 5830721, 5834252 5837458, 5928905, 6096548, 6117679, 6132970, 6165793, 6180406, 6251674, 6277638, 6287861, 6287862, 6291242, 6297053, 6303344, 6309883, 6319713, 6319714, 6323030, 6326204, 6335160, 6335198, 6344356, 6352859, 6355484, 6358740, 6358742, 6365377, 6365408, 6368861, 6372497, 6376246, 6379964, 6387702, 6391552, 6391640, 6395547, 6406855, 6406910, 6413745, 6413774, 6420175,

6423542, 6426224, 6436675, 6444468, 6455253, 6479652, 6482647, 6489146, 6506602, 6506603, 6519065, 6521453, 6528311, 6537746, 6573098, 6576467, 6579678, 6586182, 6602986, 6613514, 6653072, 6716631, 6946296, 6961664, 6995017, 7024312, 7058515, 7105297, 7148054, 7288375, 7421347, 7430477, 7534564, 7620500, 7620502, 7629170, 7702464, 7747391, 7747393, 7751986, 7776598, 7783428, 7795030, 7853410, 7868138, 7873499, 7904249, 7957912, 8383346, 8504498, 8849575, 8876066, 8768871, 9593326 и все родственные аналогичные патенты, не являющиеся патентами США; Ling et al., *Anal. Biochem.*, 254(2):157-78 [1997]; Dale et al., *Meth. Mol. Biol.*, 57:369-74 [1996]; Smith, *Ann. Rev. Genet.*, 19:423-462 [1985]; Botstein et al., *Science*, 229:1193-1201 [1985]; Carter, *Biochem. J.*, 237:1-7 [1986]; Kramer et al., *Cell*, 38:879-887 [1984]; Wells et al., *Gene*, 34:315-323 [1985]; Minshull et al., *Curr. Op. Chem. Biol.*, 3:284-290 [1999]; Christians et al., *Nat. Biotechnol.*, 17:259-264 [1999]; Cramer et al., *Nature*, 391:288-291 [1998]; Cramer et al., *Nat. Biotechnol.*, 15:436-438 [1997]; Zhang et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 94:4504-4509 [1997]; Cramer et al., *Nat. Biotechnol.*, 14:315-319 [1996]; Stemmer, *Nature*, 370:389-391 [1994]; Stemmer, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91:10747-10751 [1994]; публикации заявок на патенты США Nos. 2008/0220990, US 2009/0312196, US2014/0005057, US2014/0214391, US2014/0221216; US2015/0050658, US2015/0133307, US2015/0134315 и всех родственных аналогичных заявок, не являющихся заявками США; WO 95/22625, WO 97/0078, WO 97/35966, WO 98/27230, WO 00/42651, WO 01/75767, и WO 2009/152336; которые включены в настоящее описание посредством ссылки).

[0160] В некоторых вариантах осуществления изобретения, варианты фермента, полученные после обработки посредством мутагенеза, подвергают скринингу путем воздействия на варианты фермента определенной температуры (или других условий анализа) и оценки количества активности фермента, оставшейся после тепловой обработки или других условий анализа. ДНК, содержащую полинуклеотид, кодирующий полипептид GLA, затем выделяют из клетки-хозяина, секвенируют для выявления изменений нуклеотидной последовательности (если таковые имеются) и используют для экспрессии фермента в другой или в той же клетке-хозяине. Оценка ферментативной активности экспрессионных библиотек может быть проведена с применением любого подходящего метода, известного специалистам в данной области (например, с применением стандартных биохимических методов, такие как анализ ВЭЖХ).

[0161] Для сконструированных полипептидов с известной последовательностью, полинуклеотиды, кодирующие фермент, могут быть получены стандартными методами твердофазного синтеза в соответствии с известными методами синтеза. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фрагменты приблизительно до 100 оснований могут быть синтезированы отдельно, а затем объединены (например, с применением ферментативных или химических методов лигирования или методов с использованием полимеразы) с получением любой желаемой непрерывной последовательности. Так, например, полинуклеотиды и олигонуклеотиды, описанные в настоящей заявке, могут быть получены методом химического синтеза с использованием классического

фосфорамидита (см., например, Beaucage et al., Tetra. Lett., 22:1859-69 [1981]; and Matthes et al., EMBO J., 3:801-05 [1984]), как это обычно практикуется в автоматизированных методах синтеза. Согласно фосфорамидитному методу, олигонуклеотиды синтезируют (например, в автоматическом ДНК-синтезаторе), очищают, отжигают, лигируют и клонируют в соответствующих векторах.

[0162] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления изобретения, способ получения сконструированного полипептида GLA может включать: (a) синтез полинуклеотида, кодирующего полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей любого варианта, представленного в Таблицах 2-1, 5-1, 6-1, 7-1, 8-1, 9-1, 11-1, 12-1 и/или 13-1, а также SEQ ID NO: 8, 58, 158, 372, 374, 704 и/или 1022, и (b) экспрессию полипептида GLA, кодируемого полинуклеотидом. В некоторых вариантах этого способа, аминокислотная последовательность, кодируемая полинуклеотидом, может, но необязательно, иметь одну или более (например, до 3, 4, 5 или до 10) мутаций аминокислотных остатков (например, делеций, инсерций и/или замен). В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислотная последовательность имеет, но необязательно, мутации 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 1-15, 1-20, 1-21, 1-22, 1-23, 1-24, 1-25, 1-30, 1-35, 1-40, 1-45 или 1-50 аминокислотных остатков (например, делеции, инсерции и/или замены). В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислотная последовательность имеет, но необязательно, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 30, 35, 40, 45 или 50 мутаций аминокислотных остатков (например, делеций, инсерций и/или замен). В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислотная последовательность имеет, но необязательно, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 мутаций аминокислотных остатков (например, делеций, инсерций и/или замен). В некоторых вариантах осуществления изобретения, замены могут быть консервативными или неконсервативными.

[0163] Экспрессированный сконструированный полипептид GLA может быть оценен на любое желаемое улучшенное свойство (например, на активность, селективность, стабильность, кислотоустойчивость, чувствительность к протеазе и т.п.) с помощью любого подходящего анализа, известного специалистам в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, анализы и условия, описанные в настоящей заявке.

[0164] В некоторых вариантах осуществления изобретения, любой из сконструированных полипептидов GLA, экспрессированных в клетке-хозяине, выделяют из клеток и/или из культуральной среды с применением любого одного или более хорошо известных способов очистки белка, включая, помимо прочих, обработку лизоцимом, обработку ультразвуком, фильтрацию, высаливание, ультрацентрифугирование и хроматографию.

[0165] Хроматографические методы выделения полипептидов GLA включают, среди прочих, обращенно-фазовую хроматографию, высокоэффективную жидкостную

хроматографию, ионообменную хроматографию, гидрофобную хроматографию, гель-электрофорез и аффинную хроматографию. Условия очистки конкретного фермента частично зависят от таких факторов, как суммарный заряд, гидрофобность, гидрофильность, молекулярная масса, форма молекулы и т.п., и эти условия очевидны специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления изобретения, для выделения улучшенных вариантов ферментов GLA могут быть применены аффинные методики. В некоторых вариантах осуществления изобретения, в которых применяется метод очистки с помощью аффинной хроматографии, может быть использовано любое антитело, которое специфически связывается с вариантом полипептида GLA. В некоторых вариантах осуществления изобретения, в которых применяется метод очистки с помощью аффинной хроматографии, могут быть использованы белки, которые связываются с гликанами, ковалентно присоединенными к GLA. В других вариантах осуществления изобретения, в которых применяется метод очистки с помощью аффинной хроматографии, может быть использована любая небольшая молекула, которая связывается с активным центром GLA. Для получения антител, различных животных-хозяев, включая, но не ограничиваясь ими, кроликов, мышей, крыс и т.п., иммунизируют путем инъекции полипептида GLA (например, варианта GLA) или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептид или фрагмент GLA присоединяют к подходящему носителю, такому как BSA, посредством функциональной группы боковой цепи или линкеров, присоединенных к функциональной группе боковой цепи.

[0166] В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированный полипептид GLA получают в клетке-хозяине способом, включающим культивирование клетки-хозяина (например, *S. cerevisiae*, *Daucus carota*, *Nicotiana tabacum*, *H. sapiens* (например, HEK293T) или *Cricetulus griseus* (например, CHO)), содержащей полинуклеотидную последовательность, кодирующую сконструированный полипептид GLA, как описано в настоящей заявке, в условиях, способствующих получению сконструированного полипептида GLA; и выделение сконструированного полипептида GLA из клеток и/или из культуральной среды.

[0167] В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к способу получения сконструированного полипептида GLA, включающему культивирование рекомбинантной эукариотической клетки, содержащей полинуклеотидную последовательность, кодирующую сконструированный полипептид GLA, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична эталонной последовательности (например, SEQ ID NO: 8, 58, 158, 372, 374, 704 и/или 1022) и имеет одно или более отличий аминокислотных остатков по сравнению с SEQ ID NO: 8, 58, 158, 372, 374, 704 и/или 1022, выбранных из последовательностей, представленных в Таблицах 2-1, 5-1, 6-1, 7-1, 8-1, 9-1, 11-1, 12-1 и 13-1, и/или их комбинаций при оптимальном выравнивании с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8, 58, 158, 372, 374,

704 и/или 1022 в подходящих условиях культивирования, позволяющих получить сконструированный полипептид GLA; и, необязательно, выделение сконструированного полипептида GLA из культуры и/или культивируемых клеток.

[0168] В некоторых вариантах осуществления изобретения, после выделения сконструированных полипептидов GLA из рекомбинантных клеток-хозяев или среды для культивирования клеток, их дополнительно очищают любым(и) подходящим(и) способом(ами), известным(и) специалистам в данной области. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, очищенные полипептиды GLA объединяют с другими ингредиентами и соединениями для получения композиций и составов, содержащих сконструированный полипептид GLA и подходящих для различных целей и применений (например, фармацевтических композиций). В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, очищенные сконструированные полипептиды GLA или полученные сконструированные полипептиды GLA подвергают лиофилизации. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированные полипептиды GLA продуцируются непосредственно в организме (то есть, в клетках организма, такого как человек или другое животное) и не подвергаются очистке. Однако, в некоторых альтернативных вариантах осуществления изобретения, сконструированные полипептиды GLA продуцируются в организме (то есть, в клетках организма, такого как человек или другое животное), а затем их выделяют из организма с применением способов, известных специалистам в данной области. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, эти собранные сконструированные полипептиды GLA очищают. В других дополнительных вариантах осуществления изобретения, эти собранные и/или очищенные сконструированные полипептиды вводят другому животному (например, человеку или другому животному) или повторно вводят в организм, который первоначально продуцировал собранные и/или очищенные сконструированные полипептиды GLA.

Композиции:

[0169] Настоящее изобретение относится к различным композициям и препаратам, включая, но не ограничиваясь ими, композиции и препараты, описанные ниже. В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам GLA, подходящим для их использования в фармацевтических и других композициях, таких как диетические/пищевые добавки.

[0170] В зависимости от способа введения, эти композиции, содержащие терапевтически эффективное количество сконструированной GLA согласно изобретению, находятся в твердой, полутвердой или в жидкой форме. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиции включают другие фармацевтически приемлемые компоненты, такие как разбавители, буферы, эксципиенты, соли, эмульгаторы, консерванты, стабилизаторы, наполнители и другие ингредиенты. Подробная информация о способах приготовления и введения хорошо известна специалистам в данной области и описана в литературе. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эти

композиции продуцируются непосредственно в организме человека после введения путем генотерапии.

[0171] В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированные полипептиды GLA приготавливают для их применения в фармацевтических композициях. В настоящем изобретении может быть использована любая подходящая композиция для доставки сконструированных полипептидов GLA включая, но не ограничиваясь ею, пилюли, таблетки, гелевые таблетки, капсулы, пастилки, драже, порошки, мягкие гели, зольные гели, гели, эмульсии, имплантаты, пластыри, спреи, мази, жидкие мази, кремы, пасты, желе, краски, аэрозоли, жевательные резинки, успокаивающие средства, палочки, растворы, суспензии (включая, но не ограничиваясь ими, суспензии на масляной основе, эмульсии типа масло-в-воде и т.п.), взвеси, сиропы, составы с регулируемым высвобождением, суппозитории и т.п. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированные полипептиды GLA приготавливают в форме, подходящей для инъекции или инфузии (то есть, в составе для инъекций). В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотидные последовательности для сконструированного полипептида GLA приготавливают в форме, подходящей для инъекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированные полипептиды GLA приготавливают в виде биосовместимых матриц, таких как зольные гели, включая зольные гели на основе диоксида кремния (например, оксисилана). В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированные полипептиды GLA являются инкапсулированными. В некоторых альтернативных вариантах осуществления изобретения, сконструированные полипептиды GLA инкапсулированы в наноструктуры (например, нанотрубки, нанотрубочки, нанокапсулы или микрокапсулы, микросферы, липосомы и т.п.). Действительно, не предполагается, что настоящее изобретение ограничивается каким-либо конкретным составом для доставки и/или средством для доставки. Предполагается, что сконструированные полипептиды GLA могут быть введены любым подходящим способом, известным специалистам в данной области, включая, не ограничиваясь ими, парентеральное, пероральное, местное, трансдермальное, интраназальное, внутриглазное, подболобочечное введение, введение с помощью имплантатов и т.п.

[0172] В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированные полипептиды GLA химически модифицируют путем гликозилирования, посредством химических сшивающих реагентов, ПЭГилирования (то есть, посредством модификации полиэтиленгликолем [ПЭГ] или активированным ПЭГ и т.п.) или путем модификации другими соединениями (см., например, Ikeda, Amino Acids 29:283-287 [2005]; патенты США №№ 7531341, 734595, 756063 и 753653; публикации заявок на патенты США №№ 2013/0039898, 2012/0177722 и т.п.). Действительно, настоящее изобретение не ограничивается каким-либо конкретным способом и/или механизмом доставки.

[0173] В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные полипептиды GLA предназначены для доставки в клетки или ткани с

помощью генотерапии, включая вирусные векторы для доставки, включая, но не ограничиваясь ими, аденовирус (AV), аденоассоциированный вирус (AAV), лентивирус (LV) или невирусные векторы (например, липосомы). В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированные полипептиды GLA предназначены для доставки в клетки или ткани с помощью мРНК-терапии после получения последовательностей полирибонуклеотидов в инкапсулированном носителе для доставки (например, в липосомах). В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные полипептиды GLA предназначены для доставки в клетки или ткани с помощью клеточной терапии, где полинуклеотидную последовательность, кодирующую сконструированные полипептиды GLA, вводят в экзогенную клетку, и эту клетку (или клетки) вводят реципиенту (например, пациенту с болезнью Фабри или с риском ее развития).

[0174] В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные полипептиды GLA готовят в виде препаратов, содержащих кристаллы фермента, стабилизированные матрицей. В некоторых вариантах осуществления изобретения, препарат содержит поперечно-сшитый кристаллический сконструированный фермент GLA и полимер с реакционноспособным фрагментом, который связывается с кристаллами фермента. Настоящее изобретение также относится к сконструированным полипептидам GLA в форме полимеров.

[0175] В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиции, содержащие сконструированные полипептиды GLA согласно изобретению, включают одно или более обычно используемых соединений-носителей, включая, но не ограничиваясь ими, сахара (например, лактозу, сахарозу, маннит и/или сорбит), крахмалы (например, кукурузный, пшеничный, рисовый, картофельный или другой растительный крахмал), целлюлозу (например, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, натрий-содержащую карбоксиметилцеллюлозу), камеди (например, аравийскую, трагакантовую, гуаровую камедь и т.п.) и/или белки (например, желатин, коллаген и т.п.).

[0176] В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам GLA, подходящим для применения в целях снижения концентрации гликолипидов в жидкостях, таких как кровь, спинномозговая жидкость и т.п. Дозы вводимого(ых) сконструированного(ых) полипептида(ов) GLA зависят от состояния или заболевания, общего состояния здоровья индивидуума и других факторов, известных специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиции предназначены для однократного или многократного введения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, предполагается, что концентрация сконструированного(ых) полипептида(ов) GLA в композиции(ях), вводимой(ых) человеку с болезнью Фабри, является достаточной для эффективного лечения и/или облегчения заболевания (например, болезни Фабри). В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированные полипептиды GLA вводят в комбинации с другими фармацевтическими и/или диетическими композициями.

Экспериментальная часть

[0177] Нижеследующие примеры, включая эксперименты и полученные результаты, представлены лишь в иллюстративных целях и не должны рассматриваться как ограничение объема настоящего изобретения. В приведенной ниже экспериментальной части используются следующие сокращения: м.д. (миллионные доли); М (моль); mM (миллимоль), мкМ и мкМ (микромоль); nM (наномоль); моль (моль); г (граммы); мг (миллиграммы); мкг (микрограммы); л (литр); мл (миллилитр); см (сантиметры); мм (миллиметры); мкм (микрометры); сек. (секунды); мин. (минуты); ч. и час. (час(ы)); Ед. (единицы); MM (молекулярная масса); об/мин (оборотов в минуту); °C (градусы Цельсия); SEM (стандартная ошибка среднего); IV (внутривенно); CDS (кодирующая последовательность); ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота); РНК (рибонуклеиновая кислота); E. coli W3110 (обычно используемый лабораторный штамм E. coli, доступный в Coli Genetic Stock Center [CGSC], New Haven, CT); NHP (примат, не являющийся человеком); ВЭЖХ (жидкостная хроматография высокого давления); MWCO (отсечка молекулярной массы); ДСН-ПААГ (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия); PBS (забуференный фосфатом физиологический раствор); DPBS (забуференный фосфатом физиологический раствор Дульбекко); PES (полиэфирсульфон); CFSE (сукцинимидиловый эфир карбоксифлуоресцеина); IPTG (изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид); PMBS (сульфат полимиксина В); NADPH (никотинамид-аденин-динуклеотидфосфат); GIDH (глутаматдегидрогеназа); FIOPC (кратное улучшение по сравнению с позитивным контролем); МКПК (моноклеарные клетки периферической крови); LB (бульон Лурия); MeOH (метанол); C_{max} (максимальная концентрация препарата в течение интервала введения доз); RFU (относительные единицы флуоресценции); AUC_{0-t} (площадь под кривой до последней измеряемой концентрации); CL (клиренс); Vz (кажущийся объем распределения в терминальной фазе); TI (тестируемый продукт); Athens Research (Athens Research Technology, Athens, GA); ProSpec (ProSpec Tany Technogene, East Brunswick, NJ); Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); Ram Scientific (Ram Scientific, Inc., Yonkers, NY); Pall Corp. (Pall, Corp., Pt. Washington, NY); Millipore (Millipore, Corp., Billerica MA); Difco (Difco Laboratories, BD Diagnostic Systems, Detroit, MI); PerkinElmer (PerkinElmer, Waltham, MA); Molecular Devices (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA); Kuhner (Adolf Kuhner, AG, Basel, Switzerland); Axygen (Axygen, Inc., Union City, CA); Toronto Research Chemicals (Toronto Research Chemicals Inc., Toronto, Ontario, Canada); Cambridge Isotope Laboratories, (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Tewksbury, MA); Applied Biosystems (Applied Biosystems, part of Life Technologies, Corp., Grand Island, NY), Agilent (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA); Thermo Scientific (part of ThermoFisher Scientific, Waltham, MA); Gibco (ThermoFisher Scientific); Pierce (Pierce Biotechnology (now part of Thermo Fisher Scientific), Rockford, IL); ThermoFisher Scientific (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA); Corning (Corning, Inc., Palo Alto, CA); XenoTech (Sekisui XenoTech, LLC, Kansas City, KS); Coriell Institute for Medical Research (Coriell Institute for Medical Research,

Camden, NJ); VWR (VWR International, Radnor, PA); Jackson (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME); Megazyme (Megazyme International, Wicklow, Ireland); Enzo (Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY); GE Healthcare (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ); LI-COR (LI-COR Biotechnology, Lincoln, NE); Amicus (Amicus Therapeutics, Cranbury, NJ); Phenomenex (Phenomenex, Inc., Torrance, CA); Optimal (Optimal Biotech Group, Belmont, CA); и Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

[0178] Нижеследующие полинуклеотидные и полипептидные последовательности находят свое применение в настоящем изобретении. В некоторых случаях (как показано ниже), за полинуклеотидной последовательностью следует кодируемый полипептид.

Полинуклеотидная последовательность полноразмерной кДНК GLA человека (SEQ ID NO.1):

ATGCAGCTGAGGAACCCAGAACTACATCTGGGCTGCGCGCTTGCGCTTCGCT
TCCTGGCCCTCGTTTCCTGGGACATCCCTGGGGCTAGAGCACTGGACAATGGATTGG
CAAGGACGCCTACCATGGGCTGGCTGCACTGGGAGCGCTTCATGTGCAACCTTGACT
GCCAGGAAGAGCCAGATTCCTGCATCAGTGAGAAGCTCTTCATGGAGATGGCAGAG
CTCATGGTCTCAGAAGGCTGGAAGGATGCAGGTTATGAGTACCTCTGCATTGATGAC
TGTTGGATGGCTCCCCAAAGAGATTCAGAAGGCAGACTTCAGGCAGACCCTCAGCG
CTTTCCTCATGGGATTCGCCAGCTAGCTAATTATGTTACACAGCAAAGGACTGAAGCT
AGGGATTTATGCAGATGTTGGAAATAAAACCTGCGCAGGCTTCCCTGGGAGTTTTGG
ATACTACGACATTGATGCCCAGACCTTTGCTGACTGGGGAGTAGATCTGCTAAAATT
TGATGGTTGTTACTGTGACAGTTTGGAAAATTTGGCAGATGGTTATAAGCACATGTC
CTTGGCCCTGAATAGGACTGGCAGAAGCATTGTGTACTCCTGTGAGTGGCCTCTTTA
TATGTGGCCCTTTCAAAAGCCCAATTATACAGAAATCCGACAGTACTGCAATCACTG
GCGAAATTTTGCTGACATTGATGATTCCTGGAAAAGTATAAAGAGTATCTTGGACTG
GACATCTTTTAACCAGGAGAGAATTGTTGATGTTGCTGGACCAGGGGGTTGGAATG
ACCCAGATATGTTAGTGATTGGCAACTTTGGCCTCAGCTGGAATCAGCAAGTAACTC
AGATGGCCCTCTGGGCTATCATGGCTGCTCCTTTATTCATGTCTAATGACCTCCGACA
CATCAGCCCTCAAGCCAAAGCTCTCCTTCAGGATAAGGACGTAATTGCCATCAATCA
GGACCCCTTGGGCAAGCAAGGGTACCAGCTTAGACAGGGAGACAACCTTTGAAGTGT
GGGAACGACCTCTCTCAGGCTTAGCCTGGGCTGTAGCTATGATAAACCGGCAGGAG
ATTGGTGGACCTCGCTCTTATACCATCGCAGTTGCTTCCCTGGGTAAAGGAGTGGCC
TGTAATCCTGCCTGCTTCATCACACAGCTCCTCCCTGTGAAAAGGAAGCTAGGGTTC
TATGAATGGACTTCAAGGTTAAGAAGTCACATAAATCCCACAGGCACTGTTTTGCTT
CAGCTAGAAAATACAATGCAGATGTCATTAAAAGACTTACTTTAG (SEQ ID NO:1)

Полипептидная последовательность полноразмерной GLA человека:

MQLRNPELHLGCALALRFLALVSWDIPGARALDNGLARTPTMGWLHWERFMC
NLDCQEEDSCISEKLFMEMAELMVSEGWKDAGYEYLCIDDCWMAPQRDSEGR LQAD
PQRFPHGIRQLANYVHSKGLKLG IYADVGNKTCAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGV DLL
KFDGCYCD SLENLADGYKHMSLALNRTGRSIVYSCWPLYMWPFQKPNYTEIRQYCNH
WRNFADIDDSWKS IKSILDWTSFNQERIVDVAGPGGWNDPDMLVIGNFGLSWNQVQTQ

MALWAIMAAPLFMSNDLRHISPQAKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRQGDNFEVW
ERPLSGLA WAVAMINRQEIGGPRSYTIAVASLGKGVACNPACFITQLLPVKRKLGFYEW
TSRLRSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL (SEQ ID NO: 2)

Полинуклеотидная последовательность оптимизированной по кодомам (yCDS) зрелой дрожжевой GLA человека:

TTGGATAACGGGTTAGCCCGTACACCTACTATGGGTTGGCTTCACTGGGAAA
GATTCATGTGTAACCTAGATTGCCAAGAAGAGCCTGACAGCTGTATCTCAGAGAAA
CTATTCATGGAGATGGCTGAACTAATGGTAAGTGAAGGATGGAAGGATGCTGGTTA
TGAATACCTATGTATTGATGATTGCTGGATGGCTCCACAGCGTGATTCAGAAGGTAG
GTTACAAGCTGACCCCCAGAGATTCCCACATGGCATAACGTCAGCTTGCAAACCTACGT
ACACAGCAAGGGTCTAAAGTTAGGCATCTACGCTGATGTCGGAAACAAGACATGTG
CTGGTTTCCCAGGTTCAATTCGGTTACTATGACATAGATGCGCAGACGTTTGCTGATT
GGGGTGTGATTTGTTGAAGTTTGATGGATGCTACTGCGATTCCCTGGAGAACCTAG
CCGATGGGTACAAACACATGAGTTTGGCTCTAAACAGGACTGGTAGGAGCATCGTC
TATAGTTGTGAATGGCCCTTGACATGTGGCCGTTTCAGAAGCCAAACTACACTGAG
ATAAGACAATACTGTAACCATTGGCGTAACTTTGCTGACATAGATGATTCATGGAAG
TCAATCAAATCTATCTTGGATTGGACTTCTTTCAACCAGGAAAGAATTGTTGATGTT
GCAGGTCCAGGTGGATGGAATGACCCTGATATGCTTGTTCATAGGGAACCTTGGGCTA
TCATGGAATCAACAAGTTACACAAATGGCTTTGTGGGCGATCATGGCCGCACCCCTA
TTCATGTCTAATGATCTACGTCACATATCACCCCAAGCAAAGGCTTTACTTCAAGAT
AAGGATGTCATAGCGATCAACCAAGATCCTCTTGGTAAACAAGGTTATCAATTGAG
ACAAGGTGACAACCTTTGAAGTGTGGGAAAGACCATTGTCTGGACTTGCGTGGGCTG
TTGCTATGATCAACCGTCAAGAGATCGGAGGGCCAAGATCTTACACTATCGGGTAG
CCTCTTTGGGTAAGGGTGTGCGTGCAATCCTGCCTGCTTCATTACACAATTGCTTCC
AGTTAAGAGAAAGTTGGGTTTCTATGAGTGGACATCTAGGCTAAGAAGTCACATCA
ATCCTACTGGTACGGTATTGTTGCAATTGGAGAACACAATGCAAATGTCTTTGAAAG
ATTTGTTA (SEQ ID NO:3)

Полинуклеотидная последовательность зрелой человеческой GLA (нативная hCDS):

CTGGACAATGGATTGGCAAGGACGCCTACCATGGGCTGGCTGCACTGGGAGC
GCTTCATGTGCAACCTTGACTGCCAGGAAGAGCCAGATTCTGCATCAGTGAGAAG
CTCTTCATGGAGATGGCAGAGCTCATGGTCTCAGAAGGCTGGAAGGATGCAGGTTA
TGAGTACCTCTGCATTGATGACTGTTGGATGGCTCCCCAAAGAGATTCAGAAGGCAG
ACTTCAGGCAGACCCTCAGCGCTTTCCTCATGGGATTCGCCAGCTAGCTAATTATGT
TCACAGCAAAGGACTGAAGCTAGGGATTTATGCAGATGTTGGAAATAAAACCTGCG
CAGGCTTCCCTGGGAGTTTTGGATACTACGACATTGATGCCCAGACCTTTGCTGACT
GGGGAGTAGATCTGCTAAAATTTGATGGTTGTTACTGTGACAGTTTGGAATAATTTGG
CAGATGGTTATAAGCACATGTCCTTGGCCCTGAATAGGACTGGCAGAAGCATTGTGT
ACTCCTG
TGAGTGGCCTCTTTATATGTGGCCCTTTCAAAAGCCCAATTATACAGAAATCCGACA

GTACTGCAATCACTGGCGAAATTTTGCTGACATTGATGATTCCTGGAAAAGTATAAA
 GAGTATCTTGGACTGGACATCTTTTAACCAGGAGAGAATTGTTGATGTTGCTGGACC
 AGGGGGTTTGAATGACCCAGATATGTTAGTGATTGGCAACTTTGGCCTCAGCTGGA
 ATCAGCAAGTAACTCAGATGGCCCTCTGGGCTATCATGGCTGCTCCTTTATTCATGT
 CTAATGACCTCCGACACATCAGCCCTCAAGCCAAAGCTCTCCTTCAGGATAAGGACG
 TAATTGCCATCAATCAGGACCCCTTGGGCAAGCAAGGGTACCAGCTTAGACAGGGA
 GACAACTTTGAAGTGTGGGAACGACCTCTCTCAGGCTTAGCCTGGGCTGTAGCTATG
 ATAAACCGGCAGGAGATTGGTGGACCTCGCTCTTATAACCATCGCAGTTGCTTCCCTG
 GGTAAGGAGTGGCCTGTAATCCTGCCTGCTTCATCACACAGCTCCTCCCTGTGAAA
 AGGAAGCTAGGGTTCTATGAATGGACTTCAAGGTAAAGAAGTCACATAAATCCCAC
 AGGCACTGTTTTGCTTCAGCTAGAAAATACAATGCAGATGTCATTAAAAGACTTACT
 T (SEQ ID NO:4)

Полипептидная последовательность зрелой GLA человека:

LDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLDCQEEPSCISEKLFMEMAELMVSEGWKD
 AGYEYLCIDDCWMA PQRDSEGR LQADPQRFPHGIRQLANYVHSGKGLKLG IYADVGNKT
 CAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGV DLLKFDG CYCDSLENLADGYKHMSLALNRTGRSIV
 YSCEWPLYMWPFQKPNYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWKS IKSILDWTSFNQERIVDVA
 GPGGWNDPDM LVIGNFGLSWNQV TQMALWAIMAAPLFMSNDLRHISPQAKALLQDK
 DVIAINQDPLGKQGYQLRQGDNF EVWERPLSGLAWAVAMINRQEIGGPRSYTIAVASLG
 KGVACNPACFITQLLPVKRKLGFYEWTSRLRSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL
 (SEQ ID NO:5)

Полинуклеотидная последовательность экспрессионного вектора pCK110900i E. coli:

TCGAGTTAATTAAGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACT
 CATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTG
 TGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACGGCTATGACCATGATTACGGATTCACT
 GGCCGTCGTTTTACAATCTAGAGGCCAGCCTGGCCATAAGGAGATATACATATGAGT
 ATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTCTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTT
 TGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCAC
 GAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCC
 CCGAAGAGCGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTAT
 TATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGA
 ATGACTTGTTGAGTACTACCAAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACA
 GTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTT
 ACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGTTTTTTTTGCACACCATGGG
 GGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAA
 ACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTACAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACATA
 TTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAG
 GCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATT
 GCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGG

GCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAA
CTATGGATGAACGTAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATT
GGGGCCAAACTGGCCACCATCACCATTAGGGAAGAGCAGATGGGCAAGCT
TGACCTGTGAAGTGAAAAATGGCGCACATTGTGCGACATTTTTTTTTGAATTCTACG
TAAAAAGCCGCCGATACATCGGCTGCTTTTTTTTTGATAGAGGTTCAAACCTGTGGT
ATAATGAAATAAGATCACTCCGGGGCGTATTTTTTGAGTTATCGAGATTTTCAGGAG
CTAAGGAAGCTAAAATGGAGAAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCC
CAATGGCATCGTAAAGAACATTTTGAGGCATTTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTAT
AACCAGACCGTTTCAGCTGGATATTACGGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAA
GCACAAGTTTTATCCGGCCTTTATTCACATTCTTGCCCGCCTGATGAATGCTCATCCG
GAGTTCCGTATGGCAATGAAAGACGGTGAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTACCC
TTGTTACACCGTTTTCCATGAGCAAACCTGAAACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATA
CCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATATTGCAAGATGTGGCGTGTTACGG
TGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAGAATATGTTTTTCGTCTCAGCC
AATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTGGCCAATATGGACAACCTC
TTCGCCCCCGTTTTACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGCGACAAGGTGCTGATG
CCGCTGGCGATTTCAGGTTTCATCATGCCGTCTGTGATGGCTTCCATGTCGGCAGAATG
CTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAACTGCAGGA
GCTCAAACAGCAGCCTGTATTTCAGGCTGCTTTTTTCGTTTTGGTCTGCGCGTAATCTC
TTGCTCTGAAAACGAAAAAACCGCCTTGACAGGGCGGTTTTTCGAAGGTTCTCTGAGC
TACCAACTCTTTGAACCGAGGTAACCTGGCTTGAGAGAGCGCAGTCACCAAAACCTGT
CCTTTTCAGTTTAGCCTTAACCGGCGCATGACTTCAAGACTAACTCCTCTAAATCAATT
ACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGTGCTTTTGCATGTCTTCCGGGTTGGACTCAAGACG
ATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGACTGAACGGGGGGTTCGTGCATACAGT
CCAGCTTGAGCGAACTGCCTACCCGGAACCTGAGTGTCAGGCGTGGAATGAGACAA
ACGCGGCCATAACAGCGGAATGACACCGGTAAACCGAAAGGCAGGAACAGGAGAG
CGCACGAGGGAGCCGCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTT
CGCCACCACTGATTTGAGCGTCAGATTTTCGTGATGCTTGTGAGGGGGGCGGAGCCTA
TGAAAAACGGCTTTGCCGCGGCCCTCTCACTTCCCTGTAAAGTATCTTCCTGGCATC
TTCCAGGAAATCTCCGCCCCGTTTCGTAAGCCATTTCCGCTCGCCGCAGTCGAACGAC
CGAGCGTAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAATATATCCTGTATCACATATTCT
GCTGACGCACCGGTGCAGCCTTTTTTCTCCTGCCACATGAAGCACTTCACTGACACC
CTCATCAGTGAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTAGGCCTATGGCCTTTTTTTT
TTGTGGGAAACCTTTTCGCGGTATGGTATTAAAGCGCCCGGAAGAGAGTCAATTCAG
GGTGGTGAATGTGAAACCAGTAACGTTATACGATGTCGCAGAGTATGCCGGTGTCTC
TTATCAGACCGTTTCCCGCGTGGTGAACCAGGCCAGCCACGTTTCTGCGAAAACGCG
GGAAAAAGTGGAAGCGGCGATGGCGGAGCTGAATTACATTCCCAACCGCGTGGCAC
AACAACCTGGCGGGCAAACAGTCGTTGCTGATTGGCGTTGCCACCTCCAGTCTGGCCC
TGCACGCGCCGTCGCAAATTGTCGCGGCGATTAAATCTCGCGCCGATCAACTGGGTG
CCAGCGTGGTGGTGTGATGGTAGAACGAAGCGGCGTCGAAGCCTGTAAAGCGGCG

GTGCACAATCTTCTCGCGCAACGCGTCAGTGGGCTGATCATTA ACTATCCGCTGGAT
 GACCAGGATGCCATTGCTGTGGAAGCTGCCTGCACTAATGTTCCGGCGTTATTTCTT
 GATGTCTCTGACCAGACACCCATCAACAGTATTATTTTCTCCCATGAAGACGGTACG
 C GACTGGGCGTGGAGCATCTGGTCGCATTGGGTCACCAGCAAATCGCGCTGTTAGC
 GGGCCCATTAAGTTCTGTCTCGGCGCGTCTGCGTCTGGCTGGCTGGCATAAATATCT
 CACTCGCAATCAAATTCAGCCGATAGCGGAACGGGAAGGCGACTGGAGTGCCATGT
 CCGGTTTTTCAACAAACCATGCAAATGCTGAATGAGGGCATCGTTTCCACTGCGATGC
 TGGTTGCCAACGATCAGATGGCGCTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCGAGTCCGGG
 CTGCGCGTTGGTGCGGACATCTCGGTAGTGGGATACGACGATACCGAAGACAGCTC
 ATGTTATATCCCGCCGTTAACCACCATCAAACAGGATTTTCGCCTGCTGGGGCAAAC
 CAGCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTTAAGGGCAATCAGC
 TGTTGCCCCGTCTCACTGGTGAAAAGAAAAACCACCCTGGCGCCCAATACGCAAACC
 GCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGA
 CTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGGTACCCGATAAAAGCGGCTTCCTGACAGGAGGCCG
 TTTTGTTTC (SEQ ID NO:6)

Полинуклеотидная последовательность экспрессионного вектора, секретируемого дрожжами pYT-72Bgl:

TTGTACAA
 ATATCATAAAAAAAGAGAATCTTTTTAAGCAAGGATTTTCTTA ACTTCTTCGGCGAC
 AGCATCACCGACTTCGGTGGTACTGTTGGAACCACTAAATCACCAGTTCTGATACC
 TGCATCCAAAACCTTTTTAACTGCATCTTCAATGGCTTTACCTTCTTCAGGCAAGTTC
 AATGACAATTTCAACATCATTGCAGCAGACAAGATAGTGGCGATAGGGTTGACCTT
 ATTCTTTGGCAAATCTGGAGCGGAACCATGGCATGGTTCGTACAAACCAAATGCGGT
 GTTCTTGTCTGGCAAAGAGGCCAAGGACGCAGATGGCAACAAACCCAAGGAGCCTG
 GGATAACGGAGGCTTCATCGGAGATGATATCACCAAACATGTTGCTGGTGATTATA
 ATACCATTTAGGTGGGTTGGGTTCTTA ACTAGGATCATGGCGGCAGAATCAATCAAT
 TGATGTTGAACTTTCAATGTAGGGAATTCGTTCTTGATGGTTTCCTCCACAGTTTTTC
 TCCATAATCTTGAAGAGGCCAAAACATTAGCTTTATCCAAGGACCAAATAGGCAAT
 GGTGGCTCATGTTGTAGGGCCATGAAAGCGGCCATTCTTGTGATTCTTTGCACTTCT
 GGAACGGTGTATTGTTCACTATCCCAAGCGACACCATCACCATCGTCTTCCTTTCTCT
 TACCAAAGTAAATACCTCCC ACTAATTCTCTAACAACAACGAAGTCAGTACCTTTAG
 CAAATTGTGGCTTGATTGGAGATAAGTCTAAAAGAGAGTCGGATGCAAAGTTACAT
 GGTCTTAAGTTGGCGTACAATTGAAGTTCTTTACGGATTTTTTAGTAAACCTTGTT CAG
 GTCTAACACTACCGGTACCCCATTTAGGACCACCCACAGCACCTAACAAAACGGCA
 TCAGCCTTTTTTGGAGGCTTCAGCGCCTCATTTGGAAGTGGAACACCTGTAGCATCG
 ATAGCAGCCCCCCCCAATTAAATGATTTTCGAAATCGAACTTGACATTGGAACGAACA
 TCAGAAATAGCTTTAAGAACCTTAATGGCTTCGGCTGTGATTTCTTGACCAACGTGG
 TCACCTGGCAAACGACGATTTTTTTTAGGGGCAGACATTACAATGGTATATCCTTGA
 AATATATATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATGCAGCTTCTCAATG
 ATATTCGAATACGCTTTGAGGAGATACAGCCTAATATCCGACAAACTGTTTTACAGA

TTTACGATCGTACTTGTTACCCATCATTGAATTTTGAACATCCGAACCTGGGAGTTTT
CCCTGAAACAGATAGTATATTTGAACCTGTATAATAATATATAGTCTAGCGCTTTAC
GGAAGACAATGTATGTATTTTCGGTTCCTGGAGAACTATTGCATCTATTGCATAGGT
AATCTTGCACGTTCGCATCCCCGGTTCATTTTCTGCGTTTCCATCTTGCACCTCAATAG
CATATCTTTGTTAACGAAGCATCTGTGCTTCATTTTGTAGAACAAAAATGCAACGCG
AGAGCGCTAATTTTTCAAACAAAGAATCTGAGCTGCATTTTTACAGAACAGAAATGC
AACGCGAAAGCGCTATTTTACCAACGAAGAATCTGTGCTTCATTTTTGTAAAACAAA
AATGCAACGCGAGAGCGCTAATTTTTCAAACAAAGAATCTGAGCTGCATTTTTACAG
AACAGAAATGCAACGCGAGAGCGCTATTTTACCAACAAAGAATCTATACTTCTTTTT
TGTTCTACAAAAATGCATCCCGAGAGCGCTATTTTTCTAACAAAGCATCTTAGATTA
CTTTTTTCTCCTTTGTGCGCTCTATAATGCAGTCTCTTGATAACTTTTTGCACTGTAG
GTCCGTTAAGGTTAGAAGAAGGCTACTTTGGTGTCTATTTTCTCTCCATAAAAAAA
GCCTGACTCCACTTCCCGCGTTTACTGATTACTAGCGAAGCTGCGGGTGCATTTTTTC
AAGATAAAGGCATCCCCGATTATATTCTATAACCGATGTGGATTGCGCATACTTTGTG
AACAGAAAGTGATAGCGTTGATGATTCTTCATTGGTCAGAAAATTATGAACGGTTTTC
TTCTATTTTGTCTCTATACTACGTATAGGAAATGTTTACATTTTCGTATTGTTTTCG
ATTCACTCTATGAATAGTTCTTACTACAATTTTTTTGTCTAAAGAGTAATACTAGAGA
TAAACATAAAAAATGTAGAGGTTCGAGTTTAGATGCAAGTTCAAGGAGCGAAAGGTG
GATGGGTAGGTTATATAGGGATATAGCACAGAGATATATAGCAAAGAGATACTTTT
GAGCAATGTTTGTGGAAGCGGTATTCGCAATATTTTAGTAGCTCGTTACAGTCCGGT
GCGTTTTTGGTTTTTTGAAAGTGCGTCTTCAGAGCGCTTTTGGTTTTCAAAGCGCTC
TGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTTCAAAGCGTT
TCCGAAAACGAGCGCTTCCGAAAATGCAACGCGAGCTGCGCACATACAGCTCACTG
TTCACGTTCGCACCTATATCTGCGTGTTGCCTGTATATATATATACATGAGAAGAACG
GCATAGTGCGTGTTTATGCTTAAATGCGTACTTATATGCGTCTATTTATGTAGGATGA
AAGGTAGTCTAGTACCTCCTGTGATATTATCCCATTCATGCGGGGTATCGTATGCTT
CCTTCAGCACTACCCTTTAGCTGTTCTATATGCTGCCACTCCTCAATTGGATTAGTCT
CATCCTTCAATGCTATCATTTCCCTTTGATATTGGATCATATGCATAGTACCGAGAAAC
TAGTGCGAAGTAGTGATCAGGTATTGCTGTTATCTGATGAGTATACGTTGTCCTGGC
CACGGCAGAAGCACGCTTATCGCTCCAATTTCCACAACATTAGTCAACTCCGTTAG
GCCCTTCATTGAAAGAAATGAGGTCATCAAATGTCTTCCAATGTGAGATTTTGGGCC
ATTTTTTATAGCAAAGATTGAATAAGGCGCATTTTTCTTCAAAGCTTTATTGTACGAT
CTGACTAAGTTATCTTTAATAATTGGTATTCCTGTTTATTGCTTGAAGAATTGCCGG
TCCTATTTACTCGTTTTAGGACTGGTTCAGAATTCCTCAAAAATTCATCCAAATATAC
AAGTGGATCGATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTCTTGAAGACGAAAGGGCCTC
GTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAG
GTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACA
TTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTG
AAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTGC
GGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGC

TGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTA
AGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAG
TTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTC
GCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGC
ATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGT
GATAAACA CTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAAC
CGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAC TCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGA
GCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGG
CAACAACGTTGCGCAA CTATTA ACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAAC
AATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCC
CTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGC
GGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTAC
ACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAG
GTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTT
AGATTGATTTAAAACTTCATTTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGA
TAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCC
CGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTG
CTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGT TTGCCGGATCAAGAGC
TACCAACTCTTTTTCCGAAGGTA ACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTG
TCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTA
CATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGT
GTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCTGGGC
TGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACT
GAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGG
CGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCT
TCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCTGGGTTTCGCCACCTCTGACT
TGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCA
GCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTT
TCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGAT
ACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGG
AAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCA
TATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACAC
TCCGCTATCGCTACGTGACTGGGT CATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGC
TGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGAC
CGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGCGAG
GCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAGCGTGGTCGTGAAGCGATTACAGATGTCTGCCTG
TTCATCCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAAGCGTTAATGTCTGGCTTCTGATA
AAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTTCCTGTTTGGTCACTGATGCCTCCGTGTAA
GGGGGATTTCTGTT CATGGGGGTAATGATAACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCAC
GATACGGGTTACTGATGATGAACATGCCCCGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAAC

AACTGGCGGTATGGATGCGGCGGGACCAGAGAAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAG
CGCTTCGTTAATACAGATGTAGGTGTTCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCCTGCGATG
CAGATCCGGAACATAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGCGTTTCCAGACTTTACGAA
ACACGGAAACCGAAGACCATTTCATGTTGTTGCTCAGGTCGCAGACGTTTTGCAGCAG
CAGTCGCTTCACGTTTCGCTCGCGTATCGGTGATTCTGCTAACCCAGTAAGGCAA
CCCCGCCAGCCTAGCCGGGTCCTCAACGACAGGAGCACGATCATGCGCACCCGTGG
CCAGGACCCAACGCTGCCCCGAGATGCGCCGCGTGCGGCTGCTGGAGATGGCGGACG
CGATGGATATGTTCTGCCAAGGGTTGGTTTGCGCATTACAGTTCTCCGCAAGAATT
GATTGGCTCCAATTCTTGAGTGGTGAATCCGTTAGCGAGGTGCCGCCGGCTTCCAT
TCAGGTCGAGGTGGCCCCGGCTCCATGCACCGCGACGCAACGCGGGGAGGCAGACAA
GGTATAGGGCGGCGCCTACAATCCATGCCAACCCGTTCCATGTGCTCGCCGAGGCG
GCATAAATCGCCGTGACGATCAGCGGTCCAATGATCGAAGTTAGGCTGGTAAGAGC
CGCGAGCGATCCTTGAAGCTGTCCCTGATGGTCGTCATCTACCTGCCTGGACAGCAT
GGCCTGCAACGCGGGCATCCCGATGCCGCCGGAAGCGAGAAGAATCATAATGGGGA
AGGCCATCCAGCCTCGCGTCGCGAACGCCAGCAAGACGTAGCCCAGCGCGTCGGCC
GCCATGCCGGCGATAATGGCCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGACCAGTG
ACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGAATACCGCAAGCGACAGGCCGAT
CATCGTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCCTCGCCGAAAATGACCCAGAGCGCTGCCG
GCACCTGTCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGACGATA
GTCATGCCCCGCGCCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTGTAAGGCTCTCAAGGGCAT
CGGTCGAGGATCTGGGCAAAACGTAGGGGCAAACAAACGGAAAAATCGTTTCTCAA
ATTTTCTGATGCCAAGAACTCTAACCAGTCTTATCTAAAAATTGCCTTATGATCCGTC
TCTCCGGTTACAGCCTGTGTAAGTATTAATCCTGCCTTTCTAATCACCATTCTAATG
TTTTAATTAAGGGATTTTGTCTTCATTAACGGCTTTCGCTCATAAAAATGTTATGACG
TTTTGCCCGCAGGCGGGAAACCATCCACTTCACGAGACTGATCTCCTCTGCCGGAAC
ACCGGGCATCTCCAATTATAAGTTGGAGAAATAAGAGAATTTTCAGATTGAGAGAA
TGAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGCAGAGGAGAGCATAGAAATGGGGTTCACTTTT
TGGTAAAGCTATAGCATGCCTATCACATATAAATAGAGTGCCAGTAGCGACTTTTTT
CACACTCGAAATACTCTTACTACTGCTCTCTTGTGTTTTTATCACTTCTGTTTCTTC
TTGGTAAATAGAATATCAAGCTACAAAAAGCATACAATCAACTATCAACTATTAAGT
ATATCGTAATACACAGGATCCACCATGAAGGCTGCTGCGCTTTCCTGCCTCTTCGGC
AGTACCCTTGCCGTTGCAGGCGCCATTGAATCGAGAAAGGTTACCCAGAAAGCCCTC
GCGAGATCTGAACCTTTTTACCCGTCGCCATGGATGAATCCCAACGCCATCGGCTGG
GCGGAGGCCTATGCCCAGGCCAAGTCCTTTGTCTCCCAAATGACTCTGCTAGAGAAG
GTCAACTTGACCACGGGAGTCGGCTGGGGGGAGGAGCAGTGCGTCGGCAACGTGGG
CGCGATCCCTCGCCTTGGACTTCGCAGTCTGTGCATGCATGACTCCCCTCTCGGCGT
GCGAGGAACCGACTACAACTCAGCGTTCCTCTGGCCAGACCGTTGCTGCTACCTG
GGATCGCGGTCTGATGTACCGTCGCGGCTACGCAATGGGCCAGGAGGCCAAAGGCA
AGGGCATCAATGTCCTTCTCGGACCAGTCGCCGGCCCCCTTGGCCGCATGCCCGAGG
GCGGTCGTAAGTGGGAAGGCTTCGCTCCGGATCCCGTCCTTACCGGCATCGGCATGT

CCGAGACGATCAAGGGCATTTCAGGATGCTGGCGTCATCGCTTGTGCGAAGCACTTTA
TTGGAAACGAGCAGGAGCACTTCAGACAGGTGCCAGAAGCCCAGGGATACGGTTAC
AACATCAGCGAAACCCTCTCCTCCAACATTGACGACAAGACCATGCACGAGCTCTA
CCTTTGGCCGTTTGCCGATGCCGTCCGGGGCCGGCGTCGGCTCTGTCATGTGCTCGTA
CAACCAGGGCAACAACCTCGTACGCCTGCCAGAACTCGAAGCTGCTGAACGACCTCC
TCAAGAACGAGCTTGGGTTTCAGGGCTTCGTCATGAGCGACTGGTGGGCACAGCAC
ACTGGCGCAGCAAGCGCCGTGGCTGGTCTCGATATGTCCATGCCGGGCGACACCAT
GGTCAACACTGGCGTCAGTTTCTGGGGCGCCAATCTCACCCCTCGCCGTCCTCAACGG
CACAGTCCCTGCCTACCGTCTCGACGACATGTGCATGCGCATCATGGCCGCCCTCTT
CAAGGTCACCAAGACCACCGACCTGGAACCGATCAACTTCTCCTTCTGGACCCGCGA
CACTTATGGCCCGATCCACTGGGCGCCCAAGCAGGGCTACCAGGAGATTAATTCCC
ACGTTGACGTCCGCGCCGACCACGGCAACCTCATCCGGAACATTGCCGCCAAGGGT
ACGGTGCTGCTGAAGAATACCGGCTCTCTACCCCTGAACAAGCCAAAGTTCGTGGCC
GTCATCGGCGAGGATGCTGGGCGGAGCCCCAACGGGCCCAACGGCTGCAGCGACCG
CGGCTGTAACGAAGGCACGCTCGCCATGGGCTGGGGATCCGGCACAGCCAACTATC
CGTACCTCGTTTCCCCCGACGCCGCGCTCCAGGCGCGGGCCATCCAGGACGGCACG
AGGTACGAGAGCGTCCTGTCCAACTACGCCGAGGAAAATACAAAGGCTCTGGTCTC
GCAGGCCAATGCAACCGCCATCGTCTTCGTCAATGCCGACTCAGGCGAGGGCTACA
TCAACGTGGACGGTAACGAGGGCGACCGTAAGAACCTGACTCTCTGGAACAACGGT
GATACTCTGGTCAAGAACGTCTCGAGCTGGTGCAGCAACACCATCGTCGTCATCCAC
TCGGTCGGCCCCGGTCTCCTGACCGATTGGTACGACAACCCCAACATCACGGCCATT
CTCTGGGCTGGTCTTCCGGGCCAGGAGTCGGGCAACTCCATCACCGACGTGCTTTAC
GGCAAGGTCAACCCCGCCGCCCGCTCGCCCTTCACTTGGGGGCAAGACCCGCGAAAG
CTATGGCGCGGACGTCCTGTACAAGCCGAATAATGGCAATTGGGCGCCCCAACAGG
ACTTCACCGAGGGCGTCTTCATCGACTACCGCTACTTCGACAAGGTTGACGATGACT
CGGTCATCTACGAGTTCGGCCACGGCCTGAGCTACACCACCTTCGAGTACAGCAACA
TCCGCGTCGTCAAGTCCAACGTCAGCGAGTACCGGCCACGACGGGCACACGATT
CAGGCCCCGACGTTTGGCAACTTCTCCACCGACCTCGAGGACTATCTCTTCCCCAAG
GACGAGTTCCCCTACATCCCGCAGTACATCTACCCGTACCTCAACACGACCGACCCC
CGGAGGGCCTCGGGCGATCCCCACTACGGCCAGACCGCCGAGGAGTTCCTCCCGCC
CCACGCCACCGATGACGACCCCCAGCCGCTCCTCCGGTCCTCGGGCGGAAACTCCCC
CGGCGGCAACCGCCAGCTGTACGACATTGTCTACACAATCACGGCCGACATCACGA
ATACGGGCTCCGTTGTAGGCGAGGAGGTACCGCAGCTCTACGTCTCGCTGGGCGGTC
CCGAGGATCCCAAGGTGCAGCTGCGCGACTTTGACAGGATGCGGATCGAACCCGGC
GAGACGAGGCAGTTCACCGGCCCGCCTGACGCGCAGAGATCTGAGCAACTGGGACGT
CACGGTGCAGGACTGGGTTCATCAGCAGGTATCCCAAGACGGCATATGTTGGGAGGA
GCAGCCGGAAGTTGGATCTCAAGATTGAGCTTCCTTGATAAGTCGACCTCGACTTTG
TTCCCACTGTACTTTTAGCTCGTACAAAATACAATATACTTTTCATTTCTCCGTAAAC
AACATGTTTTCCCATGTAATATCCTTTTCTATTTTTTCGTTCCGTTACCAACTTTACACA
TACTTTATATAGCTATTCACCTTCTATACACTAAAAAACTAAGACAATTTTAATTTTGC

TGCCTGCCATATTTCAATTTGTTATAAAATTCCTATAATTTATCCTATTAGTAGCTAAA
AAAAGATGAATGTGAATCGAATCCTAAGAGAATTGGATCTGATCCACAGGACGGGT
GTGGTCGCCATGATCGCGTAGTCGATAGTGGCTCCAAGTAGCGAAGCGAGCAGGAC
TGGGCGGCGGCCAAAGCGGTCTGGACAGTGCTCCGAGAACGGGTGCGCATAGAAATT
GCATCAACGCATATAGCGCTAGCAGCACGCCATAGTGAAGTGGCGATGCTGTCTGGAA
TGGACGATATCCCGCAAGAGGGCCCGGCAGTACCGGCATAACCAAGCCTATGCCTAC
AGCATCCAGGGTGACGGTGCCGAGGATGACGATGAGCGCATTGTTAGATTTTCATAC
ACGGTGCCTGACTGCGTTAGCAATTTAACTGTGATAAACTACCGCATTAAGCTTTT
TCTTTCCAATTTTTTTTTTTTTTCGTCATTATAAAAATCATTACGACCGAGATTCCCGGG
TAATAACTGATATAATTAATGAAGCTCTAATTTGTGAGTTTAGTATACATGCATTT
ACTTATAATACAGTTTTTTTAGTTTTGCTGGCCGCATCTTCTCAAATATGCTTCCAGC
CTGCTTTTCTGTAAACGTTACCCCTCTACCTTAGCATCCCTTCCCTTTGCAAATAGTCC
TCTTCCAACAATAATAATGTCAGATCCTGTAGAGACCACATCATCCACGGTTCTATA
CTGTTGACCCAATGCGTCTCCCTTGTCATCTAAACCCACACCGGGTGTCATAATCAA
CCAATCGTAACCTTCATCTCTTCCACCCATGTCTCTTTGAGCAATAAAGCCGATAAC
AAAATCTTTGTCGCTCTTCGCAATGTCAACAGTACCCTTAGTATATTCTCCAGTAGAT
AGGGAGCCCTTGATGACAATTCTGCTAACATCAAAAGGCCTCTAGGTTCCCTTTGTT
ACTTCTTCTGCCGCCTGCTTCAAACCGCTAACAATACCTGGGCCCACCACACCGTGT
GCATTCGTAATGTCTGCCCATTTCTGCTATTCTGTATACACCCGCAGAGTACTGCAATT
TGACTGTATTACCAATGTCAGCAAATTTTCTGTCTTCGAAGAGTAAAAAATTGTACT
TGGCGGATAATGCCTTTAGCGGCTTAACTGTGCCCTCCATGGAAAAATCAGTCAAGA
TATCCACATGTGTTTTTAGTAAACAAATTTTGGGACCTAATGCTTCAACTAACTCCA
GTAATTCCTTGGTGGTACGAACATCCAATGAAGCACACAAGTTTGTTTGCTTTTTCGT
GCATGATATTAATAGCTTGGCAGCAACAGGACTAGGATGAGTAGCAGCACGTTCC
TTATATGTAGCTTTTCGACATGATTTATCTTCGTTTCCTGCAGGTTTTTGTCTGTGCAG
TTGGGTAAAGAATACTGGGCAATTTTCATGTTTCTTCAACTACATATGCGTATATAT
ACCAATCTAAGTCTGTGCTCCTTCCTTCGTTCTTCCTTCTGTTCCGAGATTACCGAAT
CAAAAAAATTTCAAGGAAACCGAAATCAAAAAAAGAATAAAAAAATGATGA
ATTGAAAAGCTTATCGATCCTACCCCTTGCGCTAAAGAAGTATATGTGCCTACTAAC
GCTTGTCTTTGTCTCTGTCACTAAACACTGGATTATTACTCCCAGATACTTATTTTGG
ACTAATTTAAATGATTTTCGGATCAACGTTCTTAATATCGCTGAATCTTCCACAATTGA
TGAAAGTAGCTAGGAAGAGGAATTGGTATAAAGTTTTTGTTTTGTAAATCTCGAAG
TATACTCAAACGAATTTAGTATTTTCTCAGTGATCTCCAGATGCTTTACCCCTCACT
TAGAAGTGCTTTAAGCATTTTTTTTACTGTGGCTATTTCCCTTATCTGCTTCTTCCGATG
ATTCGAACTGTAATTGCAAACTACTTACAATATCAGTGATATCAGATTGATGTTTTT
GTCCATAGTAAGGAATAATTGTAAATTTCCAAGCAGGAATCAATTTCTTTAATGAGG
CTTCCAGAATTGTTGCTTTTTTGCCTTGTATTTAACTGGAGTGATTTATTGACAAT
ATCGAACTCAGCGAATTGCTTATGATAGTATTATAGCTCATGAATGTGGCTCTCTT
GATTGCTGTTCCGTTATGTGTAATCATCCAACATAAATAGGTTAGTTCAGCAGCACA
TAATGCTATTTTCTCACCTGAAGGTCTTTCAAACCTTTCACAAACTGACGAACAAG

CACCTTAGGTGGTGTGTTTTACATAATATATCAAATTGTGGCATGCTTAGCGCCGATCTT
GTGTGCAATTGATATCTAGTTTCAACTACTCTATTTATCTTGTATCTTGCAGTATTCA
AACACGCTAACTCGAAAACTAACTTTAATTGTCCTGTTTGTCTCGCGTTCTTTTCGAA
AAATGCACCGGCCGCGCATTATTTGTACTGCGAAAATAATTGGTACTGCGGTATCTT
CATTTTCATATTTTAAAAATGCACCTTTGCTGCTTTTCCTTAATTTTTAGACGGCCCCG
AGGTTTCGTTTTGCGGTACTATCTTGTGATAAAAAAGTTGTTTTGACATGTGATCTGCAC
AGATTTTATAATGTAATAAGCAAGAATACATTATCAAACGAACAATACTGGTAAAA
GAAAACCAAAATGGACGACATTGAAACAGCCAAGAATCTGACGGTAAAAGCACGT
ACAGCTTATAGCGTCTGGGATGTATGTCGGCTGTTTATTGAAATGATTGCTCCTGAT
GTAGATATTGATATAGAGAGTAAACGTAAGTCTGATGAGCTACTCTTCCAGGATAT
GTCATAAGGCCCATGGAATCTCTCACAACCGGTAGGCCGTATGGTCTTGATTCTAGC
GCAGAAGATTCCAGCGTATCTTCTGACTCCAGTGCTGAGGTAATTTTGCCTGCTGCG
AAGATGGTTAAGGAAAGGTTTGATTTCGATTGGAAATGGTATGCTCTCTTCACAAGAA
GCAAGTCAGGCTGCCATAGATTTGATGCTACAGAATAACAAGCTGTTAGACAATAG
AAAGCAACTATACAAATCTATTGCTATAATAATAGGAAGATTGCCCCGAGAAAGACA
AGAAGAGAGCTACCGAAATGCTCATGAGAAAAATGGATTGTACACAGTTATTAGTC
CCACCAGCTCCAACGGAAGAAGATGTTATGAAGCTCGTAAGCGTCGTTACCCAATT
GCTTACTTTAGTTCCACCAGATCGTCAAGCTGCTTTAATAGGTGATTTATTCATCCCG
GAATCTCTAAAGGATATATTCAATAGTTTCAATGAACTGGCGGCAGAGAATCGTTTA
CAGCAAAAAAAGAGTGAGTTGGAAGGAAGGACTGAAGTGAACCATGCTAATACAA
ATGAAGAAGTTCCCTCCAGGCGAACAAGAAGTAGAGACACAAATGCAAGAGGAGC
ATATAAATTACAAAACACCATCACTGAGGGCCCTAAAGCGGTTCCACGAAAAAAA
GGAGAGTAGCAACGAGGGTAAGGGGCAGAAAATCACGTAATACTTCTAGGGTATGA
TCCAATATCAAAGGAAATGATAGCATTGAAGGATGAGACTAATCCAATTGAGGAGT
GGCAGCATATAGAACAGCTAAAGGGTAGTGCTGAAGGAAGCATAACGATACCCCGCA
TGGAATGGGATAATATCACAGGAGGTACTAGACTACCTTTCATCCTACATAAATAGA
CGCATATAAGTACGCATTTAAGCATAAACACGCACTATGCCGTTCTTCTCATGTATA
TATATATACAGGCAACACGCAGATATAGGTGCGACGTGAACAGTGAGCTGTATGTG
CGCAGCTCGCGTTGCATTTTCGGAAGCGCTCGTTTTTCGGAAACGCTTTGAAGTTCT
ATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTCAGAGCGCTTTTGAAAACC
AAAAGCGCTCTGAAGACGCACTTTCAAAAAACCAAAAACGCACCGGACTGTAACGA
GCTACTAAAATATTGCGAATACCGCTTCCACAAACATTGCTCAAAAGTATCTCTTTG
CTATATATCTCTGTGCTATATCCCTATATAACCTACCCATCCACCTTTCGCTCCTTGA
ACTTGCACTCTAACTCGACCTCTACATCAACAGGCTTCCAATGCTCTTCAAATTTTAC
TGTC AAGTAGACCCATACGGCTGTAATATGCTGCTCTTCATAATGTAAGCTTATCTTT
ATCGAATCGTGTGAAAACTACTACCGCGATAAACCTTTACGGTTCCTGAGATTGA
ATTAGTTCCTTTAGTATATGATACAAGACACTTTTGAACCTTTGTACGACGAATTTTGA
GGTTCGCCATCCTCTGGCTATTTCCAATTATCCTGTCGGCTATTATCTCCGCCTCAGT
TTGATCTTCCGCTTCAGACTGCCATTTTTTCACATAATGAATCTATTTACCCCCACAAT
CCTTCATCCGCCTCCGCATCTTGTTCCGTAAACTATTGACTTCATGTTGTACATTGT

TTAGTTCACGAGAAGGGTCCTCTTCAGGCGGTAGCTCCTGATCTCCTATATGACCTTT
 ATCCTGTTCTCTTTCCACAACTTAGAAATGTATTCATGAATTATGGAGCACCTAAT
 AACATTCTTCAAGGCGGAGAAGTTTGGGCCAGATGCCCAATATGCTTGACATGAAA
 ACGTGAGAATGAATTTAGTATTATTGTGATATTCTGAGGCAATTTTATTATAATCTCG
 AAGATAAGAGAAGAATGCAGTGACCTTTGTATTGACAAATGGAGATTCCATGTATC
 TAAAAAATACGCCTTTAGGCCTTCTGATACCCTTTCCCCTGCGGTTTAGCGTGCCTTT
 TACATTAATATCTAAACCCTCTCCGATGGTGGCCTTTAACTGACTAATAAATGCAAC
 CGATATAAACTGTGATAATTCTGGGTGATTTATGATTTCGATCGACAATTGTATTGTA
 CACTAGTGCAGGATCAGGCCAATCCAGTTCCTTTTTCAATTACCGGTGTGTCGTCTGT
 ATTCAGTACATGTCCAACAAATGCAAATGCTAACGTTTTGTATTTCTTATAATTGTCA
 GGAACCTGGAAAAGTCCCCCTTGTCGTCTCGATTACACACCTACTTTTCATCGTACACC
 ATAGGTTGGAAGTGCTGCATAATACATTGCTTAATACAAGCAAGCAGTCTCTCGCCA
 TTCATATTTTCAGTTATTTTCCATTACAGCTGATGTCATTGTATATCAGCGCTGTAAAA
 ATCTATCTGTTACAGAAGGTTTTCGCGGTTTTTATAAACAAAACCTTTTCGTTACGAAAT
 CGAGCAATCACCCCAGCTGCGTATTTGGAAATTCGGGAAAAAGTAGAGCAACGCGA
 GTTGCATTTTTTACACCATAATGCATGATTAACCTTCGAGAAGGGATTAAGGCTAATT
 TCACTAGTATGTTTCAAAAACCTCAATCTGTCCATTGAATGCCTTATAAAACAGCTA
 TAGATTGCATAGAAGAGTTAGCTACTCAATGCTTTTTGTCAAAGCTTACTGATGATG
 ATGTGTCTACTTTCAGGCGGGTCTGTAGTAAGGAGAATGACATTATAAAGCTGGCAC
 TTAGAATTCCACGGACTATAGACTATACTAGTATACTCCGTCTACTGTACGATACAC
 TTCCGCTCAGGTCCTTGTCCTTTAACGAGGCCTTACCACTCTTTTGTTACTCTATTGA
 TCCAGCTCAGCAAAGGCAGTGTGATCTAAGATTCTATCTTCGCGATGTAGTAAACT
 AGCTAGACCGAGAAAGAGACTAGAAATGCAAAAGGCACTTCTACAATGGCTGCCAT
 CATTATTATCCGATGTGACGCTGCA (SEQ ID NO:7)

Полинуклеотидная последовательность yCDS варианта No. 73

TTGGATAACGGGTTAGCCCGTACACCTACTATGGGTTGGCTTCACTGGGAAA
 GATTCATGTGTAACCTAGATTGCCAAGAAGAGCCTGACAGCTGTATCTCAGAGAAA
 CTATTCATGGAGATGGCTGAACTAATGGTAAGTGAAGGATGGAAGGATGCTGGTTA
 TGAATACCTATGTATTGATGATTGCTGGATGGCTCCACAGCGTGATTCAGAAGGTAG
 GTTACAAGCTGACCCCCAGAGATTCCCACATGGCATAACGTCAGCTTGCAAACCTACGT
 ACACAGCAAGGGTCTAAAGTTAGGCATCTACGCTGATGTCGGAAACAAGACATGTG
 CTGGTTTCCCAGGTTCAATTCGGTTACTATGACATAGATGCGCAGACGTTTGCTGATT
 GGGGTGTTGATTTGTTGAAGTTTGATGGATGCTACTGCGATTCCCTGGAGAACCTAG
 CCGATGGGTACAAACACATGAGTTTGGCTCTAAACAGGACTGGTAGGAGCATCGTC
 TATAGTTGTGAATGGCCCTTGACATGTGGCCGTTTCAGAAGCCAAACTACACTGAG
 ATAAGACAATACTGTAACCATTGGCGTAACTTTGCTGACATAGATGATTCATGGGCT
 TCAATCAAATCTATCTTGGATTGGACTTCTTTCAACCAGGAAAGAATTGTTGATGTT
 GCAGGTCCAGGTGGATGGAATGACCCTGATATGCTTGTCATAGGGAACCTTTGGGCTA
 TCATGGAATCAACAAGTTACACAAATGGCTTTGTGGGCGATCATGGCCGCACCCCTA
 TTCATGTCTAATGATCTACGTCACATATCACCCAAGCAAAGGCTTTACTTCAAGAT

AAGGATGTCATAGCGATCAACCAAGATCCTCTTGGTAAACAAGGTTATCAATTGAG
ACAAGGTGACAACCTTTGAAGTGTGGGAAAGACCATTGTCTGGACTTGCGTGGGCTG
TTGCTATGATCAACCGTCAAGAGATCGGAGGGCCAAGATCTTACACTATCGCGGTA
GCCTCTTTGGGTAAGGGTGTTCGTGCAATCCTGCCTGCTTCATTACACAATTGCTTC
CAGTTAAGAGAAAGTTGGGTTTCTATGAGTGGACATCTAGGCTAAGAAGTCACATC
AATCCTACTGGTACGGTATTGTTGCAATTGGAGAACACAATGCAAATGTCTTTGAAA
GATTTGTTA (SEQ ID NO:8)

Полинуклеотидная последовательность варианта No. 73

CTGGACAATGGATTGGCAAGGACGCCTACCATGGGCTGGCTGCACTGGGAGC
GCTTCATGTGCAACCTTGACTGCCAGGAAGAGCCAGATTCCTGCATCAGTGAGAAG
CTCTTCATGGAGATGGCAGAGCTCATGGTCTCAGAAGGCTGGAAGGATGCAGGTTA
TGAGTACCTCTGCATTGATGACTGTTGGATGGCTCCCCAAAGAGATTCAGAAGGCAG
ACTTCAGGCAGACCCTCAGCGCTTTCCTCATGGGATTCGCCAGCTAGCTAATTATGT
TCACAGCAAAGGACTGAAGCTAGGGATTTATGCAGATGTTGGAAATAAAACCTGCG
CAGGCTTCCCTGGGAGTTTTGGATACTACGACATTGATGCCCAGACCTTTGCTGACT
GGGGAGTAGATCTGCTAAAATTTGATGGTTGTTACTGTGACAGTTTGGAAAATTTGG
CAGATGGTTATAAGCACATGTCCTTGGCCCTGAATAGGACTGGCAGAAGCATTGTGT
ACTCCTGTGAGTGGCCTCTTTATATGTGGCCCTTTCAAAGCCCAATTATACAGAAA
TCCGACAGTACTGCAATCACTGGCGAAATTTTGCTGACATTGATGATTCCTGGGCGA
GTATAAAGAGTATCTTGGACTGGACATCTTTTAACCAGGAGAGAATTGTTGATGTTG
CTGGACCAGGGGGTTGGAATGACCCAGATATGTTAGTGATTGGCAACTTTGGCCTCA
GCTGGAATCAGCAAGTAACTCAGATGGCCCTCTGGGCTATCATGGCTGCTCCTTTAT
TCATGTCTAATGACCTCCGACACATCAGCCCTCAAGCCAAAGCTCTCCTTCAGGATA
AGGACGTAATTGCCATCAATCAGGACCCCTTGGGCAAGCAAGGGTACCAGCTTAGA
CAGGGAGACAACCTTTGAAGTGTGGGAACGACCTCTCTCAGGCTTAGCCTGGGCTGT
AGCTATGATAAACCGGCAGGAGATTGGTGGACCTCGCTCTTATACCATCGCAGTTGC
TTCCCTGGGTAAAGGAGTGGCCTGTAATCCTGCCTGCTTCATCACACAGCTCCTCCC
TGTGAAAAGGAAGCTAGGGTTCTATGAATGGACTTCAAGGTAAAGAAGTCACATAA
ATCCACAGGCACTGTTTTGCTTCAGCTAGAAAATACAATGCAGATGTCATTAAAAG
ACTTACTT (SEQ ID NO:9)

Полинуклеотидная последовательность варианта No. 73:

LDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLDCQEEPDCISEKLFMEMAELMVSEGWKD
AGYEYLCIDDCWMA PQRDSEGR LQADPQRFPHGIRQLANYVHSGKGLKGIYADVGNKT
CAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGV DLLKFDG CYCDSLENLADGYKHMSLALNRTGRSIV
YSCEWPLYMWP FQKPNYTEIRQYCNHWRNFADIDDS WASIKSILDWTSFNQERIVDVA
GPGGWNDP DMLVIGNFGLSWNQV TQMALWAIMAAPLFMSNDLRHISPQAKALLQDK
DVIAINQDPLGKQGYQLRQGD NFEVWERPLSG LAWAVAMINRQEIGGPRSYTIAVASLG
KGVACNPACFITQLLPVKRKLGFYEWTSRLRSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL
(SEQ ID NO:10)

Полинуклеотидная последовательность yCDS варианта No. 218:

TTGGATAACGGGTTAGCCCGTACACCTACTATGGGTTGGCTTCACTGGGAAA
 GATTCATGTGTAACCTTAGATTGCCAAGAAGAGCCTGACAGCTGTATCTCAGAGAAA
 CTATTCATGGAGATGGCTGAACTAATGGTAAGTGAAGGATGGAAGGATGCTGGTTA
 TGAATACCTATGTATTGATGATTGCTGGATGGCTCCACAGCGTGATTCAGAAGGTAG
 GTTACAAGCTGACCCCCAGAGATTCCCACATGGCATAACGTCAGCTTGCAAACCTACGT
 ACACAGCAAGGGTCTAAAGTTAGGCATCTACGCTGATGTCGGAAACAAGACATGTG
 CTGGTTTCCCAGGTTCAATTCGGTTACTATGACATAGATGCGCAGACGTTTGCTGATT
 GGGGTGTTGATTTGTTGAAGTTTGATGGATGCTACTGCGATTCCCTGGAGAACCTAG
 CCGATGGGTACAAACACATGAGTTTGGCTCTAAACAGGACTGGTAGGAGCATCGTC
 TATAGTTGTGAATGGCCCTTGACATGTGGCCGTTTCAGAAGCCAAACTACACTGAG
 ATAAGACAATACTGTAACCATTGGCGTAACTTTGCTGACATAGATGATTCATGGGCT
 TCAATCAAATCTATCTTGGATTGGACTTCTTTCAACCAGGAAAGAATTGTTGATGTT
 GCAGGTCCAGGTGGATGGAATGACCCTGATATGCTTGTTCATAGGGAACCTTTGGGCTA
 TCATGGAATCAACAAGTTACACAAATGGCTTTGTGGGCGATCATGGCCGCACCCCTA
 TTCATGTCTAATGATCTACGTCACATATCACCCCAAGCAAAGGCTTTACTTCAAGAT
 AAGGATGTCATAGCGATCAACCAAGATCCTCTTGGTAAACAAGGTTATCAATTGAG
 ACAAGGTGACAACCTTTGAAGTGTGGGAAAGACCATTGTCTGGACTTGCGTGGGCTG
 TTGCTATTATCAACCGTCAAGAGATCGGAGGGCCAAGATCTTACACTATCGCGGTAG
 CCTCTTTGGGTAAGGGTGTGCGTGCAATCCTGCCTGCTTCATTACACAATTGCTTCC
 AGTTAAGAGAAAGTTGGGTTTCTATAACTGGACATCTAGGCTAAAAAGTCACATTA
 ATCCTACTGGTACGGTATTGTTGCAATTGGAGAACACAATGCAAATGTCTTTGAAAG
 ATTTGTTA (SEQ ID NO:11)

Полинуклеотидная последовательность hCDS варианта No. 218:

CTGGACAATGGATTGGCAAGGACGCCTACCATGGGCTGGCTGCACTGGGAGC
 GCTTCATGTGCAACCTTGACTGCCAGGAAGAGCCAGATTTCCTGCATCAGTGAGAAG
 CTCTTCATGGAGATGGCAGAGCTCATGGTCTCAGAAGGCTGGAAGGATGCAGGTTA
 TGAGTACCTCTGCATTGATGACTGTTGGATGGCTCCCCAAAGAGATTCAGAAGGCAG
 ACTTCAGGCAGACCCTCAGCGCTTTCCTCATGGGATTCGCCAGCTAGCTAATTATGT
 TCACAGCAAAGGACTGAAGCTAGGGATTTATGCAGATGTTGGAAATAAAACCTGCG
 CAGGCTTCCCTGGGAGTTTTGGATACTACGACATTGATGCCCAGACCTTTGCTGACT
 GGGGAGTAGATCTGCTAAAATTTGATGGTTGTTACTGTGACAGTTTGGAATAATTTGG
 CAGATGGTTATAAGCACATGTCCTTGGCCCTGAATAGGACTGGCAGAAGCATTGTGT
 ACTCCTGTGAGTGGCCTCTTTATATGTGGCCCTTTCAAAGCCCAATTATACAGAAA
 TCCGACAGTACTGCAATCACTGGCGAAATTTTGCTGACATTGATGATTCCTGGGCGA
 GTATAAAGAGTATCTTGGACTGGACATCTTTTAACCAGGAGAGAATTGTTGATGTTG
 CTGGACCAGGGGGTTGGAATGACCCAGATATGTTAGTGATTGGCAACTTTGGCCTCA
 GCTGGAATCAGCAAGTAACTCAGATGGCCCTCTGGGCTATCATGGCTGCTCCTTTAT
 TCATGTCTAATGACCTCCGACACATCAGCCCTCAAGCCAAAGCTCTCCTTCAGGATA
 AGGACGTAATTGCCATCAATCAGGACCCCTTGGGCAAGCAAGGGTACCAGCTTAGA
 CAGGGAGACAACCTTTGAAGTGTGGGAACGACCTCTCTCAGGCTTAGCCTGGGCTGT

AGCTATTATAAAACCGGCAGGAGATTGGTGGACCTCGCTCTTATACCATCGCAGTTGC
 TTCCCTGGGTAAAGGAGTGGCCTGTAATCCTGCCTGCTTCATCACACAGCTCCTCCC
 TGTGAAAAGGAAGCTAGGGTTCTATAACTGGACTTCAAGGTTAAAAAGTCACATAA
 ATCCCACAGGCACTGTTTTGCTTCAGCTAGAAAATACAATGCAGATGTCATTAAAAAG
 ACTTACTT (SEQ ID NO:12)

Полинуклеотидная последовательность варианта No. 218:

LDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLDCQEEDSCISEKLFMEMAELMVSEGWKD
 AGYEYLCIDDCWMA PQRDSEGR LQADPQRFPHGIRQLANYVHSKGLKLG IYADVGNKT
 CAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGV DLLKFDG CYCDSLENLADGYKHMSLALNRTGRSIV
 YSCEWPLYMWPFQKPNYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWASIKSILDWTSFNQERIVDVA
 GPGGWNDPDM LVIGNFGLSWNQVTQMALWAIMAAPLFMSNDLRHISPAKALLQDK
 DVIAINQDPLGKQGYQLRQGDNF EVWERPLSGLAWAVAIINRQEIGGPRSYTIAVASLG
 KGVACNPACFITQLLPVKRKLGFYNWTSRLKSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL
 (SEQ ID NO:13)

Полинуклеотидная последовательность yCDS варианта No. 326:

TTGGATAACGGGTTAGCCCGTACACCTACTATGGGTTGGCTTCACTGGGAAA
 GATTCATGTGTAACCTAGATTGCCAAGAAGAGCCTGACAGCTGTATCTCAGAGAAA
 CTATTCATGGAGATGGCTGAACGGATGGTAAGTGAAGGATGGAAGGATGCTGGTTA
 TGAATACCTATGTATTGATGATTGCTGGATGGCTCCACAGCGTGATTCAGAAGGTAG
 GTTACAAGCTGACCCCCAGAGATTCCCACATGGCATA CGTCAGCTTGCAA ACTACGT
 ACACAGCAAAGGTCTAAAGTTAGGCATCTACGCTGATGTCGGAAACAAGACATGTG
 CTGGTTTCCCAGGTTCA TTCGGTTACTATGACATAGATGCGCAGACGTTTGCTGATT
 GGGGTGTTGATTTGTTGAAGTTTGATGGATGCTACTGCGATTCCCTGGAGAACCTAG
 CCGATGGGTACAAACACATGAGTTTGGCTCTAAACAGGACTGGTAGGAGCATCGTC
 TATAGTTGTGAATGGCCCTTG TACATGTGGCCGTTTCAGAAGCCAACTACACTGAG
 ATAAGACAATACTGTAACCATTGGCGTAACTTTGCTGACATAGATGATTCATGGGCT
 TCAATCAAATCTATCTTGGATTGGACTTCTCGTAACCAGGAAAGAATTGTTGATGTT
 GCAGGTCCAGGTGGATGGAATGACCCTGATATGCTTGTCATAGGGA ACTTTGGGCTA
 TCATGGGACCAACAAGTTACACAAATGGCTTTGTGGGCGATCATGGCCGCACCCCTA
 TTCATGTCTAATGATCTACGTCACATATCACCCCAAGCAAAGGCTTTACTTCAAGAT
 AAGGATGTCATAGCGATCAACCAAGATCCTCTTGGTAAACAAGGTTATCAATTGAG
 AAAAGGTGACAACTTTGAAGTGTGGGAAAGACCATTGTCTGGAGATGCGTGGGCTG
 TTGCTATTATCAACCGTCAAGAGATCGGAGGGCCAAGATCTTACACTATCCCGGTAG
 CCTCTTTGGGTAAGGGTGTTGCGTGCAATCCTGCCTGCTTCATTACACAATTGCTTCC
 AGTTAAGAGACAATTGGGTTTCTATAACTGGACCTCTAGGCTAAAAAGTCACATTAA
 TCCTACTGGTACGGTATTGTTGCAATTGGAGAACACAATGCAAATGTCTTTGAAAGA
 TTTGTTA (SEQ ID NO:14)

Полипептидная последовательность варианта No. 326:

LDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLDCQEEDSCISEKLFMEMAERMVSEGWKD
 AGYEYLCIDDCWMA PQRDSEGR LQADPQRFPHGIRQLANYVHSKGLKLG IYADVGNKT

CAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGVDLLKFDGNCYDSLENLADGYKHMSLALNRTGRSIV
 YSCEWPLYMWPFQKPNYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWASIKSILDWTSRNQERIVDVA
 GPGGWNDPDMLVIGNFGLSWDQQVTQMALWAIMAAPLFMSNDLRHISPQAKALLQDK
 DVIAINQDPLGKQGYQLRKGDNFVWERPLSGDAWAVAIINRQEIGGPRSYTIPVASLG
 KGVACNPACFITQLLPVKRQLGFYNWTSRLKSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL
 (SEQ ID NO:15)

Полинуклеотидная последовательность yCDS варианта No. 206:

TTGGATAACGGGTTAGCCCGTACACCTACTATGGGTTGGCTTCACTGGGAAA
 GATTCATGTGTAACCTAGATTGCCAAGAAGAGCCTGACAGCTGTATCTCAGAGAAA
 CTATTCATGGAGATGGCTGAACTAATGGTAAGTGAAGGATGGAAGGATGCTGGTTA
 TGAATACCTATGTATTGATGATTGCTGGATGGCTCCACAGCGTGATTCAGAAGGTAG
 GTTACAAGCTGACCCCCAGAGATTCCCACATGGCATACTGTCAGCTTGCAAACCTACGT
 ACACAGCAAGGGTCTAAAGTTAGGCATCTACGCTGATGTCGGAAACAAGACATGTG
 CTGGTTTCCCAGGTTCAATTCGGTTACTATGACATAGATGCGCAGACGTTTGCTGATT
 GGGGTGTTGATTTGTTGAAGTTTGATGGATGCTACTGCGATTCCCTGGAGAACCTAG
 CCGATGGGTACAAACACATGAGTTTGGCTCTAAACAGGACTGGTAGGAGCATCGTC
 TATAGTTGTGAATGGCCCTTGACATGTGGCCGTTTCAGAAGCCAAACTACACTGAG
 ATAAGACAATACTGTAACCATTGGCGTAACTTTGCTGACATAGATGATTCATGGGCT
 TCAATCAAATCTATCTTGGATTGGACTTCTTTCAACCAGGAAAGAATTGTTGATGTT
 GCAGGTCCAGGTGGATGGAATGACCCTGATATGCTTGTTCATAGGGAACTTTGGGCTA
 TCATGGAATCAACAAGTTACACAAATGGCTTTGTGGGCGATCATGGCCGCACCCCTA
 TTCATGTCTAATGATCTACGTCACATATCACCCCAAGCAAAGGCTTTACTTCAAGAT
 AAGGATGTCATAGCGATCAACCAAGATCCTCTTGGTAAACAAGGTTATCAATTGAG
 ACAAGGTGACAACCTTTGAAGTGTGGGAAAGACCATTGTCTGGACTTGCGTGGGCTG
 TTGCTATGATCAACCGTCAAGAGATCGGAGGGCCAAGATCTTACACTATCGCGGTA
 GCCTCTTTGGGTAAGGGTGTGCGTGCAATCCTGCCTGCTTCATTACACAATTGCTTC
 CAGTTAAGAGAAAGTTGGGTTTCTATAATTGGACCTCTAGGCTAAGAAGTCACATCA
 ATCCTACTGGTACGGTATTGTTGCAATTGGAGAACACAATGCAAATGTCTTTGAAAG
 ATTTGTTA (SEQ ID NO:16)

Полинуклеотидная последовательность hCDS варианта No. 206:

CTGGACAATGGATTGGCAAGGACGCCTACCATGGGCTGGCTGCACTGGGAGC
 GCTTCATGTGCAACCTTGACTGCCAGGAAGAGCCAGATTCCTGCATCAGTGAGAAG
 CTCTTCATGGAGATGGCAGAGCTCATGGTCTCAGAAGGCTGGAAGGATGCAGGTTA
 TGAGTACCTCTGCATTGATGACTGTTGGATGGCTCCCCAAAGAGATTCAGAAGGCAG
 ACTTCAGGCAGACCCTCAGCGCTTTCCTCATGGGATTCGCCAGCTAGCTAATTATGT
 TCACAGCAAAGGACTGAAGCTAGGGATTTATGCAGATGTTGGAAATAAAACCTGCG
 CAGGCTTCCCTGGGAGTTTTGGATACTACGACATTGATGCCCAGACCTTTGCTGACT
 GGGGAGTAGATCTGCTAAAATTTGATGGTTGTTACTGTGACAGTTTGGAAAATTTGG
 CAGATGGTTATAAGCACATGTCCTTGGCCCTGAATAGGACTGGCAGAAGCATTGTGT
 ACTCCTGTGAGTGGCCTCTTTATATGTGGCCCTTTCAAAAGCCCAATTATACAGAAA

TCCGACAGTACTGCAATCACTGGCGAAATTTTGCTGACATTGATGATTCCTGGGCGA
GTATAAAGAGTATCTTGGACTGGACATCTTTTAACCAGGAGAGAATTGTTGATGTTG
CTGGACCAGGGGGTTGGAATGACCCAGATATGTTAGTGATTGGCAACTTTGGCCTCA
GCTGGAATCAGCAAGTAACTCAGATGGCCCTCTGGGCTATCATGGCTGCTCCTTTAT
TCATGTCTAATGACCTCCGACACATCAGCCCTCAAGCCAAAGCTCTCCTTCAGGATA
AGGACGTAATTGCCATCAATCAGGACCCCTTGGGCAAGCAAGGGTACCAGCTTAGA
CAGGGAGACAACTTTGAAGTGTGGGAACGACCTCTCTCAGGCTTAGCCTGGGCTGT
AGCTATGATAAACCGGCAGGAGATTGGTGGACCTCGCTCTTATACCATCGCAGTTGC
TTCCCTGGGTAAAGGAGTGGCCTGTAATCCTGCCTGCTTCATCACACAGCTCCTCCC
TGTGAAAAGGAAGCTAGGGTTCTATAACTGGACTTCAAGGTAAAGAAGTCACATAA
ATCCCACAGGCACTGTTTTGCTTCAGCTAGAAAATACAATGCAGATGTCATTAAAAG
ACTTACTT (SEQ ID NO:17)

Полипептидная последовательность варианта No. 206:

LDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLDCQEEPSCISEKLFMEMAELMVSEGWKD
AGYEYLCIDDCWMA PQRDSEGR LQADPQRPHGIRQLANYVHSGKGLKGIYADVGNKT
CAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGV DLLKFDGCYCD SLENLADGYKHMSLALNRTGRSIV
YSCEWPLYMWPFQKPNYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWASIKSILDWTSFNQERIVDVA
GPGGWNDP DMLVIGNFGLSWNQV TQMALWAIMAAPLFMSNDLRHISPQAKALLQDK
DVIAINQDPLGKQGYQLRQGDNF EVWERPLSGLAWAVAMINRQEIGGPRSYTIAVASLG
KGVACNPACFITQLLPVKRKLGFYNWTSRLRSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL
(SEQ ID NO:18)

Полинуклеотидная последовательность yCDS варианта No. 205

TTGGATAACGGGTTAGCCCGTACACCTACTATGGGTTGGCTTCACTGGGAAA
GATTCATGTGTAACCTTAGATTGCCAAGAAGAGCCTGACAGCTGTATCTCAGAGAAA
CTATTCATGGAGATGGCTGAACTAATGGTAAGTGAAGGATGGAAGGATGCTGGTTA
TGAATACCTATGTATTGATGATTGCTGGATGGCTCCACAGCGTGATTCAGAAGGTAG
GTTACAAGCTGACCCCCAGAGATTCCACATGGCATAACGTCAGCTTGCAAACCTACGT
ACACAGCAAGGGTCTAAAGTTAGGCATCTACGCTGATGTCGGAAACAAGACATGTG
CTGGTTTCCCAGGTTCAATTCGGTTACTATGACATAGATGCGCAGACGTTTGCTGATT
GGGGTGTGATTTGTTGAAGTTTGATGGATGCTACTGCGATTCCCTGGAGAACCTAG
CCGATGGGTACAAACACATGAGTTTGCTCTAAACAGGACTGGTAGGAGCATCGTC
TATAGTTGTGAATGGCCCTTGACATGTGGCCGTTTCAGAAGCCAACTACACTGAG
ATAAGACAATACTGTAACCATTGGCGTAACTTTGCTGACATAGATGATTCATGGGCT
TCAATCAAATCTATCTTGGATTGGACTTCTTTCAACCAGGAAAGAATTGTTGATGTT
GCAGGTCCAGGTGGATGGAATGACCCTGATATGCTTGTCATAGGGAACCTTTGGGCTA
TCATGGAATCAACAAGTTACACAAATGGCTTTGTGGGCGATCATGGCCGCACCCCTA
TTCATGTCTAATGATCTACGTCACATATCACCCCAAGCAAAGGCTTTACTTCAAGAT
AAGGATGTCATAGCGATCAACCAAGATCCTCTTGGTAAACAAGGTTATCAATTGAG
ACAAGGTGACAACTTTGAAGTGTGGGAAAGACCATTGTCTGGACTTGCGTGGGCTG
TTGCTATGATCAACCGTCAAGAGATCGGAGGGCCAAGATCTTACACTATCGCGGTA

GCCTCTTTGGGTAAGGGTGTTCGCTGCAATCCTGCCTGCTTCATTACACAATTGCTTC
CAGTTAAGAGAAAGTTGGGTTTCTATGATTGGGACTCTAGGCTAAGAAGTCACATCA
ATCCTACTGGTACGGTATTGTTGCAATTGGAGAACACAATGCAAATGTCTTTGAAAG
ATTTGTTA (SEQ ID NO:19)

Полинуклеотидная последовательность hCDS варианта No. 205:

CTGGACAATGGATTGGCAAGGACGCCTACCATGGGCTGGCTGCACTGGGAGC
GCTTCATGTGCAACCTTGACTGCCAGGAAGAGCCAGATTTCCTGCATCAGTGAGAAG
CTCTTCATGGAGATGGCAGAGCTCATGGTCTCAGAAGGCTGGAAGGATGCAGGTTA
TGAGTACCTCTGCATTGATGACTGTTGGATGGCTCCCCAAAGAGATTCAGAAGGCAG
ACTTCAGGCAGACCCTCAGCGCTTTCCTCATGGGATTCGCCAGCTAGCTAATTATGT
TCACAGCAAAGGACTGAAGCTAGGGATTTATGCAGATGTTGGAAATAAAACCTGCG
CAGGCTTCCCTGGGAGTTTTGGATACTACGACATTGATGCCCAGACCTTTGCTGACT
GGGGAGTAGATCTGCTAAAATTTGATGGTTGTTACTGTGACAGTTTGGAATAATTTGG
CAGATGGTTATAAGCACATGTCCTTGGCCCTGAATAGGACTGGCAGAAGCATTGTGT
ACTCCTGTGAGTGGCCTCTTTATATGTGGCCCTTTCAAAGCCCAATTATACAGAAA
TCCGACAGTACTGCAATCACTGGCGAAATTTTGCTGACATTGATGATTCCTGGGCGA
GTATAAAGAGTATCTTGGACTGGACATCTTTTAACCAGGAGAGAATTGTTGATGTTG
CTGGACCAGGGGGTTGGAATGACCCAGATATGTTAGTGATTGGCAACTTTGGCCTCA
GCTGGAATCAGCAAGTAACTCAGATGGCCCTCTGGGCTATCATGGCTGCTCCTTTAT
TCATGTCTAATGACCTCCGACACATCAGCCCTCAAGCCAAAGCTCTCCTTCAGGATA
AGGACGTAATTGCCATCAATCAGGACCCCTTGGGCAAGCAAGGGTACCAGCTTAGA
CAGGGAGACAACTTTGAAGTGTGGGAACGACCTCTCTCAGGCTTAGCCTGGGCTGT
AGCTATGATAAACCAGGAGATTGGTGGACCTCGCTCTTATACCATCGCAGTTGC
TTCCCTGGGTAAAGGAGTGGCCTGTAATCCTGCCTGCTTCATCACACAGCTCCTCCC
TGTGAAAAGGAAGCTAGGGTTCTATGATTGGGATTCAAGGTAAAGAAGTCACATAA
ATCCCACAGGCACTGTTTTGCTTCAGCTAGAAAATACAATGCAGATGTCATTAAG
ACTTACTT (SEQ ID NO: 20)

Полипептидная последовательность варианта No. 205:

LDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLDCQEEDSCISEKLFMEMAELMVSEGWKD
AGYEYLCIDDCWMA PQRDSEGR LQADPQRFPHGIRQLANYVHSKGLKLG IYADVGNKT
CAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGV DLLKFDG CYCDSLENLADGYKHMSLALNRTGRSIV
YSCEWPLYMWPFQKPNYTEIRQYCNHWRFADIDDSWASIKSILDWTSFNQERIVDVA
GPGGWNDPDM LVIGNFGLSWNQVTQMALWAIMAAPLFMSNDLRHISPQAKALLQDK
DVIAINQDPLGKQGYQLRQGDNF EVWERPLSGLAWAVAMINRQEIGGPRSYTIAVASLG
KGVACNPACFITQLLPVKRKLGFYDWDSRLRSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL
(SEQ ID NO: 21)

Полинуклеотидная последовательность yCDS варианта No. 76:

TTGGATAACGGGTTAGCCCGTACACCTACTATGGGTTGGCTTCACTGGGAAA
GATTCATGTGTAACCTAGATTGCCAAGAAGAGCCTGACAGCTGTATCTCAGAGAAA
CTATTCATGGAGATGGCTGAACTAATGGTAAGTGAAGGATGGAAGGATGCTGGTTA

TGAATACCTATGTATTGATGATTGCTGGATGGCTCCACAGCGTGATTTCAGAAGGTAG
 GTTACAAGCTGACCCCCAGAGATTCCCACATGGCATAACGTCAGCTTGCAAACCTACGT
 ACACAGCAAGGGTCTAAAGTTAGGCATCTACGCTGATGTCGGAAACAAGACATGTG
 CTGGTTTCCCAGGTTTCATTTCGGTTACTATGACATAGATGCGCAGACGTTTGCTGATT
 GGGGTGTTGATTTGTTGAAGTTTGATGGATGCTACTGCGATTCCCTGGAGAACCTAG
 CCGATGGGTACAAACACATGAGTTTGGCTCTAAACAGGACTGGTAGGAGCATCGTC
 TATAGTTGTGAATGGCCCTTGTACATGTGGCCGTTTCAGAAGCCAAACTACACTGAG
 ATAAGACAATACTGTAACCATTGGCGTAACTTTGCTGACATAGATGATTCATGGAGG
 TCAATCAAATCTATCTTGGATTGGACTTCTTTCAACCAGGAAAGAATTGTTGATGTT
 GCAGGTCCAGGTGGATGGAATGACCCTGATATGCTTGTTCATAGGGAACTTTGGGCTA
 TCATGGAATCAACAAGTTACACAAATGGCTTTGTGGGCGATCATGGCCGCACCCCTA
 TTCATGTCTAATGATCTACGTCACATATCACCCCAAGCAAAGGCTTTACTTCAAGAT
 AAGGATGTCATAGCGATCAACCAAGATCCTCTTGGTAAACAAGGTTATCAATTGAG
 ACAAGGTGACAACTTTGAAGTGTGGGAAAGACCATTGTCTGGACTTGCGTGGGCTG
 TTGCTATGATCAACCGTCAAGAGATCGGAGGGCCAAGATCTTACACTATCGCGGTA
 GCCTCTTTGGGTAAGGGTGTTCGCTGCAATCCTGCCTGCTTCATTACACAATTGCTTC
 CAGTTAAGAGAAAGTTGGGTTTCTATGAGTGGACATCTAGGCTAAGAAGTCACATC
 AATCCTACTGGTACGGTATTGTTGCAATTGGAGAACACAATGCAAATGTCTTTGAAA
 GATTTGTTA (SEQ ID NO: 22)

Полинуклеотидная последовательность hCDS варианта No. 76:

CTGGACAATGGATTGGCAAGGACGCCTACCATGGGCTGGCTGCACTGGGAGC
 GCTTCATGTGCAACCTTGACTGCCAGGAAGAGCCAGATTCCTGCATCAGTGAGAAG
 CTCTTCATGGAGATGGCAGAGCTCATGGTCTCAGAAGGCTGGAAGGATGCAGGTTA
 TGAGTACCTCTGCATTGATGACTGTTGGATGGCTCCCCAAAGAGATTCAGAAGGCAG
 ACTTCAGGCAGACCCTCAGCGCTTTCCTCATGGGATTCGCCAGCTAGCTAATTATGT
 TCACAGCAAAGGACTGAAGCTAGGGATTTATGCAGATGTTGGAAATAAAACCTGCG
 CAGGCTTCCCTGGGAGTTTGGATACTACGACATTGATGCCAGACCTTTGCTGACT
 GGGGAGTAGATCTGCTAAAATTTGATGGTTGTTACTGTGACAGTTTGGAAAATTTGG
 CAGATGGTTATAAGCACATGTCCTTGGCCCTGAATAGGACTGGCAGAAGCATTGTGT
 ACTCCTGTGAGTGGCCTCTTTATATGTGGCCCTTTCAAAGCCCAATTATACAGAAA
 TCCGACAGTACTGCAATCACTGGCGAAATTTTGTGACATTGATGATTCCTGGCGTA
 GTATAAAGAGTATCTTGGACTGGACATCTTTTAACCAGGAGAGAATTGTTGATGTTG
 CTGGACCAGGGGGTTGGAATGACCCAGATATGTTAGTGATTGGCAACTTTGGCCTCA
 GCTGGAATCAGCAAGTAACTCAGATGGCCCTCTGGGCTATCATGGCTGCTCCTTTAT
 TCATGTCTAATGACCTCCGACACATCAGCCCTCAAGCCAAAGCTCTCCTTCAGGATA
 AGGACGTAATTGCCATCAATCAGGACCCCTTGGGCAAGCAAGGGTACCAGCTTAGA
 CAGGGAGACAACTTTGAAGTGTGGGAACGACCTCTCTCAGGCTTAGCCTGGGCTGT
 AGCTATGATAAACCGGCAGGAGATTGGTGGACCTCGCTCTTATACCATCGCAGTTGC
 TTCCCTGGGTAAAGGAGTGGCCTGTAATCCTGCCTGCTTCATCACACAGCTCCTCCC
 TGTGAAAAGGAAGCTAGGGTTCTATGAATGGACTTCAAGGTAAAGAAGTCACATAA

ATCCCACAGGCACTGTTTTGCTTCAGCTAGAAAATACAATGCAGATGTCATTAAAAG
ACTTACTT (SEQ ID NO: 23)

Полипептидная последовательность варианта No. 76:

LDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLDCQEEPSCISEKLFMEMAELMVSEGWKD
AGYEYLCIDDCWMA PQRDSEGR LQADPQRFPHGIRQLANYVHSKGLKLG IYADVGNKT
CAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGV DLLKFDG CYCDSLENLADGYKHMSLALNRTGRSIV
YSCEWPLYMWPFQKPNYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWRSIKSILDWTSFNQERIVDVA
GPGGWNDPDM LVIGNFGLSWNQV TQMALWAIMAAPLFMSNDLRHISPQAKALLQDK
DVIAINQDPLGKQGYQLRQGDNFEVWERPLSGLAWAVAMINRQEIGGPRSYTIAVASLG
KGVACNPACFITQLLPVKRKLGFYEWTSRLRSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL
(SEQ ID NO: 24)

Полинуклеотидная последовательность сигнального пептида Mfalpha:

ATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTCGCAGCATCCTCCGCATTA
GCT (SEQ ID NO: 25)

Полипептидная последовательность сигнального пептида Mfalpha:

MRFPSIFTAVLFAASSALA (SEQ ID NO: 26)

Полинуклеотидная последовательность MMO435:

ttaactatcgtgaatacacaggatccaccATGAGATTTCTTCAATTTTTACTG (SEQ ID NO:
27)

Полинуклеотидная последовательность MMO439:

AGTAGGTGTACGGGCTAACCCGTTATCCAAAGCTAATGCGGAGGATGC (SEQ
ID NO: 28)

Полинуклеотидная последовательность MMO514:

TTTTACTGCAGTTTTATTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTTTGGATAACGGGT
TAGCCCG (SEQ ID NO: 29)

Полинуклеотидная последовательность MMO481:

GAGCTAAAAGTACAGTGGGAACAAAGTCGAGGTGCGACTTATAACAAATCTTT
CAAAGACA (SEQ ID NO: 30)

Полинуклеотидная последовательность синтетического сигнального пептида
млекопитающего:

ATGGAATGGAGCTGGGTCTTCTCTTCTCCTGTCAGTAACGACTGGTGTCCA
CTCC (SEQ ID NO: 31)

Полинуклеотидная последовательность LAKE Fw:

CGATCGAAGCTTCGCCACCA (SEQ ID NO: 32)

Полинуклеотидная последовательность обратного Br:

CTTGCCAATCCATTGTCCAGGGAGTGGACACCAGTCGTTA (SEQ ID NO: 33)

Полинуклеотидная последовательность Br Fw:

TAACGACTGGTGTCCACTCCCTGGACAATGGATTGGCAAG (SEQ ID NO: 34)

Полинуклеотидная последовательность hGLA Rv:

CGATCGGCGGCCGCTCAAAGTAAGTCTTTTAATGACA (SEQ ID NO: 35)

Полинуклеотидная последовательность SP-GLA (yCDS):

ATGAGATTTCCCTTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTA
GCTTTGGATAACGGGTTAGCCCGTACACCTACTATGGGTTGGCTTCACTGGGAAAGA
TTCATGTGTAACCTTAGATTGCCAAGAAGAGCCTGACAGCTGTATCTCAGAGAAACTA
TTCATGGAGATGGCTGAACTAATGGTAAGTGAAGGATGGAAGGATGCTGGTTATGA
ATACCTATGTATTGATGATTGCTGGATGGCTCCACAGCGTGATTCAGAAGGTAGGTT
ACAAGCTGACCCCCAGAGATTCCCACATGGCATAACGTCAGCTTGCAAACCTACGTAC
ACAGCAAGGGTCTAAAGTTAGGCATCTACGCTGATGTTCGGAAACAAGACATGTGCT
GGTTTCCCAGGTTTCATTCGGTTACTATGACATAGATGCGCAGACGTTTGCTGATTGG
GGTGTGATTGTTGTTGAAGTTTGATGGATGCTACTGCGATTCCCTGGAGAACCTAGCC
GATGGGTACAAACACATGAGTTTGGCTCTAAACAGGACTGGTAGGAGCATCGTCTA
TAGTTGTGAATGGCCCTTGTACATGTGGCCGTTTCAGAAGCCAAACTACACTGAGAT
AAGACAATACTGTAACCATTGGCGTAACTTTGCTGACATAGATGATTCATGGAAGTC
AATCAAATCTATCTTGGATTGGACTTCTTTCAACCAGGAAAGAATTGTTGATGTTGC
AGGTCCAGGTGGATGGAATGACCCTGATATGCTTGTTCATAGGGAACCTTTGGGCTATC
ATGGAATCAACAAGTTACACAAATGGCTTTGTGGGCGATCATGGCCGCACCCCTATT
CATGTCTAATGATCTACGTCACATATCACCCCAAGCAAAGGCTTTACTTCAAGATAA
GGATGTCATAGCGATCAACCAAGATCCTCTTGGTAAACAAGGTTATCAATTGAGAC
AAGGTGACAACCTTTGAAGTGTGGGAAAGACCATTGTCTGGACTTGCGTGGGCTGTTG
CTATGATCAACCGTCAAGAGATCGGAGGGCCAAGATCTTACACTATCGCGGTAGCC
TCTTTGGGTAAAGGGTGTTCGTGCAATCCTGCCTGCTTCATTACACAATTGCTTCCAG
TTAAGAGAAAGTTGGGTTTCTATGAGTGGACATCTAGGCTAAGAAGTCACATCAATC
CTACTGGTACGGTATTGTTGCAATTGGAGAACACAATGCAAATGTCTTTGAAAGATT
TGTTA (SEQ ID NO: 36)

Полинуклеотидная последовательность MFleader-GLA (yCDS):

ATGAGATTTCCCTTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTA
GCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGC
TGTCATCGGTTACTTAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCC
AACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCT
AAAGAAGAAGGGGTATCTTTGGATAAAAGATTGGATAACGGGTTAGCCCGTACACC
TACTATGGGTTGGCTTCACTGGGAAAGATTCATGTGTAACCTTAGATTGCCAAGAAGA
GCCTGACAGCTGTATCTCAGAGAAACTATTCATGGAGATGGCTGAACTAATGGTAA
GTGAAGGATGGAAGGATGCTGGTTATGAATACCTATGTATTGATGATTGCTGGATGG
CTCCACAGCGTGATTCAGAAGGTAGGTTACAAGCTGACCCCCAGAGATTCCCACAT
GGCATAACGTCAGCTTGCAAACCTACGTACACAGCAAGGGTCTAAAGTTAGGCATCTA
CGCTGATGTTCGGAAACAAGACATGTGCTGGTTTCCCAGGTTTCATTCGGTTACTATGA
CATAGATGCGCAGACGTTTGCTGATTGGGGTGTGATTGTTGTTGAAGTTTGATGGATG
CTACTGCGATTCCCTGGAGAACCTAGCCGATGGGTACAAACACATGAGTTTGGCTCT
AAACAGGACTGGTAGGAGCATCGTCTATAGTTGTGAATGGCCCTTGTACATGTGGCC
GTTTCAGAAGCCAAACTACACTGAGATAAGACAATACTGTAACCATTGGCGTAACTT

TGCTGACATAGATGATTCATGGAAGTCAATCAAATCTATCTTGGATTGGACTTCTTT
 CAACCAGGAAAGAATTGTTGATGTTGCAGGTCCAGGTGGATGGAATGACCCTGATA
 TGCTTGTTCATAGGGAACCTTTGGGCTATCATGGAATCAACAAGTTACACAAATGGCTT
 TGTGGGCGATCATGGCCGCACCCCTATTCATGTCTAATGATCTACGTCACATATCAC
 CCCAAGCAAAGGCTTTACTTCAAGATAAGGATGTCATAGCGATCAACCAAGATCCT
 CTTGGTAAACAAGGTTATCAATTGAGACAAGGTGACAACTTTGAAGTGTGGGAAAG
 ACCATTGTCTGGACTTGCGTGGGCTGTTGCTATGATCAACCGTCAAGAGATCGGAGG
 GCCAAGATCTTACACTATCGCGGTAGCCTCTTTGGGTAAGGGTGTTCGCTGCAATCC
 TGCCTGCTTCATTACACAATTGCTTCCAGTTAAGAGAAAGTTGGGTTTCTATGAGTG
 GACATCTAGGCTAAGAAGTCACATCAATCCTACTGGTACGGTATTGTTGCAATTGGA
 GAACACAATGCAAATGTCTTTGAAAGATTTGTTA (SEQ ID NO: 37)

Полипептидная последовательность MFleader:

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYLDLEGDFDVAVLPS
 NSTNNGLLFINTTASIAAKEEGVSLDKR (SEQ ID NO: 38)

Полинуклеотидная последовательность yCDS варианта No. 395:

TTGGATAACGGGTTAGCCCGTACACCTACTATGGGTTGGCTTCACTGGGAAA
 GATTCATGTGTAACCTAGATTGCCAAGAAGAGCCTGACAGCTGTATCTCAGAGAAA
 CTATTCATGGAGATGGCTGAACGGATGGTAAGTGAAGGATGGAAGGATGCTGGTTA
 TGAATACCTATGTATTGATGATTGCTGGATGGCTCCACAGCGTGATTCAGAAGGTAG
 GTTACAAGCTGACCCCCAGAGATTCCCACATGGCATAACGTCAGCTTGCAAACCATGT
 ACACAGCAAAGGTCTAAAGTTAGGCATCTACGCTGATGTCGGAAACAAGACATGTG
 CTGGTTTCCCAGGTTCAATTCGGTTACTATGACATAGATGCGCAGACGTTTGCTGATT
 GGGGTGTTGATTTGTTGAAGTTTGATGGATGCTACTGCGATTCCCTGGAGAACCTAG
 CCGATGGGTACAAACACATGAGTTTGGCTCTAAACAGGACTGGTAGGAGCATCGTC
 TATAGTTGTGAATGGCCCTTGTACATGTGGCCGTTTCAGAAGCCAACTACACTGAG
 ATAAGACAATACTGTAACCATTGGCGTAACTTTGCTGACATAGATGATTCATGGGCT
 TCAATCAAATCTATCTTGGATTGGACTTCTCGTAACCAGGAAAGAATTGTTGATGTT
 GCAGGTCCAGGTGGATGGAATGACCCTGATATGCTTGTTCATAGGGAACCTTTGGGCTA
 TCATGGGACCAACAAGTTACACAAATGGCTTTGTGGGCGATCATGGCCGCACCCCTA
 TTCATGTCTAATGATCTACGTCACATATCACCCCAAGCAAAGGCTTTACTTCAAGAT
 AAGGATGTCATAGCGATCAACCAAGATCCTCTTGGTAAACAAGGTTATCAATTGAG
 AAAAGGTGACAACTTTGAAGTGTGGGAAAGACCATTGTCTGGAGATGCGTGGGCTG
 TTGCTATTATCAACCGTCAAGAGATCGGAGGGCCAAGATCTTACACTATCCCGGTAG
 CCTCTTTGGGTAAGGGTGTTCGCTGCAATCCTGCCTGCTTCATTACACAATTGCTTCC
 AGTTAAGAGACAATTGGGTTTCTATAACTGGACCTCTAGGCTAAAAAGTCACATTA
 TCCTACTGGTACGGTATTGTTGCAATTGGAGAACACAATGCAAATGTCTTTGAAAGA
 TTTGTTA (SEQ ID NO: 39)

Полипептидная последовательность варианта No. 395:

LDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLDCQEEDSCISEKLFMEMAERMVSEGWKD
 AGYEYLCIDDCWMA PQRDSEGR LQADPQRFPHGIRQLANHVHSGKGLKLG IYADVGNKT

CAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGVDLLKFDGNCYDSLENLADGYKHMSLALNRTGRSIV
 YSCEWPLYMWPFQKPNYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWASIKSILDWTSRNQERIVDVA
 GPGGWNDPDMLVIGNFGLSWDQQVTQMALWAIMAAPLFMSNDLRHISPQAKALLQDK
 DVIAINQDPLGKQGYQLRKGDNFVWERPLSGDAWAVAIINRQEIGGPRSYTIPVASLG
 KGVACNPACFITQLLPVKRQLGFYNWTSRLKSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL
 (SEQ ID NO: 40)

Полинуклеотидная последовательность yCDS варианта No. 402:

TTGGATAACGGGTTAGCCCGTACACCTACTATGGGTTGGCTTCACTGGGAAA
 GATTCATGTGTAACCTAGATTGCCAAGAAGAGCCTGACAGCTGTATCTCAGAGAAA
 CTATTCATGGAGATGGCTGAACGGATGGTAAGTGAAGGATGGAAGGATGCTGGTTA
 TGAATACCTATGTATTGATGATTGCTGGATGGCTCCACAGCGTGATTCAGAAGGTAG
 GTTACAAGCTGACCCCCAGAGATTCCCACATGGCATACTGTCAGCTTGCAAACCTACGT
 ACACAGCAAAGGTCTAAAGTTAGGCATCTACGCTGATGTCGGAAACAAGACATGTG
 CTGGTTTCCCAGGTTCAATTCGGTTACTATGACATAGATGCGCAGACGTTTGCTGATT
 GGGGTGTTGATTTGTTGAAGTTTGATGGATGCTACTGCGATTCCCTGGAGAACCTAG
 CCGATGGGTACAAACACATGAGTTTGGCTCTAAACAGGACTGGTAGGCCGATCGTC
 TATAGTTGTGAATGGCCCTTGACATGTGGCCGTTTCAGAAGCCAAACTACACTGAG
 ATAAGACAATACTGTAACCATTGGCGTAACTTTGCTGACATAGATGATTCATGGGCT
 TCAATCAAATCTATCTTGGATTGGACTTCTCGTAACCAGGAAAGAATTGTTGATGTT
 GCAGGTCCAGGTGGATGGAATGACCCTGATATGCTTGTCATAGGGAACCTTTGGGCTA
 TCATGGGACCAACAAGTTACACAAATGGCTTTGTGGGCGATCATGGCCGCACCCCTA
 TTCATGTCTAATGATCTACGTCACATATCACCCCAAGCAAAGGCTTTACTTCAAGAT
 AAGGATGTCATAGCGATCAACCAAGATCCTCTTGGTAAACAAGGTTATCAATTGAG
 AAAAGGTGACAACCTTTGAAGTGTGGGAAAGACCATTGTCTGGAGATGCGTGGGCTG
 TTGCTATTATCAACCGTCAAGAGATCGGAGGGCCAAGATCTTACACTATCCCGGTAG
 CCTCTTTGGGTAAGGGTGTGCGTGCAATCCTGCCTGCTTCATTACACAATTGCTTCC
 AGTTAAGAGACAATTGGGTTTCTATAACTGGACCTCTAGGCTAAAAAGTCACATTAA
 TCCTACTGGTACGGTATTGTTGCAATTGGAGAACACAATGCAAATGTCTTTGAAAGA
 TTTGTTA (SEQ ID NO: 41)

Полипептидная последовательность варианта No. 402:

LDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLDCQEEPDCISEKLFMEMAERMVSEGWKD
 AGYEYLCIDDCWMA PQRDSEGR LQADPQRFPHGIRQLANYVHSKGLKLG IYADVGNKT
 CAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGVDLLKFDGNCYDSLENLADGYKHMSLALNRTGRPIV
 YSCEWPLYMWPFQKPNYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWASIKSILDWTSRNQERIVDVA
 GPGGWNDPDMLVIGNFGLSWDQQVTQMALWAIMAAPLFMSNDLRHISPQAKALLQDK
 DVIAINQDPLGKQGYQLRKGDNFVWERPLSGDAWAVAIINRQEIGGPRSYTIPVASLG
 KGVACNPACFITQLLPVKRQLGFYNWTSRLKSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL
 (SEQ ID NO: 42)

Полинуклеотидная последовательность yCDS варианта No. 625:

TTGGATAACGGGTTAGCCCGTACACCTACTATGGGTTGGCTTCACTGGGAAA

GATTCATGTGTAACCTTAGATTGCCAAGAAGAGCCTGACAGCTGTATCTCAGAGAAA
 CTATTCATGGAGATGGCTGAACGGATGGTAACCGAAGGATGGAAGGATGCTGGTTA
 TGAATACCTATGTATTGATGATTGCTGGATGGCTCCACAGCGTGATTCAGAAGGTAG
 GTTACAAGCTGACCCCCAGAGATTCCCACATGGCATAACGTCAGCTTGCAAACCATGT
 ACACAGCAAAGGTCTAAAGTTAGGCATCTACGCTGATGTCGGAAACAAGACATGTG
 CTGGTTTCCCAGGTTTCATTTCGGTTACTATGACATAGATGCGCAGACGTTTGCTGATT
 GGGGTGTTGATTTGTTGAAGTTTGATGGATGCTACTGCGATTCCCTGGAGAACCTAG
 CCGATGGGTACAAACACATGAGTTTGGCTCTAAACAGGACTGGTAGGCCGATCGTC
 TATAGTTGTGAATGGCCCTTGACATGTGGCCGTTTCAGAAGCCAACTACACTGAG
 ATAAGACAATACTGTAACCATTGGCGTAACTTTGCTGACATAGATGATTCATGGGCT
 TCAATCAAATCTATCTTGGATTGGACTTCTCGTAACCAGGAAAGAATTGTTGATGTT
 GCAGGTCCAGGTGGATGGAATGACCCTGATATGCTTGTACATAGGGAACCTTTGGGCTA
 TCATGGGACCAACAAGTTACACAAATGGCTTTGTGGGCGATCATGGCCGCACCCCTA
 TTCATGTCTAATGATCTACGTGCGATATCACCCCAAGCAAAGGCTTTACTTCAAGAT
 AAGGATGTCATAGCGATCAACCAAGATCCTCTTGGTAAACAAGGTTATCAATTGAG
 AAAAGGTGACAACTTTGAAGTGTGGGAAAGACCATTGTCTGGAGATGCGTGGGCTG
 TTGCTATTATCAACCGTCAAGAGATCGGAGGGCCAAGATCTTACACTATCCCGGTAG
 CCTCTTTGGGTAAGGGTGTGCGTGCAATCCTGCCTGCTTCATTACACAATTGCTTCC
 AGTTAAGAGACAATTGGGTTTCTATAACTGGACCTCTAGGCTAAAAAGTCACATTAA
 TCCTACTGGTACGGTATTGTTGCAATTGGAGAACACAATGCAAACCTCTTTGAAAGA
 TTTGTTA (SEQ ID NO: 43)

Полипептидная последовательность варианта No. 625:

LDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLDCQEEPSCISEKLFMEMAERMVTEGWKD
 AGYEYLCIDDCWMA PQRDSEGR LQADPQRFPHGIRQLANHVH SKGLKLG IYADVGNKT
 CAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGV DLLKFDG CYCDSLENLADGYKHMSLALNRTGRPIV
 YSCEWPLYMWPFQKPNYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWASIKSILDWTSRNQERIVDVA
 GPGGWNDPDM LVIGNFGLSWDQQVTQMALWAIMAAPLFMSNDLRAISPQAKALLQDK
 DVIAINQDPLGKQGYQLRKGDNF EVWERPLSGDAWAVAIINRQEIGGPRSYTIPVASLG
 KGVACNPACFITQLLPVKRQLGFYNWTSRLKSHINPTGTVLLQLENTMQTSLKDLL
 (SEQ ID NO: 44)

Полинуклеотидная последовательность yCDS варианта No. 648:

TTGGATAACGGGTTAGCCCGTACACCTCCGATGGGTTGGCTTCACTGGGAAA
 GATTCATGTGTAACCTTAGATTGCCAAGAAGAGCCTGACAGCTGTATCTCAGAGAAA
 CTATTCGAAGAGATGGCTGAACGGATGGTAACCGAAGGATGGAAGGATGCTGGTTA
 TGAATACCTATGTATTGATGATTGCTGGATGGCTCCACAGCGTGATTCAGAAGGTAG
 GTTACAAGCTGACCCCCAGAGATTCCCACATGGCATAACGTCAGCTTGCAAACCATGT
 ACACAGCAAAGGTCTAAAGTTAGGCATCTACGCTGATGTCGGAAACAAGACATGTG
 CTGGTTTCCCAGGTTTCATTTCGGTTACTATGACATAGATGCGCAGACGTTTGCTGATT
 GGGGTGTTGATTTGTTGAAGTTTGATGGATGCTACTGCGATTCCCTGGAGAACCTAG
 CCGATGGGTACAAACACATGAGTTTGGCTCTAAACAGGACTGGTAGGCCGATCGTC

TATAGTTGTGAATGGCCCTTGTACATGTGGCCGTTTCAGAAGCCAAACTACACTGAG
 ATAAGACAATACTGTAACCATTTGGCGTAACTTTGCTGACATAGATGATTCATGGGCT
 TCAATCAAATCTATCTTGGATTGGACTTCTCGTAACCAGGAAAGAATTGTTGATGTT
 GCAGGTCCAGGTGGATGGAATGACCCTGATATGCTTGTTCATAGGGAACTTTGGGCTA
 TCATGGGACCAACAAGTTACACAAATGGCTTTGTGGGCGATCATGGCCGGCCCCCTA
 TTCATGTCTAATGATCTACGTGCGATATCACCCCAAGCAAAGGCTTTACTTCAAGAT
 AAGGATGTCATAGCGATCAACCAAGATCCTCTTGGTAAACAAGGTTATCAATTGAG
 AAAAGGTGACAACTTTGAAGTGTGGGAAAGACCATTGTCTGGAGATGCGTGGGCTG
 TTGCTATTATCAACCGTCAAGAGATCGGAGGGCCAAGATCTTACACTATCCCGGTAG
 CCTCTTTGGGTAAGGGTGTTCGCTGCAATCCTGCCTGCTTCATTACACAATTGCTTCC
 AGTTAAGAGACAATTGGGTTTCTATAACGCAACCTCTAGGCTAAAAAGTCACATTAA
 TCCTACTGGTACGGTATTGTTGCAATTGGAGAACACAATGCAAACCTCTTTGAAAGA
 TTTGTTA (SEQ ID NO: 45)

Полипептидная последовательность варианта No. 648:

LDNGLARTPPMGWLHWERFMCNLDCQEEDSCISEKLFEEMAERMVTEGWKD
 AGYEYLCIDDCWMA PQRDSEGR LQADPQRFPHGIRQLANHVH SKGLKLG IYADVGNKT
 CAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGV DLLKFDG CYCDSLENLADGYKHMSLALNRTGRPIV
 YSCEWPLYMWPFQKPNYTEIRQYCNHWRFADIDDSWASIKSILDWTSRNQERIVDVA
 GPGGWNDPDM LVIGNFGLSWDQQVTQMALWAIMAGPLFMSNDLRAISPQAKALLQDK
 DVIAINQDPLGKQGYQLRKGDNF EVWERPLSGDAWAVAIINRQEIGGPRSYTIPVASLG
 KGVACNPACFITQLLPVKRQLGFYNATSRLKSHINPTGTVLLQLENTMQTSLKDLL (SEQ
 ID NO: 46)

ПРИМЕР 1

Приобретение гена GLA и конструирование экспрессионных векторов

[0179] Синтетические гены (SEQ ID NO: 1), кодирующие последовательность человеческого GLA дикого типа (SEQ ID NO: 2), и происходящие от них варианты (SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6), конструировали, как описано ранее (см., например, публикацию заявки на патент США No. № 2017/0360900 A1). Для секретируемой экспрессии и временной трансфекции в клетках млекопитающих, химерную экспрессионную конструкцию GLA, содержащую полинуклеотид, кодирующий синтетический сигнальный пептид мышинного IG, слитый с синтетическим геном, кодирующим различные варианты GLA, получали следующим образом. Олигонуклеотиды BamHI-pcDNA-GLA-F (SEQ ID NO: 63) и XhoI-pcDNA-GLA-R (SEQ ID NO: 64) использовали для амплификации фрагмента, кодирующего сигнальный пептид, и последовательности, кодирующей зрелую форму вариантов GLA. Продукт ПЦР лигировали в линейаризованный экспрессионный вектор млекопитающих BamHI/XhoI pcDNA3.1(+) (Invitrogen) или вектор, содержащий промотор CMV и последовательность BGH-pA (последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста). Методы направленной эволюции, в основном известные специалистам в данной области, применяли для создания вариантов гена, происходящих от SEQ ID NO: 8, в этой плазмидной конструкции (см., например, патент США № 8383346

и WO 2010/144103).

ПРИМЕР 2

Крупномасштабное культивирование и анализы

Крупномасштабное (НТР) культивирование клеток, содержащих GLA и варианты GLA

[0180] Клетки HEK 293T трансфицировали векторами pcDNA 3.1(+) или промотором CMV и BGH-pA, содержащим векторы, кодирующие синтетический сигнальный пептид мышинового IG, слитый с GLA дикого типа или с вариантами GLA, с применением метода липофекции, проводимого с использованием реагента LIPOFECTAMINE® 3000 (ThermoFisher Scientific). Клетки HEK 293T культивировали в культуральной среде (DMEM с 10% фетальной бычьей сывороткой [обе от Corning]). За 24 часа до трансфекции, клетки высевали в 96-луночный планшет NUNC® Edge 2.0 (ThermoFisher Scientific) с плотностью 10^5 клеток/лунку/250 мкл культуральной среды и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в инкубаторе. Клетки инкубировали в течение 24-72 часов при 37°C и 5% CO₂ для обеспечения экспрессии и секреции вариантов GLA. Кондиционированные среды (50-100 мкл) после трансфекции HEK293T переносили в сплошные черные 96-луночные планшеты Corning (Corning) для анализа на активность и/или на стабильность.

НТР-анализ супернатантов

[0181] Активность варианта GLA определяли путем оценки гидролиза 4-метилумбеллиферил- α -D-галактопиранозида (MUGal). Для проведения анализа без инкубирования, 50 мкл кондиционированной среды HEK 293T, полученной, как описано выше, смешивали с 50 мкл 1 mM MUGal в буфере McIlvaine (McIlvaine, J. Biol. Chem., 49:183-186 [1921]), pH 4,8, в 96-луночном планшете с черным непрозрачным дном для микротитрования. Реакционные смеси быстро перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 30-180 минут перед гашением 100 мкл 0,5 М карбоната натрия, pH 10,2. Гидролиз анализировали с использованием устройства для считывания микропланшетов SPECTRAMAX® M2 путем мониторинга флуоресценции (на длине волны возбуждения 355 нм, на длине волны излучения 460 нм). Результаты этого анализа представлены в Таблице 2-1.

НТР-анализ супернатантов, предварительно обработанных кислотой

[0182] Варианты GLA подвергали воздействию кислотного буфера, чтобы имитировать экстремальный pH, с которым варианты могут столкнуться в лизосомах. Сначала, в лунки 96-луночного круглодонного микротитрационного планшета добавляли 50 мкл кондиционированной среды HEK 293T и 50 мкл буфера McIlvaine (pH 3,3-4,3). Планшеты запечатывали термогерметиком PlateLoc® (Agilent) и инкубировали при 37°C в течение 1-2 часов. Для анализа на заражение при pH 4, 50 мкл образца с кислотным pH смешивали с 50 мкл 1 mM MUGal в буфере McIlvaine с pH 4,4. Реакционные смеси быстро перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 30-180 минут перед гашением 100 мкл 0,5 М карбоната натрия, pH 10,2. Гидролиз анализировали с использованием устройства

для считывания микропланшетов SPECTRAMAX® M2 путем мониторинга флуоресценции (на длине волны возбуждения 355 нм, на длине волны излучения 460 нм). Результаты этого анализа представлены в Таблице 2-1.

НТР-анализ супернатантов, предварительно обработанных основанием

[0183] Варианты GLA обрабатывали основным (нейтральным) буфером для имитации значений pH, с которыми варианты сталкиваются в крови после введения пациенту. Сначала, в лунки 96-луночного круглодонного микротитрационного планшета добавляли 50 мкл среды НЕК 293Т, кондиционированной вариантами GLA, и 50 мкл буфера McIlvaine (pH 7,0-8,2). Планшеты запечатывали и инкубировали при 37°C в течение 1-18 часов. Для анализа на заражение при pH 7, 50 мкл образца с основным pH смешивали с 50 мкл 1 mM MUGal в буфере McIlvaine с pH 4,4. Реакционные смеси быстро перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 30-180 минут перед гашением 100 мкл 0,5 М карбоната натрия, pH 10,2. Гидролиз анализировали с использованием устройства для считывания микропланшетов SPECTRAMAX® M2 путем мониторинга флуоресценции (на длине волны возбуждения 355 нм, на длине волны излучения 460 нм). Результаты этого анализа представлены в Таблице 2-1.

Таблица 2-1. Активность вариантов GLA по сравнению с SEQ ID NO: 8 после культивирования без заражения (незараженного) или заражения при указанном pH¹				
SEQ ID NO:(nt/aa)	Различия аминокислот (по сравнению с SEQ ID NO: 8)	Незараженные FIOPC	FIOPC, зараженные при pH 4	FIOPC, зараженные при pH 7
7/8		++	++	++
9/10	R44L/D247N/P337A	++	++++	
11/12	R44L/K302Q	++	++++	+
13/14	R44L/D247N/K302Q	++	++++	
15/16	R217F/K373R		++++	+
17/18	I322M/P337A	++++	++++	++
19/20	R44L/D247N/K302Q/I322M	++	++++	
21/22	K302Q/I322M/Q362K/K373R	+++	++++	+
23/24	I322M	+++	+++	++
25/26	K302Q/P337A	++	+++	+
27/28	R44L/R217F/I322M	+++	+++	++
29/30	R44L/D247N/I322M	++	+++	
31/32	R44L/P337A	++	+++	+
33/34	R44L/K373R	++	+++	+
35/36	R44L/D247N	+++	+++	++

37/38	R217F/I322M	+++	+++	+
39/40	R44L/R217F/D316L	++	+++	+
41/42	D247N/Q362K	++	+++	
43/44	R44L/R217F	+++	+++	++
45/46	K373R	++	++	+
47/48	D247N/I322M	++	++	
49/50	R44L	++	++	+
51/52	D316L	++	++	+
53/54	R44L/D247N/Q362K	++	++	
55/56	D316L/P337A	++	++	
57/58	Q362K/K373R	++	+	
59/60	R44L/R217F/I322M/P337A		+	
¹ Уровни повышенной активности определяли по отношению к эталонному полипептиду SEQ ID NO: 8 и обозначали следующим образом: «+» > 0,75; «++» > 0,9; «+++» > 1,1; и "++++" > 1,2.				

ПРИМЕР 3

Продуцирование вариантов GLA

Продуцирование GLA в клетках HEK293T

[0184] Секретируемую экспрессию вариантов GLA в клетках млекопитающих осуществляли путем временной трансфекции клеток HEK293, HEK293T или Expi293. Клетки трансфицировали вариантами GLA (SEQ ID NO: 3, 4, 9, 12, 17, 20, 23 и 41), слитыми с N-концевым синтетическим сигнальным пептидом млекопитающих, и субклонировали в экспрессионный вектор млекопитающих pLEV113, как описано в Примере 1. Клетки HEK293 трансфицировали плазмидной ДНК и культивировали в суспензии в течение 4 дней с применением стандартных методов, известных специалистам в данной области. Супернатанты собирали и хранили при 4°C до проведения анализа.

ПРИМЕР 4

Очистка вариантов GLA

Очистка вариантов GLA из супернатантов клеток млекопитающих

[0185] GLA дикого типа (SEQ ID NO: 2) очищали из супернатанта культуры млекопитающих, как описано в литературе (Yasuda et al., Prot. Exp. Pur., 37:499-506 [2004]). Все другие варианты GLA очищали следующим образом. Варианты GLA очищали из супернатанта культуры млекопитающих, по существу, как известно специалистам в данной области (см. Yasuda et al., Prot. Exp. Pur., 37:499-506 [2004]). Смола конканавалина А (Sigma Aldrich) уравнивали 0,1 М ацетатом натрия, 0,1 М NaCl, 1 мМ MgCl₂, CaCl₂ и MnCl₂, pH 6,0 (буфером для связывания с конканавалином А). Перед загрузкой в

колонку, супернатант стерильно отфильтровывали с помощью 0,2 мкм бутылочного фильтра. После загрузки, колонку промывали 10 колоночными объемами буфера для связывания с конканавалином А, и связанный белок элюировали буфером для связывания с конканавалином А с добавлением 0,9 М метил- α -D-маннопиранозида и 0,9 М метил- α -D-глюкопиранозида. Элюированный белок концентрировали, и буфер заменяли буфером для хранения (20 мМ фосфата натрия, 150 мМ хлорида натрия, 185 мкМ неионного детергента TWEEN®-20, pH 6,0) с использованием фильтрующего 15 мл-устройства Amicon® Ultra с мембраной с отсечкой молекулярной массы 30 кДа (Millipore). GLA в буфере для хранения стерильно фильтровали через шприцевые фильтры ANOTOP® 0,2 мкм (Whatman) и хранили при -80°C. В результате очистки получали 2,4-50 мкг очищенного белка/мл культурального супернатанта на основе количественного определения BCA.

Количественное определение белка с помощью анализа на белок BCA

[0186] Для количественного определения очищенной GLA проводили анализ на белок с использованием бицихониновой кислоты (BCA) (Sigma Aldrich). В микротитрационном планшете, 25 мкл белковых стандартов и очищенной GLA с надлежащим разведением смешивали с 200 мкл рабочего реагента, содержащего 50 частей реагента BCA А и 1 часть реагента BCA В. Содержимое планшета тщательно перемешивали на шейкере в течение 30 секунд и инкубировали при 37° С в течение 30 минут. После охлаждения планшетов до комнатной температуры измеряли оптическую плотность образцов на 562 нм с использованием планшет-ридера.

ПРИМЕР 5

In vitro характеристика вариантов GLA

Термостабильность вариантов GLA, экспрессированных в клетках HEK 293T

[0187] Варианты GLA подвергали воздействию различных температур для оценки общей стабильности фермента. Сначала, в лунки 96-луночного ПЦР-планшета (Biorad, HSP-9601) добавляли 50 мкл очищенных клеток HEK 293T, экспрессирующих GLA и варианты GLA в 1х PBS, pH 6,2. Планшеты запечатывали и инкубировали при 30-50°C в течение 1 часа с использованием программы градиента термоячейки. Для анализа, 25 мкл зараженного супернатанта смешивали с 25 мкл 1 мМ MUGal в буфере McIlvaine с pH 4,4. Реакционные смеси быстро перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 60 минут перед гашением 100 мкл 0,5 М карбоната натрия, pH 10,2. Гидролиз анализировали с использованием устройства для считывания микропланшетов SPECTRAMAX® M2 путем мониторинга флуоресценции (на длине волны возбуждения 355 нм, на длине волны излучения 460 нм). Процентную остаточную активность вычисляли для 1-часового инкубирования при температуре от 30°C до 50°C путем деления активности зараженных образцов на активность незараженных образцов, где «незараженный» относится к гидролизу, оцененному на время 0, а «зараженный» относится к гидролизу, оцененному через 1 час при указанной температуре для каждого варианта. Результаты этого анализа показаны в Таблице 5-1. На фигуре 1 представлен график, иллюстрирующий остаточную активность вариантов GLA после 1-часового инкубирования при различных температурах.

Стабильность вариантов GLA, экспрессированных в клетках HEK 293Т в сыворотке

[0188] Для оценки относительной стабильности вариантов в присутствии крови, образцы подвергали воздействию сыворотки. Сначала, в лунки 96-луночного круглодонного планшета COSTAR® (Corning) добавляли 100 мкл 7,5 мкг/мл очищенных вариантов GLA в 1х PBS, pH 6,2, и 90 мкл человеческой сыворотки. Планшеты запечатывали и инкубировали при 37°C в течение 0-24 часов. Для анализа, 50 мкл зараженного супернатанта смешивали с 50 мкл 1 mM MUGal в буфере McIlvaine с pH 4,4. Реакционные смеси быстро перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 90 минут перед гашением 100 мкл 0,5 М карбоната натрия, pH 10,2. Гидролиз анализировали с использованием устройства для считывания микропланшетов SPECTRAMAX® M2 путем мониторинга флуоресценции (на длине волны возбуждения 355 нм, на длине волны излучения 460 нм). Процентную остаточную активность в сыворотке вычисляли через 24 часа путем деления активности зараженных образцов на активность незараженных образцов, где «незараженный» относится к гидролизу, оцененному на время 0, а «зараженный» относится к гидролизу, оцененному в указанные моменты времени для каждого варианта. Результаты этого анализа показаны в Таблице 5.1. На фигуре 2 представлен график, иллюстрирующий остаточную активность вариантов GLA после заражения человеческой сывороткой в течение 0-24 часов.

Стабильность вариантов GLA, экспрессированных в клетках HEK 293Т, в лизосомах

[0189] Для оценки относительной стабильности вариантов в присутствии лизосомных протеаз и других лизосомных компонентов, варианты GLA подвергали воздействию человеческого лизосомного лизата (XenoTech, #H0610.L) в соответствии с инструкциями производителя с некоторыми модификациями, как описано в настоящей заявке. Вкратце, варианты GLA разводили до соответствующего диапазона концентраций (0,0625-0,0078125 mM) и 10 мкл разведений объединяли с 10 мкл разведения 1:20 человеческого лизосомного лизата в 2× катаболическом буфере (XenoTech, #K5200) в 96-луночном круглодонном планшете COSTAR® (#3798, Corning). Планшеты запечатывали и инкубировали при 37°C в течение 0-24 часов. Для анализа, 50 мкл зараженного супернатанта смешивали с 50 мкл 1 mM MUGal в буфере McIlvaine с pH 4,4. Реакционные смеси быстро перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 90 минут перед гашением 100 мкл 0,5 М карбоната натрия, pH 10,2. Гидролиз анализировали с использованием устройства для считывания микропланшетов SPECTRAMAX® M2 путем мониторинга флуоресценции (на длине волны возбуждения 355 нм, на длине волны излучения 460 нм). Через 24 часа, процентную остаточную активность в лизосомном экстракте вычисляли путем деления активности зараженных образцов на активность незараженных образцов, где «незараженный» относится к гидролизу, оцененному на время 0, а «зараженный» относится к гидролизу, оцененному через 1 час при указанной температуре для каждого варианта. Результаты этого анализа показаны в Таблице 5.1. На

фигуре 3 представлен график, иллюстрирующий остаточную активность вариантов GLA после заражения человеческим лизосомным экстрактом в течение периода времени от 0 до 24 часов.

Поглощение очищенных вариантов GLA, экспрессированных в клетках HEK293T, фибробластами пациентов с болезнью Фабри

[0190] Поглощение вариантов GLA клетками по сравнению с эталонным ферментом (GLA дикого типа [SEQ ID NO: 2]) определяли для оценки общей способности вариантов подвергаться эндоцитозу в культивируемых клетках. Фибробласты пациентов с болезнью Фабри (GMO2775, Институт медицинских исследований Кориелла) высевали в 12-луночные чашки для культивирования (VWR, № 10861-698), содержащие минимальную поддерживающую среду (MEM; Gibco № 11095-080, дополненную 1% заменимых аминокислот (NEAA; Gibco #11140-050) и 15% фетальной бычьей сыворотки (Corning #35-016-CV)) и культивировали до конфлюэнтности (2-3 дня при 37°C, 5% CO₂). После достижения конфлюэнтности, добавленную MEM удаляли в стерильном вакууме и заменяли на 1 мл/лунку MEM без сыворотки +1% NEAA. Ферменты, очищенные, как описано в Примере 4, добавляли к клеткам в концентрации 10 мкг GLA/мл и инкубировали в течение 4 часов при 37°C, 5% CO₂. Бессывороточную среду отсасывали в стерильном вакууме, а затем клетки быстро промывали 1 мл 1×PBS на лунку и PBS отсасывали в стерильном вакууме. Затем клетки обрабатывали трипсином путем добавления 200 мкл/лунку 0,25% трипсина-EDTA (VWR #02-0154-0100) и инкубировали в течение ~5 минут при комнатной температуре для удаления прилипших клеток с планшета и разложения оставшейся внеклеточной GLA. Затем, в каждую лунку добавляли по 500 мкл бессывороточной MEM, и образцы переносили в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл. Образцы центрифугировали при 8000 об/мин в течение 5 минут для осаждения клеток. Среду осторожно отсасывали пипеткой объемом 1000 мкл. Клеточный осадок ресуспендировали в 500 мкл 1×PBS, повторно осаждали при 8000 об/мин в течение 5 минут и осторожно удаляли PBS. Затем к каждому образцу добавляли 100 мкл буфера для лизиса (0,2% неионного поверхностно-активного вещества TRITON X-100™ (Sigma #93443), разведенного в 1×PBS), с последующей обработкой ультразвуком в течение 1-2 минут и центрифугированием при 12000-14000 об/мин в течение 10 минут при 4°C. Супернатант переносили в стерильную пробирку для ПЦР для анализа на белок и активность. Для анализа на активность, 10 мкл образца для лизиса клеток смешивали с 50 мкл 2,5 mM MUGal в буфере McIlvaine, pH 4,6. Реакционные планшеты запечатывали и инкубировали при 37°C в течение 60 минут перед гашением реакции 140 мкл 0,5 M карбоната натрия, pH 10,2, на лунку. Гидролиз анализировали с использованием устройства для считывания микропланшетов SPECTRAMAX® M2 путем мониторинга флуоресценции (на длине волны возбуждения 355 нм, на длине волны излучения 460 нм). Для количественного определения белка, анализ с использованием BCA проводили в соответствии с инструкциями производителя (Pierce, #23225) со следующими изменениями: 10 мкл образца для лизиса клеток смешивали со 190 мкл рабочего реагента

BSA, планшеты запечатывали и инкубировали при 37°C в течение 60 минут. Образцы анализировали с использованием устройства для считывания микропланшетов SPECTRAMAX® M2 путем мониторинга оптической плотности (на длине волны 562 нм). Концентрации белка вычисляли по стандартной кривой на основе BSA. Поглощение каждого варианта GLA клетками вычисляли сначала путем вычитания фоновой неферментативной флуоресценции необработанных клеток из образцов, обработанных ферментом, с последующей нормализацией на концентрацию белка в каждой лунке. Поглощение FIOPC клетками вычисляли путем деления внутриклеточной активности нормализованного варианта GLA на соответствующую активность контроля (WT). На Фигуре 4 представлен график поглощения очищенных вариантов GLA клетками в культивируемых фибробластах пациента с болезнью Фабри, где такое поглощение было выражено как относительная активность по сравнению с образцом дикого типа (SEQ ID NO: 2) после 4-часового инкубирования при 37°C.

Таблица 5-1. Относительная активность и поглощение клетками вариантов GLA, продуцируемых в клетках HEK293T¹

SEQ ID NO: (nt/aa)	Различия аминокислот (по сравнению с SEQ ID NO: 8)	Стабильность в лизосомах, % остаточной активности через 24 ч.	% остаточной активности и при 37°C (1ч)	% остаточной активности при 50°C (1ч)	Стабильность в сыворотке, % остаточной активности через 24 ч.
1/2	P10T/E39M/R44L/T47S/H92Y/P166S/A206K/R217F/D247N/G261A/A271H/K302Q/D316L/I322M/P337A/Q362K/A368W/K373R/T392M		+	+	
7/8		+++	++++	+++	+++
15/16	R217F/K373R	+++	++++	++++	
57/58	Q362K/K373R	+++	++++	++++	+
59/60	R44L/R217F/I322M/P337A	+++	++++	++++	
39/40	R44L/R217F/D316L	+++	++++	++++	
61/62	P166A/Q362K	+++	++++	++++	+++

¹ Процент (%) остаточной активности при 35°C и 50°C, а также % стабильности в лизосомах и сыворотке, выраженный в процентах (%) остаточной активности, определяли по отношению к каждому отдельному варианту и обозначали следующим образом: «+» >50%; «++» >60%; «+++» >80%; и "++++" >95%. Также определяли остаточную активность для каждого варианта через 1 час по сравнению с его активностью в момент времени 0.

НТР-анализ активности GLA в лизатах фибробластов пациентов с болезнью Фабри

[0191] Варианты GLA, продуцируемые в НТР, подвергали воздействию клеток, так, чтобы они сохраняли активность в течение от 24 до 96 часов. Фибробласты пациентов с болезнью Фабри (GMO2775, Институт медицинских исследований Кориелла) высевали и культивировали до конфлюентности в течение 24-72 часов. После достижения конфлюентности, среду удаляли с помощью автоматизированного робота для работы с жидкостями BioMek i5. Кондиционированную среду клеток HEK293T, временно трансфицированных, как описано выше, добавляли к фибробластам при болезни Фабри, и клетки инкубировали с вариантами GLA в течение 2-4 часов при 37°C, 5% CO₂. Кондиционированные среды, содержащие GLA, удаляли с помощью автоматизированного робота для работы с жидкостями BioMek i5. Затем клетки быстро промывали 150 мкл 1×DPBS на лунку и удаляли DPBS с помощью автоматизированного робота для работы с жидкостями BioMek i5. Затем в каждую лунку добавляли по 200 мкл полной питательной среды, и планшеты возвращали в инкубатор на 24-72 часа. После завершения инкубирования, полная культуральная среда была удалена с помощью автоматизированного робота для работы с жидкостями BioMek i5. Клетки промывали 150 мкл 1×DPBS на лунку и удаляли DPBS с помощью автоматизированного робота для работы с жидкостями BioMek i5. Клетки лизировали путем добавления 50 мкл буфера McIlvaine, pH 4,4, с добавлением 0,2% неионного поверхностно-активного вещества TRITON X-100™ (Sigma #93443) и перемешиванием при комнатной температуре в течение 30 минут. Активность оценивали путем добавления 50 мкл 1,5 mM MuGal в буфере McIlvaine, pH 4,4. Планшеты запечатывали и инкубировали при 37°C в течение 360 минут при перемешивании со скоростью 400 об/мин перед гашением 100 мкл 0,5 М карбоната натрия, pH 10,2. Гидролиз анализировали с использованием устройства для считывания микропланшетов SPECTRAMAX® M2 путем мониторинга флуоресценции (на длине волны возбуждения 355 нм, на длине волны излучения 460 нм). Поглощение FIORC клетками вычисляли путем деления внутриклеточной активности нормализованного варианта GLA на соответствующую активность эталонной последовательности.

НТР-анализ GLA-индуцированного истощения глоботриаозилцерамида в фибробластах при болезни Фабри

[0192] Варианты GLA, продуцируемые в НТР, подвергали испытанию на поглощение клетками и снижение клеточной нагрузки глоботриаозилцерамидом.

Фибробласты пациентов с болезнью Фабри (GMO2775, Институт медицинских исследований Кориелла) высевали и культивировали до конфлюентности в течение 24-72 часов. После достижения конфлюентности, среду удаляли с помощью автоматизированного робота для работы с жидкостями BioMek i5. Кондиционированную среду клеток HEK293T, временно трансфицированных, как описано выше, добавляли к фибробластам, и клетки инкубировали в течение 2-4 часов при 37°C, 5% CO₂. Кондиционированные среды, содержащие GLA, удаляли с помощью автоматизированного робота для работы с жидкостями BioMek i5. Затем клетки быстро промывали 150 мкл 1×DPBS на лунку и удаляли DPBS с помощью автоматизированного робота для работы с жидкостями BioMek i5. Затем в каждую лунку добавляли по 200 мкл полной культуральной среды, и планшеты возвращали в инкубатор на 24-72 часа. После завершения инкубирования, полную культуральную среду удаляли с помощью автоматизированного робота для работы с жидкостями BioMek i5. Затем клетки быстро промывали 150 мкл 1×DPBS на лунку и удаляли DPBS с помощью автоматизированного робота для работы с жидкостями BioMek i5. Глоботриаозилцерамид экстрагировали 200 мкл метанола с добавлением 10 нг/мл тригексозида N-гептадеканоилцерамида в течение 30 минут при комнатной температуре при осторожном перемешивании. Экстракты метанола фильтровали через набор гидрофобных фильтров Millipore в круглодонные 96-луночные планшеты. Клеточный глоботриаозилцерамид количественно определяли методом, по существу известным специалистам в данной области (см. Provencal et al., Bioanal., 8:1793-1807 [2016]) с помощью ЖХ-МС/МС. Затем определяли сумму интеграций пиков для каждого образца клеток и вычисляли FIOPC для глоботриаозилцерамида путем деления изменения нормализованных уровней глоботриаозилцерамида варианта GLA на уровни для эталонной последовательности.

ПРИМЕР 6

Варианты GLA, полученные из SEQ ID NO: 58

[0193] В этом примере описаны эксперименты, проведенные для оценки активности и клиренса Gb3 с использованием вариантов GLA в фибробластах при болезни Фабри. В этом примере, в качестве эталонной последовательности использовали SEQ ID NO: 58 (то есть, аминокислотные различия в вариантах указаны относительно SEQ ID NO: 58, а результаты анализа приведены относительно результатов, полученных для SEQ ID NO: 58). В этих экспериментах, варианты GLA тестировали на активность MU-Gal без предварительного инкубирования, как описано в Примере 5. Варианты также тестировали на истощение Gb3 в фибробластах при болезни Фабри, как описано в Примере 5.

Таблица 6-1. Относительная эффективность вариантов GLA в незараженных условиях и при истощении Gb3 в клетках фибробластов при болезни Фабри (по сравнению с SEQ ID NO: 58)¹

SEQ ID NO: (nt/aa)	Различия аминокислот (по сравнению с SEQ ID NO: 58)	Незаражены е FIOPC	Истощение Gb3 в фибробластах при болезни Фабри
--------------------	---	--------------------	--

67/68	R7L/Y120H	+	+
69/70	R7L/F365V	+	
71/72	R7L/Q88A/Y120H/N305G/F365V	++	
73/74	R7L/N305G	++	+
75/76	Q88A	++	
77/78	D282N	++	+
79/80	Q299R/L300I	++	
81/82	Y120H	++	
83/84	R7L	+++	+
85/86	R7L/N305G/F365V	+++	
87/88	Y120H/Q299R/N305G	+++	
89/90	R7L/E48D/Q68E/Y120H/D282N/Q299 R	+++	++
91/92	E48D	+++	++
93/94	Q68E	+++	++
95/96	R7L/D130E	+++	++
97/98	P67T/F180G	+++	
99/100	R7L/E48D/F180G	+++	
101/102	F365V	+++	
103/104	L300I	+++	++
105/106	R7L/E48D/Q68E	+++	++
107/108	E48D/F180G/D282N	+++	
109/110	F180G	+++	
111/112	Q299R/L300I/N305G/F365V	+++	
113/114	D282N/F365V	++++	
115/116	E48D/D282N/N305G	++++	+
117/118	R7L/Q68E/F180G	++++	
119/120	N305G	++++	++
121/122	Q68E/Q299R/L300I	++++	++
123/124	R7L/E48D/D130E/D282N	++++	++
125/126	E48D/Q68E	++++	+++
127/128	N305G/F365V	++++	
129/130	R7L/D282N	++++	+
131/132	R7L/Q68E/D130E/D282N/F365V	++++	++

133/134	E48D/D282N	++++	++
135/136	A206S	++	
137/138	K343D		+++
139/140	K343G	++	++
141/142	K96L	++	+++
143/144	K96L/P312Q/K343G	++	
145/146	K96L/S273P	+	+++
147/148	L158A/R162K/S273G		++
149/150	L158R	+	
151/152	N91Q/S95E		+++
153/154	N91Q/S95E/K96L		+++
155/156	R162H/K343D	+	
157/158	R162K	++	+++
159/160	R162K/S273P	+	+++
161/162	R162S	++	+++
163/164	R87K/K96I/H155N/S273P/K343G		++
165/166	R87K/N91Q/S95E/K96L/A206S/K343G	+	
167/168	R87K/N91Q/S95E/K96L/L158A/R162K		+++
169/170	S273P		+++
171/172	S273P/K343G	++	
173/174	T47D	++	++
175/176	T47D/K343G	+	++
177/178	T47D/R87K/S95E/K96L/L158R/R162H		++
179/180	T47D/S273P	++	+++
181/182	T47D/S95E		+++
183/184	W178G	+	
185/186	T389K	+	
187/188	F180T	+++	
189/190	F365A	++++	
191/192	F180V	++++	
193/194	L158A	+	
195/196	F180L	+	

197/198	S370G	++	
199/200	L398S	+++	
201/202	L397A	++	
203/204	A206K	++++	
205/206	P166K	+++	
207/208	A271R	+	
209/210	D396G/L398T	++	
211/212	W178S	+	+
213/214	S314A	+	+
215/216	S71P	++	+
217/218	L394K		+
219/220	Q181A	+	+
221/222	V345A	++	+
223/224	V93I		+
225/226	F365Q	++	+
227/228	I336V	++	+
229/230	H92F	+	+
231/232	L398V	+++	+
233/234	L398P	+++	++
235/236	R301M	++++	++
237/238	P337R	++	++
239/240	S333G	+++	++
241/242	L363Q	++++	++
243/244	T47V		++
245/246	H92T	++++	++
247/248	S393V	+	++
249/250	D151L		++
251/252	S333F	++++	++
253/254	L293P/Q391A	++	++
255/256	V345Q	+	++
257/258	E39V		++
259/260	R217K	++	++
261/262	L398A		+++

¹ Все активности были определены по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID

NO: 58. Уровни повышенной активности определяли следующим образом: "+"=0,9 to 1,1; "++" > 1,1; "+++" > 1,5; и "++++" > 2.

ПРИМЕР 7

Варианты GLA, полученные из SEQ ID NO: 158

[0194] В этом примере описаны эксперименты, проведенные для оценки активности, стабильности при pH 7,4 и внутриклеточной активности вариантов GLA в фибробластах при болезни Фабри. В этом примере, эталонная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 158 (то есть, аминокислотные различия в вариантах указаны по отношению к SEQ ID NO: 158, а результаты анализа представлены по отношению к результатам для SEQ ID NO: 158). Варианты тестировали на активность GLA MU-Gal без предварительного инкубирования (незараженные) и после предварительного инкубирования при pH 7,4, как описано в Примере 5. Варианты также тестировали на активность MU-Gal после лизиса фибробластов при болезни Фабри, инкубированных с вариантами GLA, как описано в Примере 5.

Таблица 7-1. Относительная эффективность вариантов GLA (по сравнению с SEQ ID NO: 158)

SEQ ID NO: (nt/aa)	Различия аминокислот (по сравнению с SEQ ID NO: 158)	Незаражены	FIOPC в виде лизата	Стабильность FIOPC после предварительного инкубирования при pH 7.4
263/264	E48D	++	+	++++
265/266	E48D/Q68E	+		++++
267/268	E48D/Q68E/R217K/S333F/Q391A/S393V	+		++++
269/270	E48D/Q68E/S333F	+		++++
271/272	E48D/R217K	+	+	++++
273/274	E48D/S333F			++++
275/276	E48D/S333G	+	+	++++
277/278	E48D/S393V	+	+	+++
279/280	E48D/V345Q/S393V			+++
281/282	Q68E	+		+++
283/284	Q68E/V345Q	++	++	++++
285/286	R217K/S333F	+	+	+++
287/288	R217K/S333G	+	+	++++
289/290	S333F/V345Q	+	++	++

291/292	S333G	++	++	++++
293/294	D130E		+	
295/296	D151L/A206S/D282N/P337 R/K343D/V345Q/L398A	++	+	
297/298	D130E/V345Q/S393V		+	
299/300	E39V/P337R/K343G/L398A	+		
301/302	T47V/D151L	+	+	
303/304	T47V/D130E	+	+	
305/306	T47V/K343D/V345Q/S393V	+	+	
307/308	A206S/R217K	+		
309/310	P337R/K343G/V345Q/L398 A	+		
311/312	D282N/S393V	+		
313/314	K343D	+	+	
315/316	K343D/V345Q/S393V/L398 A	+		
317/318	E39V/T47V/R217K	+		
319/320	A206S	+		
321/322	S393V/L398A	+		
323/324	E39V/D282N/P337R/L398A	+	+	
325/326	D151L	+		
327/328	S393V	+	+	
329/330	R217K/P337R/V345Q/L398 A	+	+	
331/332	D151L/D282N/S393V	+		+
333/334	E39V/S393V/L398A	+		+
335/336	L158R			+
337/338	D151L/L158R/R217K/K343 G/V345Q/S393V	+	++	+
339/340	D130E/L158R		+	+
341/342	D151L/S393V		+	+
343/344	R217K	+	+	+
345/346	D130E/L158R/S393V	+	++	+++
347/348	E39V/D151L	+		+++

349/350	D151L/V345Q/S393V/L398 A	+	++	+++
351/352	E39V/T47D	++	+	++++
353/354	L158R/S393V	++	+	++++
355/356	C59A/C143S			+
357/358	A271N		++	
359/360	D202N			++++
361/362	D24S/D202N	+		
363/364	S333N	+		
365/366	C143S/S333N	+		
367/368	C143S/A271N	++		+++
369/370	C143S/E387N	++		++
¹ Все активности были определены по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 158. Уровни повышенной активности определяли следующим образом: "+"=0,9-1,1; "++" > 1,1; "+++" > 1,5; и "++++" > 2,5.				

ПРИМЕР 8

Варианты GLA, полученные из SEQ ID NO: 372

[0195] В этом примере описаны эксперименты, проведенные для оценки активности, стабильности при pH 7,4, клиренса Gb3 и внутриклеточной активности вариантов GLA в фибробластах при болезни Фабри. В этом примере, эталонной последовательностью является SEQ ID NO: 372 (то есть, различия аминокислот в вариантах указаны относительно SEQ ID NO: 372, а результаты анализа приведены для сравнения с результатами для SEQ ID NO: 372). Эти варианты тестировали на активность MU-Gal без предварительного инкубирования («незараженные») и после предварительного инкубирования при pH 7,4, как описано в Примере 5. Варианты также тестировали на активность MU-Gal в фибробластах при болезни Фабри, инкубированных с вариантами GLA, как описано в Примере 5 («FIOPC в виде лизата»). Эти варианты также тестировали на истощение Gb3 в фибробластах при болезни Фабри после инкубирования с вариантами GLA, как описано в Примере 5 («Gb3 FIOPC»).

Таблица 8-1. Относительная эффективность вариантов GLA (по сравнению с SEQ ID NO: 372)

SEQ ID NO: (nt/aa)	Различия аминокислот (по сравнению с SEQ ID NO: 372)	Незаражен ые FIOPC	Стабильность FIOPC после предварительно го инкубирования при pH 7,4	Лиза т FIOPC	Gb3 FIOPC
375/376	F217R/N247D/L316D/M322I/A337P/W368A	+	++++		
377/378	H271A	+			+
379/380	H271A/L316D/M322I	+++	++		
381/382	H271A/Q302K/M322I	+++	++++	++	
383/384	K206A/F217R/H271A/M392T	++	++++	+++	+
385/386	L44R/K206A/A337P	+++	+++	++++	++
387/388	L44R/N247D/A261G/Q302K/L316D	++		++	
389/390	L44R/N247D/A261G/Q302K/L316D/M322I	++	+	+	
391/392	L44R/S47T/K206A/F217R/N247D/H271A/M322I	+	++++	++++	
393/394	L44R/S47T/N247D/M322I/W368A	+++	++++	++	
395/396	L44R/S47T/Q302K/L316D/M322I	+++	++++	+++	
397/398	L44R/S47T/Y92H/K206A/F217R/L316D/M322I	++++	++++	++++	
399/400	L44R/S47T/Y92H/N247D/A261G/H271A/L316D/A337P/W368A	++	+	+	
401/402	L44R/Y92H/K206A/N247D/W368A	++	+	+++	++
403/404	L89I/F217R/N247D/A261G/Q302K/L316D	++	+		

405/406	M39E/L44R/Y92H/F217R /M322I	+++	+	+++	
407/408	M39E/L44R/Y92H/N247 D/H271A/Q302K	++		++	+
409/410	M39E/L44R/Y92H/R162 M/N247D/Q302K/L316D/ M322I	++	+	++	
411/412	M39E/M322I	+++	+	++	
413/414	M39E/N247D/H271A	+	+	+	+
415/416	M39E/N247D/H271A/L3 16D	+++	+++		
417/418	M39E/S47T/F217R/N247 D/W368A	++++	++++		
419/420	M39E/S47T/N247D	+++	+	+	
421/422	M39E/S47T/Y92H/N247 D/Q302K/L316D/M322I	+	+++	+	
423/424	M39E/Y92H/L316D/M32 2I	+	+	++	+
425/426	M39E/Y92H/N247D/Q30 2K/L316D/A337P/W368 A	++++	++++	+	
427/428	N247D	+	++++	+	
433/434	N247D/H271A	+++	++	+	
435/436	N247D/Q302K	++	++++	++	+
437/438	Q302K/M322I/W368A	++	+	+	
439/440	S47T/F217R/Q302K	+++	+++	+++	
441/442	S47T/N247D	++	++++	+	
443/444	S47T/N247D/H271A	+++	++++	++	
445/446	S47T/Y92H/N247D/H271 A	++	++	+	+
447/448	T10P	++	++	++	++
449/450	T10P/A261G	+	+	++	
451/452	T10P/A337P/M392T	++	++	+	++
453/454	T10P/H271A/Q302K	+++	++++	++	+

455/456	T10P/K206A/A261G/H27 1A/L316D	+	+	++	
457/458	T10P/K206A/F217R/H27 1A	++	++++	++++	
459/460	T10P/K206A/N247D	++++	++++	++++	
461/462	T10P/L316D/M322I	+++	++++	++	+
463/464	T10P/L44R	+++	+	+++	++
465/466	T10P/L44R/A261G/Q302 K/L316D	++		++	+
467/468	T10P/L44R/Q302K/A337 P/W368A	++++	++++	++++	
469/470	T10P/L44R/S47T/A261G/ Q302K/M322I/W368A	+++	+	+++	
471/472	T10P/L44R/S47T/Y92H/ N247D	+	+++	+++	
473/474	T10P/L44R/Y92H/L316D /M322I	++++	+++	+++	
475/476	T10P/M39E/L44R/M322I	+++		+++	+
477/478	T10P/M39E/Y92H/K206 A/F217R/H271A	++	+++	+++	
479/480	T10P/M39E/Y92H/N247 D	+++	+++	+	
481/482	T10P/M39E/Y92H/N247 D/H271A/L316D	+	+++		
483/484	T10P/Q302K	++	+	+++	+++
485/486	T10P/Q302K/L316D	++	+++	++	+
487/488	T10P/Q302K/M322I/A33 7P	+++	++++	+++	++
489/490	T10P/S47T/F217R/M322I	+	+++	++	+
491/492	T10P/S47T/F217R/N247 D/L316D/M392T	+++	++++	+	
493/494	T10P/S47T/H271A	+++	++	++	
495/496	T10P/W368A	+++	++	+	
497/498	T10P/Y92H	+	+	++	

499/500	T10P/Y92H/F217R/A261 G/Q302K/A337P	++	+	++	
501/502	T10P/Y92H/K206A/F217 R/N247D	+	++++	+++	+
503/504	T10P/Y92H/K206A/N247 D/L316D/M322I/M392T	+	++++	++	
505/506	T10P/Y92H/K206A/N247 D/M322I/W368A	+	++++	+++	++
507/508	W368A	+		+	
509/510	Y92H/F217R/H271A	++	+	+	
511/512	Y92H/H271A/A337P	++	+	+	
513/514	Y92H/L316D	+++	+		+
515/516	Y92H/N247D	+++	++	++	
517/518	Y92H/N247D/H271A/M3 22I	++	++	+	+
519/520	Y92H/N247D/Q302K/M3 22I/A337P	+	+++	+	
521/522	Y92H/Q302K	++		++	+
¹ Все активности были определены по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 372. Уровни повышенной активности определяли следующим образом: "+"=0.9-1,1; "++" > 1,1; "+++" > 1,5; и "++++" > 2.					

ПРИМЕР 9

Варианты GLA, полученные из SEQ ID NO: 374

[0196] В этом примере описаны эксперименты, проведенные для определения активности варианта GLA путем анализа активности фермента после проведения серии тестов или независимых тестов. Эти варианты тестировали на активность GLA MU-Gal без предварительного инкубирования и после предварительного инкубирования при pH 7,4, как описано в Примере 5. Варианты также тестировали на активность MU-Gal после лизиса фибробластов при болезни Фабри, инкубированных с вариантами, как описано в Примере 5. Варианты также тестировали на истощение Gb3 в фибробластах при болезни Фабри после инкубирования, как описано в Примере 5.

Таблица 9-1. Относительная эффективность вариантов GLA (по сравнению с SEQ ID NO 374)¹

SEQ ID NO: (nt/aa)	Различия аминокислот (по сравнению с SEQ ID NO: 374)	Незараженн ые FIOPC	Стабильност ь FIOPC	Лизат FIOPC	FIOPC с дефицитом Gb3
--------------------	--	------------------------	------------------------	----------------	--------------------------

523/524	P10T/E39M/R44L/T47S/P 337A	+			
525/526	P10T/R44L/H92Y	++			
527/528	R44L/T47S/P166S	+			
529/530	A206K/R217F	++			
531/532	E39M/T47S/H92Y/T392M		+		
533/534	P10T/E39M/H92Y/W131G /P166S/A271H/D316L/I32 2M	+		+	
535/536	E39M/T47S/R217F/D247N /A368W				+
537/538	H92Y/P166S/D247N				+
539/540	H92Y/R217F				+
541/542	P10T/A206K				++
543/544	P10T/D316L/T392M				++
545/546	P10T/E39M/R44L/H92Y/P 166S/G261A/D316L/I322 M				+
547/548	P10T/E39M/R44L/H92Y/P 166S/K302Q/I322M				+
549/550	P10T/E39M/R44L/H92Y/R 217F/K302Q/I322M				+
551/552	P10T/E39M/R44L/T47S/D 316L				+
553/554	P10T/E39M/R44L/T47S/H 92Y/A206K/R217F				++
555/556	P10T/H92Y/K302Q/P337A				+
557/558	P10T/R44L/H92Y/R217F/ D247N/A271H/K302Q/D3 16L/T392M				+
559/560	P10T/R44L/T47S/P166S/A 271H/I322M/A368W				++
561/562	P10T/R44L/T47S/R217F/A 271H/D316L/I322M				+

563/564	R44L/T47S/H92Y/T392M				+
565/566	T47S/A271H				++
567/568	T47S/P166S/A206K/R217 F/D247N/P337A				+
569/570	E39M/R44L/P166S/A271H /P337A/A368W/T392M				+
571/572	E39M/R44L/T47S/H92Y/P 166S/A206K/T392M				+
573/574	H92Y/A206K/I322M				+
575/576	P10T/E39M/R44L/H92Y/K 302Q/I322M				+
577/578	P10T/E39M/R44L/T392M				+
579/580	R44L/T47S				+
581/582	D247N/D316L				+
583/584	D316L/P337A/T392M				+
585/586	D52N/R217F/K302Q/D316 L				+
587/588	H92Y/P166S/A206K/A271 H/D316L				+
589/590	P10T/G261A/P337A/T392 M				+
591/592	P10T/K36M/H92Y/P166S/ D247N/G261A/D316L/T39 2M				++
593/594	H92Y/R217F/A271H/P337 A				++
595/596	P10T/A368W				+
597/598	P10T/E39M/H92Y/P166S/ R217F/D247N/A271H				+
599/600	P10T/R44L/T47S/P166S/G 261A/A271H				+
601/602	R44L/D316L/I322M/T392 M				++
603/604	E39M/R44L/T47S/A206K/	+			++

	P337A/A368W/T392M				
605/606	P10T/R44L/A206K/D316L /I322M	+			+
607/608	E39M/R44L/P166S/A271H	++			++
609/610	E39M/T47S/D247N	++			+
611/612	P10T/A206K/D247N/G261 A	+++			++
613/614	P10T/E39M/R44L/H92Y/P 166S/T392M	+			++
615/616	P10T/R44L/P166S/K302Q	+++			++
617/618	P10T/T47S/H92Y/A271H/ K302Q	+			+
619/620	R44L/T47S/P166S/A271H	++			++
621/622	E39M/R44L/T47S/H92Y/A 206K/D247N/G261A	+++	+++		++
623/624	E39M/R44L/T47S/H92Y/A 206K/T392M	+++	++++		+++
625/626	P10T/E39M/T47S/H92Y/P 337A	++	+++		+
627/628	P10T/H92Y/P166S/R217F/ D247N/G261A/A271H			++	+
629/630	P10T/T47S/P166S/D316L			+	++
631/632	P10T/T47S/H92Y/D316L/I 322M/T392M			++	++
633/634	R217F/T392M			++	+
635/636	E39M/P166S/R217F/G261 A/D316L/A368W			+++	+++
637/638	E39M/T47S/P166S/R217F/ G261A/T392M			++	++
639/640	P10T/E39M/H92Y/R217F/ D316L			+++	++
641/642	D316L/I322M/A368W	+		+++	++
643/644	H92Y/P166S/D316L	+		+++	+++
645/646	H92Y/P166S/R217F/D316	+		+++	+++

	L/P337A/T392M				
647/648	H92Y/P166S/R217F/G261 A/A271H/T392M	+++		+++	+++
649/650	P10T/H92Y/D316L/I322M	+++		++++	+++
651/652	P10T/H92Y/P166S	+		++	+++
653/654	P10T/H92Y/P166S/P337A/ A368W	+		++	++
655/656	P10T/R217F/I322M	+		+++	+++
657/658	P10T/T47S/H92Y/P166S/A 271H/D316L/P337A	+		+++	++
659/660	P10T/T47S/P166S/A271H	++		++	++
661/662	P166S/D247N/A271H/D31 6L	+		++	+
663/664	P166S/D316L/I322M/P337 A	+		+	+
665/666	P166S/R217F/D316L/I322 M/P337A	+		+++	++
667/668	R44L/T47S/D247N/A271H /T392M	+++		+++	++
669/670	T47S/A206K	+++		+	+++
671/672	T47S/P166S/R217F/A271 H/P337A	+		+	+++
673/674	R44L/T47S/H92Y/R217F/ A271H	++		+++	+++
675/676	H92Y/G261A/A271H		+++	++	++
677/678	P10T/E39M/R44L/P166S/ G261A/A271H/D316L/I32 2M		+	++	+++
679/680	P10T/H92Y/P166S/G261A /A271H/T392M		+++	+	+++
681/682	T47S/R217F/D247N/G261 A		+	+++	+
683/684	E39M/H92Y/G261A/K302 Q	+++	++++	+	+

685/686	E39M/H92Y/P166S/R217F/ T392M	+++	+++	+++	++
687/688	E39M/I322M	+++	+++	++	++
689/690	E39M/R44L/H92Y/P166S/ D247N/G261A/K302Q/P33 7A	+++	++++	+	+
691/692	E39M/T392M	+	+++	++	+
693/694	E39M/T47S/H92Y/D316L/ I322M	+	+++	+	+
695/696	H92Y/A271H	+++	++++	++++	+++
697/698	P10T/E39M	+++	+++	++++	+++
699/700	P10T/G261A	++	++++	+++	++
701/702	P10T/H92Y/P166S/G261A/ D316L/I322M/P337A	++	+++	+++	+++
429/430	R44L/P337A	+	+	+	+++
431/432	R44L/T47S/H92Y/R217F/ D316L/I322M/T392M	+++	++	+++	+++
¹ Все активности были определены по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 374. Уровни повышенной активности определяли следующим образом: "+"=0,75-0,9; "++" > 0,9; "+++" > 1,1; и "++++" > 2.					

ПРИМЕР 10

In vivo характеристика вариантов GLA

[0197] Варианты GLA были охарактеризованы in vivo по их активности в отношении накопленного Gb3. Были использованы мыши с болезнью Фабри (5-месячные самки; Jackson, линия № 3535) и мыши дикого типа соответствующего возраста/пола с идентичным генетическим фоном. Мышам в хвостовую вену вводили однократную внутривенную инъекцию вариантов фермента Codexis (1,0 мг/кг). Животных умерщвляли путем анестезии CO₂ в определенные моменты времени (через 1 и 2 недели после инъекции), а ткани, пораженные заболеванием (например, сердца и почек), разрезали на две части (одну для анализа на активность фермента, а другую для количественного определения Gb3), замораживали на сухом льду и хранили при -80°C до проведения анализа. Для ферментативного анализа, мышинные ткани гомогенизировали в 20-кратном объеме (масса/объем) в буфере для лизиса (0,2% неионного поверхностно-активного вещества TRITON X-100™ (Sigma # 93443), разведенного в 1×PBS) с помощью автоматизированного пестика с покрытием из TEFLON® в стеклянном гомогенизаторе. Лизаты обрабатывали ультразвуком, центрифугировали при 14000 об/мин в течение 15 минут при 4°C, и супернатанты использовали для ферментного анализа. Активность α-Gal

А оценивали с помощью стандартного флуорометрического анализа с использованием 5 мМ 4-метилумбеллиферил- α -D-галактопиранозиды при pH 4,4 в присутствии 0,1 М N-ацетилгалактозамина (то есть, специфического ингибитора α -галактозидазы В). Концентрации белка оценивали с использованием набора для анализа белка BCA (Pierce, #23225). Активность нормализовали на концентрацию белка и выражали в нмоль/мг белка/час. Концентрации Gb3 измеряли с помощью масс-спектрометрии, как описано ранее (см. Durant et al., J. Lipid Res., 52:1742-6 [2011]). Вкратце, мышинные ткани гомогенизировали в 20-кратном объеме охлажденной льдом сверхчистой воды в стеклянном гомогенизаторе, а лизаты, соответствующие 200 мкг общего белка, подвергали экстракции гликофинголипидами, омылению и последующему анализу на Gb₃ с помощью масс-спектрометрии. Концентрацию Gb₃ выражали в нг/мг белка. На фигуре 5 представлен график, иллюстрирующий активность фермента *in vivo* в сердце мышей с моделью болезни Фабри через 1, 2 и 4 недели после обработки. На Фигуре 6 представлен график разложения Gb3 в ткани сердца у мышей с моделью болезни Фабри через 1 и 2 недели после обработки по сравнению с необработанными животными.

ПРИМЕР 11

Варианты GLA, полученные из SEQ ID NO: 704

[0198] В этом примере описаны эксперименты, проведенные для оценки активности, стабильности в сыворотке, внутриклеточной активности в фибробластах при болезни Фабри и клиренса Gb3 с использованием вариантов GLA в фибробластах при болезни Фабри. В этих экспериментах, варианты GLA тестировали на активность MU-Gal без предварительного инкубирования, после инкубирования с сывороткой, в лизатах фибробластов при болезни Фабри по сравнению с SEQ ID NO:704 (SEQ ID NO:704 представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 703, которая представляет собой вариант последовательности дрожжей SEQ ID NO: 275, оптимизированный по кодонам млекопитающих), как описано в Примере 5. Варианты также тестировали на истощение Gb3 в фибробластах при болезни Фабри, как описано в Примере 5.

Таблица 11-1. Относительная эффективность вариантов GLA (по сравнению с SEQ ID NO 704) ¹					
SEQ ID NO: (nt/aa)	Различия аминокислот (по сравнению с SEQ ID NO: 704)	Незаражены FIOPC	Стабильность FIOPC	Лизат FIOPC	FIOPC с дефицитом Gb3
705/706	A254T/L398F			++	
707/708	A271N	+	+		
709/710	A271N/F352N/Q391N	++	+++		
711/712	A271N/G333N	+++	++		

713/714	A271N/G333N/M390N /Q391N	++	+		
715/716	A271N/G333N/Q391N	++	+		
717/718	A278N			++	+
719/720	A278R	++	++		
721/722	A278S	+++	+++	++	++
723/724	A287R	+	+	+++	
725/726	A339G	++	+	+++	+
727/728	A339N	+++	+++	+++	
729/730	A339Q	+++	+++	+++	
731/732	A339V	++	+	++	++
733/734	C143S	+++	+++	+++	++
735/736	C143S/A271N	++	+++	+	
737/738	C143S/A271N/F352N/ M390N	+++	+++		
739/740	C143S/D202N	++	+++	+	+
741/742	C143S/E387N/Q391N	++	++		
743/744	C143S/G333N	++	++		
745/746	C143S/G333N/E387N/ M390T	+++	+++		+
747/748	C59A	+++	+++	+++	++
749/750	C59A/C143S	+++	+++	+++	++
751/752	C59A/C143S/A271N	+	++		
753/754	C59A/D202N	++	+++	++	++
755/756	C59T	+			++
757/758	C59T/C143S/D202N	+++	+++	+	++
759/760	C59T/C143S/G333N	++			
761/762	C59T/D202N/G333N	++			+
763/764	C59V/A271N/E387N/ M390T	+++			
765/766	C59V/C143S/D202N/A 271N/G333N	++			
767/768	D122E	++	+++	+	
769/770	D122N	++	++	+	

771/772	D122S	+		++	
773/774	D202N	+	++		
775/776	D202N/G333N	+			++
777/778	D24S/A271N/F352N	++			
779/780	D24S/C143S/D144N	++			+
781/782	D24S/C143S/D202N/F352N/M390N/Q391N	++	++		
783/784	D24S/C143S/D202N/G333N	++			+
785/786	D24S/C143S/G333N/F352N/E387N/M390T/Q391N	+++			
787/788	D24S/C143S/M390T/Q391N	+			++
789/790	D24S/C59A	++			++
791/792	D24S/D202N	++	++		++
793/794	D24S/D202N/A271N	++	++		
795/796	D24S/D202N/G333N/F352N	+			
797/798	D24S/E387N/Q391N	++	+		
799/800	D24S/F352N/E387N/M390N/Q391N	+++	++		
801/802	D284A	++	++	+++	
803/804	D284E	+++	+++	+++	
805/806	D284G	+		+++	+
807/808	D284L			+++	+
809/810	D284M	++	++	+++	
811/812	D284R	++	+	+++	
813/814	D284S	++	++	++++	
815/816	D2S	++			+++
817/818	D304T	++	++		+++
819/820	D304V	+			+++
821/822	D304W			++	+++
823/824	E147L	++			

825/826	E147S	++	++		
827/828	E367A	+++	+++		
829/830	E367D	++	++	+	+
831/832	E367L	++	+++	+++	+
833/834	E367M	++	+	+++	
835/836	E387N/Q391N	+++	+++		
837/838	E40Q	+		++	
839/840	G164E	++			
841/842	G303A	++	++	+	
843/844	G303C	++	+	++	
845/846	G303W	+++	+++	+++	
847/848	G333N/F352N	++			
849/850	G333N/M390N/Q391N	+++	+++		
851/852	G333N/M390S/Q391N	+++	+		
853/854	G333N/Q391N	+++	++		+
855/856	G4L	+			++
857/858	G73A				++
859/860	H155A	+++	+++	+	
861/862	H155D	+++	+++		
863/864	H155F	+++	++	+++	+++
865/866	H155L	++			+++
867/868	H155R	++	+++		
869/870	H155T	++	+++	+	
871/872	H375L	++	++		++
873/874	H375Q	++	+++		
875/876	H84G	++	++	+	++
877/878	H84K	+++	+++	+++	+++
879/880	H84R	+		+++	
881/882	I123Q	++	+++	++	
883/884	I123R	++	+	+++	
885/886	I123S	+		++	+
887/888	I123T	++	++	++	
889/890	I336F	++	++	++	
891/892	I336G				++

893/894	I336S			+	++
895/896	I336T	++	++	++	++
897/898	K277Q				+++
899/900	K277V			++	+++
901/902	K283L	++	+	+++	
903/904	K283P	++	+++	+++	
905/906	K283T	+	+	+++	++
907/908	K283V	+	+	+++	
909/910	K343L	++	++	++	++
911/912	K343R	+++	+++	+++	
913/914	K343S	++	++	+	
915/916	K343W			++	
917/918	K360H	++	++	+	+
919/920	K360V				++
921/922	K362H	++	+++		
923/924	L280G				++
925/926	L300F	++	+	+++	
927/928	L341F	++	+	++	++
929/930	L341M	++	++	++	
931/932	L398F	++	++	+++	
933/934	L5M	+	++		
935/936	L5V	+++	+++	++	
937/938	M390S	++	++		
939/940	N218Y	++	+	+++	
941/942	N218Y/L398F	+++	+	+++	
943/944	N218Y/R361T	++		+++	
945/946	N218Y/R361T/L398F	++	+	+++	
947/948	N377Q	++			
949/950	N91S/T215S/R361T	++		++	
951/952	P179H	+++	+++		+++
953/954	P179L				++
955/956	P179R	+++	+++		
957/958	P179W	++			
959/960	P331M	++	+		

961/962	P83R				+++
963/964	P83S				+++
965/966	Q275A	+++	+++	+++	+++
967/968	Q275G	+	++	++	
969/970	Q281I				++
971/972	Q281M				++
973/974	Q385R	+	+	+++	
975/976	Q76A	+		++	
977/978	Q76F	+		+++	
979/980	Q76M	++	+++	++	
981/982	Q76S			+++	
983/984	Q80T	++	+++	++	
985/986	R165I	++			
987/988	R325A	++			
989/990	R332G	++			
991/992	R332H	+++			
993/994	R361T	++	++	+++	
995/996	R361V	++	+++	+++	+++
997/998	R371G	+++	+++	+++	
999/1000	R373L	+++	+++	+	
1001/1002	R373S	+++	++	++	
1003/1004	S210I				+++
1005/1006	S273L	+		+++	
1007/1008	S31F	++	+	++	
1009/1010	S31H	++	+++	+	++
1011/1012	S31L	++	+++	+++	
1013/1014	S31T	++	++	+++	
1015/1016	S31W				++
1017/1018	S340H	+++	+++	++	++
1019/1020	S340I	+++	+++	+++	
1021/1022	S340K	+++	+++	+++	+++
1023/1024	S340M	+++	+++	+++	
1025/1026	S340P	++	++	+++	
1027/1028	S340W	++	++	+++	

1029/1030	T186E	++	++		
1031/1032	T186F	++	++		
1033/1034	T186M	+++	++		
1035/1036	T186P	++			
1037/1038	T186R	++	+		
1039/1040	T186S	+++	++		
1041/1042	T186Y	++	+++		
1043/1044	T215S/N218Y	++	+	+++	
1045/1046	T335A	+	+	++	++
1047/1048	T335L	++	+	++	
1049/1050	T369D	+++	+++	+++	
1051/1052	V338L	++	++	++	
1053/1054	V359F	++	++	++	
1055/1056	V359L	+++	+++	++	
1057/1058	V359R	++	++	++	
1059/1060	V382I			+++	
1061/1062	V382I/L398F	++	++	+++	
1063/1064	W246Y	++	++	++	++
1065/1066	Y334C	++	++	+++	++
1067/1068	Y334V	+++	+++	+++	+

¹ Все активности были определены по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 704. Уровни повышенной активности определяли следующим образом: "+"=0,75-0,9; "++" > 0,9; "+++> 1,1; и "++++" > 2.

ПРИМЕР 12

Варианты GLA, полученные из SEQ ID NO: 374

[0199] В этом примере описаны эксперименты, проведенные для оценки активности, стабильности в сыворотке, внутриклеточной активности в фибробластах при болезни Фабри и клиренса Gb3 с использованием вариантов GLA в фибробластах при болезни Фабри. В этих экспериментах, варианты GLA тестировали на активность MU-Gal без предварительного инкубирования, после инкубирования с сывороткой, в лизатах фибробластов при болезни Фабри как описано в Примере 5. Варианты также тестировали на истощение Gb3 в фибробластах при болезни Фабри, как описано в Примере 5.

Таблица 12-1. Относительная эффективность вариантов GLA (по сравнению с SEQ ID NO 374)¹

SEQ ID NO: (nt/aa)	Различия аминокислот (по сравнению с SEQ ID NO: 374)	Незараженн ые FIOPC	Стабильнос ть FIOPC	Лиза т FIOPC	FIOPC с дефицито м Gb3
1069/1070	A206C	+	+	+	+++
1071/1072	A206D	+	+	+	+
1073/1074	A206E	+++	+++	++	+++
1075/1076	A206F	++	++	+	+++
1077/1078	A206G	+++	++	+	++
1079/1080	A206H	+++	+++	++	++
1081/1082	A206I	++	+++	+++	++++
1083/1084	A206K	++	++	+	++++
1085/1086	A206L	++	++	+	++
1087/1088	A206M	++	+++++	+++	+++
1089/1090	A206N	++	++	++	+
1091/1092	A206P	+	+	-	+++
1093/1094	A206Q	++	++	+++	++++
1095/1096	A206R	++	+++	+++	+
1097/1098	A206S	-	-	-	+
1099/1100	A206T	+++	+++	+++	++
1101/1102	A206V	++	+++	+++	+++
1103/1104	A206W	+	+	+	+++
1105/1106	A206Y	++	++	++	++++
1107/1108	A271C	+	+	+	+
1109/1110	A271D	++	++	+	++
1111/1112	A271E	+++	++++	++	+
1113/1114	A271F	+	+	+	+
1115/1116	A271G	++	+	++	+
1117/1118	A271H	+	+	+	+
1119/1120	A271I	+	+	+	++++
1121/1122	A271K	+++	++++	++++	+
1123/1124	A271L	+	+	++	+
1125/1126	A271M	+	+	+	+
1127/1128	A271N	++++	++++	++	+

1129/1130	A271P	+	+	-	++++
1131/1132	A271Q	+	+	+	+
1133/1134	A271R	+++	++++	++++	+
1135/1136	A271S	++++	+++++	+	+
1137/1138	A271T	++	++++	+	-
1139/1140	A271V	+++	++	++	+
1141/1142	A271W	+	+	++++	++
1143/1144	A271Y	+	-	-	-
1145/1146	A368C	+++	++++	+++	+
1147/1148	A368D	+++	++++	++++	+
1149/1150	A368E	+++	+++	++	+++
1151/1152	A368F	+++	++	++	+
1153/1154	A368G	+	++++	+	-
1155/1156	A368H	+++	++	+++	+
1157/1158	A368I	++	+++	+++	+
1159/1160	A368K	+	+	+	+
1161/1162	A368L	++	+	+	+
1163/1164	A368M	++++	++++	+++	+
1165/1166	A368N	+++	+++	++	+
1167/1168	A368P	++	+++	+++	+
1169/1170	A368Q	+	++	+++	++
1171/1172	A368R	++	++	++	+
1173/1174	A368S	++	++	+	+
1175/1176	A368T	+++	+	+	+
1177/1178	A368V	+	+	+	+
1179/1180	A368W	++	+++	+++	+
1181/1182	A368Y	+++	+++	++++	+
1183/1184	D247A	+	++	+	+
1185/1186	D247C	+	+	+	-
1187/1188	D247E	+	+	++	+
1189/1190	D247F	+	-	+	+
1191/1192	D247G	+	++++	+	++
1193/1194	D247H	+	++++	+	+++
1195/1196	D247I	+	-	+	+

1197/1198	D247K	-	-	+	-
1199/1200	D247L	+	+	+	+
1201/1202	D247M	+	+	+++	+
1203/1204	D247N	++	++	+	++
1205/1206	D247P	+	+	+	++
1207/1208	D247Q	+	+	+	+
1209/1210	D247R	+	-	+	-
1211/1212	D247S	++	+++	+	+
1213/1214	D247T	+	+	++	++
1215/1216	D247V	+	-	+	-
1217/1218	D247W	+	+++	+	+
1219/1220	D247Y	+	+	+	+
1221/1222	D316A	+	+	+++	+
1223/1224	D316C	+	+	+	+++
1225/1226	D316E	++	+	++	++
1227/1228	D316F	+	+	++	+
1229/1230	D316G	+++	++++	++	+
1231/1232	D316H	+++	+++++	++++	+++
1233/1234	D316I	++	+	+++	+
1235/1236	D316K	++	++	+++	+
1237/1238	D316L	++	+++++	++	+
1239/1240	D316M	+	+	++	++
1241/1242	D316N	+++	+++	+++	++
1243/1244	D316P	+	+	+	+
1245/1246	D316Q	+	+	+	+
1247/1248	D316R	++	+++	+++	+
1249/1250	D316S	++	+++	+++	+
1251/1252	D316T	+	+++	++++	+
1253/1254	D316V	+	+	++	+
1255/1256	D316W	+	+	++	+
1257/1258	D316Y	++	+++	+++	+
1259/1260	E39A	+	+	+++	+
1261/1262	E39C	+	+	+	++
1263/1264	E39D	-	-	-	-

1265/1266	E39F	+	+	+	++++
1267/1268	E39G	-	-	-	+
1269/1270	E39H	++	++	++	+++
1271/1272	E39I	+	+	++	+
1273/1274	E39K	++	++	++++	+++
1275/1276	E39L	++	+++	+++	++++
1277/1278	E39M	++	+++	+	+++
1279/1280	E39N	+	+	+	+++
1281/1282	E39P	-	-	+	+
1283/1284	E39Q	+	+	++	++++
1285/1286	E39R	-	-	-	+
1287/1288	E39S	+	+	+	+++
1289/1290	E39T	+	+	++	++++
1291/1292	E39V	++	++	+	++++
1293/1294	E39W	+	+	+++	+++
1295/1296	E39Y	++	+++	++	+
1297/1298	G261A	++++	++++	++++ +	+
1299/1300	G261C	++	+	+	+
1301/1302	G261D	-	-	-	-
1303/1304	G261E	-	+	-	+
1305/1306	G261F	-	-	+	+
1307/1308	G261H	-	-	+	-
1309/1310	G261I	-	-	+	-
1311/1312	G261K	-	-	-	-
1313/1314	G261L	-	-	+	-
1315/1316	G261M	-	-	+	-
1317/1318	G261N	-	-	-	-
1319/1320	G261P	+	-	+	+
1321/1322	G261Q	-	-	+	-
1323/1324	G261R	-	+	-	-
1325/1326	G261S	++++	++++	++++	+
1327/1328	G261T	++	-	+	-
1329/1330	G261V	+	-	+	+

1331/1332	G261W	-	-	+	-
1333/1334	G261Y	-	-	-	+
1335/1336	H92A	+	+	+++	+
1337/1338	H92C	+	+	+	+
1339/1340	H92D	+	+	+	+
1341/1342	H92E	+	+	+++	++
1343/1344	H92F	+++	+++	+++	+
1345/1346	H92G	+	+	+	+
1347/1348	H92I	++	+	+	+
1349/1350	H92K	+++	+++	+++	+
1351/1352	H92L	++	+++	+++	+
1353/1354	H92M	+	+	+	+
1355/1356	H92N	+	+	+	++
1357/1358	H92P	-	-	-	-
1359/1360	H92Q	++	++	++	++++
1361/1362	H92R	++	++	+	+++
1363/1364	H92S	++	+++	+++	+
1365/1366	H92T	++++	+++++	++++	+
1367/1368	H92V	+++	+++++	+++	++++
1369/1370	H92W	++	++	++	+++
1371/1372	H92Y	++	++	+++	++
1373/1374	I322A	+	+	+	+
1375/1376	I322C	+	+	+	+
1377/1378	I322D	-	-	-	+
1379/1380	I322E	+	+	+	+
1381/1382	I322F	+	+	++	+
1383/1384	I322G	+	-	+	-
1385/1386	I322H	-	-	+	-
1387/1388	I322K	+	+	+	-
1389/1390	I322L	+	++	++	+
1391/1392	I322M	+	+++	++++	+
1393/1394	I322N	-	+	+	-
1395/1396	I322P	-	-	+	+
1397/1398	I322Q	+	+	+	+

1399/1400	I322R	-	-	+	-
1401/1402	I322S	+	-	+	++
1403/1404	I322T	+	+	+	++
1405/1406	I322V	+	+	+	+
1407/1408	I322W	+	+	+	-
1409/1410	I322Y	+	+	+	-
1411/1412	K302A	+	+	+	+
1413/1414	K302C	+++	+++	+++	+
1415/1416	K302D	+	+	+	+
1417/1418	K302E	+	+	+	+
1419/1420	K302F	++	+++	+++	+
1421/1422	K302G	+++	++++	++	+
1423/1424	K302H	++++	++++	++++	+
1425/1426	K302I	+	+	++	+
1427/1428	K302L	+++	+++++	++++	++++
1429/1430	K302M	++	++++	+++	+
1431/1432	K302N	+	+	+	+
1433/1434	K302P	+	+	+	+
1435/1436	K302Q	++	+	++	++
1437/1438	K302R	+	+	++	+
1439/1440	K302S	++	+	+	+
1441/1442	K302T	+++	++++	++++	++
1443/1444	K302V	++	+++	++	+
1445/1446	K302W	+	+++++	+++	+
1447/1448	K302Y	+++	+++	++++	+
1449/1450	P10A	++	+	+	++
1451/1452	P10C	+	++	+	-
1453/1454	P10D	+	-	+	+
1455/1456	P10E	+	-	+	+
1457/1458	P10F	-	+	-	-
1459/1460	P10G	+++	++++	+++	+++
1461/1462	P10H	+	-	+	+
1463/1464	P10I	+	+	+	++++
1465/1466	P10K	+	-	+	+

1467/1468	P10L	-	-	-	-
1469/1470	P10M	++	-	+	+++
1471/1472	P10N	+	-	+	+
1473/1474	P10Q	+	+	+	+++
1475/1476	P10R	+	+	+	++++
1477/1478	P10S	+	+	+	+++
1479/1480	P10T	+	++	++	+
1481/1482	P10V	+	+	+	+
1483/1484	P10W	-	-	-	-
1485/1486	P10Y	-	-	-	++
1487/1488	P166A	++	+	++	+
1489/1490	P166C	+	-	+	+
1491/1492	P166D	++++	++++	+++	+
1493/1494	P166E	++	++	+	++
1495/1496	P166F	+	+	+	+
1497/1498	P166G	-	-	-	-
1499/1500	P166H	+	+	++	+
1501/1502	P166I	+	-	+	+
1503/1504	P166K	++	+	+	++
1505/1506	P166L	+	+	+	++++
1507/1508	P166M	+	+	+	+
1509/1510	P166N	+	+	+	++++
1511/1512	P166Q	-	-	-	-
1513/1514	P166R	+	+	++	+++
1515/1516	P166S	+	+	+	+++
1517/1518	P166T	+	+	+	+++
1519/1520	P166V	-	-	-	-
1521/1522	P166W	-	-	-	+
1523/1524	P166Y	++	+	++	+
1525/1526	P337A	+	+	+	+
1527/1528	P337C	+	+	+	+++
1529/1530	P337D	++	++++	++	-
1531/1532	P337E	+	+	+	-
1533/1534	P337F	++	+++++	++++	++++

1535/1536	P337G	+	+	+	+
1537/1538	P337H	++	+++	+	++
1539/1540	P337I	++	+	++++	+
1541/1542	P337K	+	++	++	+
1543/1544	P337L	++	+	++	+
1545/1546	P337M	+	+	+	+++
1547/1548	P337N	++	++	+	+
1549/1550	P337Q	+	++	+	+
1551/1552	P337R	++	+++	+++	+
1553/1554	P337S	+++	+++++	++++	+
1555/1556	P337T	+	++	++	+
1557/1558	P337V	+	+	+	+
1559/1560	P337W	+	+	++++ +	++
1561/1562	P337Y	+++	+	+++	-
1563/1564	R217A	++	+++	++	+
1565/1566	R217C	+	+	+	++++
1567/1568	R217D	+	++	+	++++
1569/1570	R217E	+++	+++	+++	+
1571/1572	R217F	++	+	+++	+++
1573/1574	R217G	+++	+++	+++	+
1575/1576	R217H	++	++	+	+++
1577/1578	R217I	+++	+++	+++	+++
1579/1580	R217K	++	++	+	++++
1581/1582	R217L	+	+	+	++
1583/1584	R217M	+	+	+	++
1585/1586	R217N	+++	+++	++	+++
1587/1588	R217P	++	+	+	+++
1589/1590	R217Q	++	++	++	+
1591/1592	R217S	+++	+++	+++	+++
1593/1594	R217T	+	-	+	+++
1595/1596	R217V	++	++	+	++
1597/1598	R217W	+++	+	++++	++
1599/1600	R217Y	+	+	++	+

1601/1602	R44A	++	+	+	+
1603/1604	R44C	++	+++	+	+
1605/1606	R44D	+	-	+	+
1607/1608	R44E	++	+	+	+
1609/1610	R44F	+++	+++	++	+
1611/1612	R44G	+	+	+	+
1613/1614	R44H	+	+	+	++
1615/1616	R44I	+++	+++	+	++
1617/1618	R44K	+++	+++	++	+
1619/1620	R44L	+	+	+	+++
1621/1622	R44N	+	++	++	+
1623/1624	R44P	-	-	+	+
1625/1626	R44Q	+++	++++	+++	+
1627/1628	R44S	++	++	++	++++
1629/1630	R44T	+	+	+	++++
1631/1632	R44V	+++	+++	++++	+
1633/1634	R44W	+	+	+	+
1635/1636	R44Y	+	+	+	++++
1637/1638	T392A	++	++	++	++++
1639/1640	T392C	+	+	+	+++
1641/1642	T392D	+++	++++	+++	++
1643/1644	T392E	+++	+++++	++++	++++
1645/1646	T392F	+	+	+	++
1647/1648	T392G	+	++	+	++
1649/1650	T392H	++	+++	++	+
1651/1652	T392I	+	+	+++	+
1653/1654	T392K	++	+++	+	+++
1655/1656	T392L	++	++	+	+++
1657/1658	T392M	+	++	+	+++
1659/1660	T392N	++	+++	++++	+
1661/1662	T392P	+++	+++	++	+++
1663/1664	T392Q	++	+	+	+++
1665/1666	T392R	++	+++	+	++
1667/1668	T392S	++	+++	+++	++++

1669/1670	T392V	++	+++	++	++
1671/1672	T392W	+	+	+++	++++
1673/1674	T392Y	+	+	+	+
1675/1676	T47A	++	+++	+++	+
1677/1678	T47C	+	+	+	-
1679/1680	T47D	+	+	+	+
1681/1682	T47E	+	+	+	+++
1683/1684	T47F	+	+	+	+++
1685/1686	T47G	+	+	+	+++
1687/1688	T47H	++	+	+++	+
1689/1690	T47I	++	+	++	++
1691/1692	T47K	+	++	+++	+
1693/1694	T47L	+	+	+	+
1695/1696	T47M	+	+	+++	+
1697/1698	T47N	++	++	++	+++
1699/1700	T47P	-	-	-	++
1701/1702	T47Q	+	+	+	++++
1703/1704	T47R	+++	++++	++++	+
1705/1706	T47S	+	+	+	++
1707/1708	T47V	++	+++	++++	+
1709/1710	T47W	+	+	+	+
1711/1712	T47Y	+	+	++	+++

¹ Все активности были определены по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 374. Уровни повышенной активности определяли следующим образом: "-" < 0,1; "+" 0,1-0,9; "++" > 0,9; "+++" > 1,1; "++++" > 1,5; and "+++++" > 2,5.

ПРИМЕР 13

Варианты GLA, полученные из SEQ ID NO: 1022

[0200] В этом примере описаны эксперименты, проведенные для оценки активности, стабильности в сыворотке и внутриклеточной активности в фибробластах при болезни Фабри. В этих экспериментах, варианты GLA тестировали на активность MU-Gal без предварительного инкубирования, после инкубирования с сывороткой, в лизатах фибробластов при болезни Фабри как описано в Примере 5.

Таблица 13-1. Относительная эффективность вариантов GLA (по сравнению с SEQ ID NO 1022)¹

SEQ ID NO: (nt/aa)	Различия аминокислот (по сравнению с SEQ ID NO: 1022)	Незаражен ые FIOPC	Стабильнос ть FIOPC	Лизат FIOPC
1713/1714	D284S	+++	+++	++++
1715/1716	H92T/A368E	+++	++++	++++
1717/1718	K283T	+++	+++	++++
1719/1720	K283T/D284E	++	+	++++
1721/1722	D284M	+	++	+++
1723/1724	H92T	+++	+++	+++
1725/1726	H92Q	+++	+++	+++
1727/1728	S31T/T47R	++	+	+++
1729/1730	E39V/R44V/T47R/G261S/K283L/D284A	+	+	+++
1731/1732	E39L/D284S	++	+++	+++
1733/1734	A206I	+++	+++	+++
1735/1736	E39V/R44V/K283T	+++	+++	+++
1737/1738	H92V/Q275A/D284S	+	+	+++
1739/1740	H92T/K283P	+++	+++	+++
1741/1742	H92T/D284M	++	+	+++
1743/1744	H155F	+++	++	+++
1745/1746	K302L	+++	+++	+++
1747/1748	G261S	+++	+++	+++
1749/1750	A271K/A368E	+++	+++	+++
1751/1752	H84K/H92V	+++	+++	+++
1753/1754	H92T/A271K	+++	+++	+++
1755/1756	H92V/A206E/D284S	+++	+++	+++
1757/1758	G261S/K283L	+	+	+++
1759/1760	S31T	+	+	+++
1761/1762	H84K/D284S/K302L/T392A	++	++	+++
1763/1764	E39V/R44V/T47R	+++	++	+++
1765/1766	H84K/A368E/T392A	++	+++	+++
1767/1768	D316H	+++	+++	+++
1769/1770	S31T/K283L/D284A			+++
1771/1772	A271K	++	+++	+++

1773/1774	A368E/T392W	+++	+++	+++
1775/1776	R44V	+++	++	+++
1777/1778	A206Q	++	++	+++
1779/1780	E39L	+++	++	++
1781/1782	H84K/D316H	++	+	++
1783/1784	H92T/K283V/T392W	++	+	++
1785/1786	K283L	+	+	++
1787/1788	P166D/K283L/D284A			++
1789/1790	S31T/E39V/R44V/P166D/K302Y	+		++
1791/1792	A339N	+++	+++	++
1793/1794	Y334C	+	+	++
1795/1796	E39L/H92V	+	+	++
1797/1798	H155F/A368E	++	++	++
1799/1800	H92V	+++	+++	++
1801/1802	H92V/D284S	+	+	++
1803/1804	D284E	++	++	++
1805/1806	T392W	++	+	++
1807/1808	H92V/D316H	+++	+++	++
1809/1810	K283P/T392W	+	+	++
1811/1812	A206T/Y334C	+		++
1813/1814	A368E	+++	++	++
1815/1816	E39V/T47R/G261S			++
1817/1818	Q275A	+++	++	++
1819/1820	H92V/A206Y/Q275A	+++	++	++
1821/1822	P10G	+++		+
1823/1824	H92T/A206E/R217N	+++	+++	+
1825/1826	T392A	+++	+++	+
1827/1828	T392D	++	+	+
1829/1830	E39V/R44V/A339N	+++	++	+
1831/1832	E39V/R44V	+++	+++	+
1833/1834	A206Y	++	+++	+
1835/1836	H92T/A271K/K277R	++	+	+
1837/1838	H92T/A206E/K302T/A368E	+++	+	+
1839/1840	A206E	++	+	+

1841/1842	H84K	++	++	+
1843/1844	P166D	+++	+	+
1845/1846	A206E/R217N	++	++	+
1847/1848	H155F/R217I	++	+	+
1849/1850	P10G/T392D	++		+
1851/1852	E39L/A206E	++	++	+
1853/1854	K302Y	+++	+++	+
1855/1856	H92V/K302L	++	+	+
1857/1858	H92T/K302L	++	+	+
1859/1860	P166D/K302Y	++		
1861/1862	R44V/D284E/K302Y	++	+	
1863/1864	P166D/K283T	+		+
¹ Все активности были определены по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 1022. Уровни повышенной активности определяли следующим образом: "+"=0,5-0,9; "++" > 0,9; "+++" > 1,1; и "++++" > 2.				

Стабильность в сыворотке очищенных вариантов GLA, полученных в суспензионных культурах

[0201] Для оценки относительной стабильности вариантов в присутствии крови, образцы подвергали воздействию сыворотки. Сначала, в лунки 96-луночного круглодонного планшета COSTAR® (Corning) добавляли 100 мкл 7,5 мкг/мл очищенных вариантов GLA в 1x PBS, pH 6,2, и 90 мкл человеческой сыворотки. Планшеты запечатывали и инкубировали при 37°C в течение 0-24 часов. Для анализа, 50 мкл зараженного супернатанта смешивали с 50 мкл 1 mM MUGal в буфере McIlvaine с pH 4,4. Реакционные смеси быстро перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 90 минут перед гашением 100 мкл 0,5 М карбоната натрия, pH 10,2. Гидролиз анализировали с использованием устройства для считывания микропланшетов ENVISION® (PerkinElmer) путем мониторинга флуоресценции (на длине волны возбуждения 355 нм, на длине волны излучения 460 нм). Процентную остаточную активность в сыворотке вычисляли через 24 часа путем деления активности зараженных образцов на активность незараженных образцов, где «незараженный» относится к гидролизу, оцененному на время 0, а «зараженный» относится к гидролизу, оцененному в указанные моменты времени для каждого варианта. На фигуре 7 представлен график, иллюстрирующий остаточную активность вариантов GLA после заражения человеческой сывороткой в течение 0-24 часов.

Поглощение очищенных вариантов GLA фибробластами при болезни Фабри, полученными в суспензионных культурах

[0202] Поглощение вариантов GLA клетками по сравнению с эталонным ферментом (GLA дикого типа [SEQ ID NO: 2]) определяли для оценки общей способности

вариантов подвергаться эндоцитозу в культивируемых клетках. Фибробласты пациентов с болезнью Фабри (GMO2775, Институт медицинских исследований Кориелла) высевали в 96-луночные чашки для культивирования (VWR, № 10861-698), содержащие минимальную поддерживающую среду (MEM; Gibco № 11095-080, дополненную 1% заменимых аминокислот (NEAA; Gibco #11140-050) и 15% фетальной бычьей сыворотки (Corning #35-016-CV)) и культивировали до конфлюэнтности (1-3 дня при 37°C, 5% CO₂). После достижения конфлюэнтности, добавленную MEM удаляли в стерильном вакууме и заменяли на 1 мл/лунку MEM без сыворотки +1% NEAA. Ферменты, очищенные, как описано в Примере 4, добавляли к клеткам в дозе от 220 нМ до 2 нМ и инкубировали в течение 4 часов при 37°C, 5% CO₂. Затем клетки 2 раза промывали 100 мкл стерильного 1×PBS на лунку и PBS отсасывали в стерильном вакууме. Затем клетки инкубировали в среде, содержащей минимальную поддерживающую среду (MEM; Gibco #11095-080, с добавлением 1% заменимых аминокислот (NEAA; Gibco #11140-050) и 15% эмбриональной бычьей сыворотки [Corning #35-016-CV]) и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 3 дней. Через 3 дня, клетки дважды промывали 100 мкл стерильного 1×PBS на лунку и отсасывали PBS в стерильном вакууме. Затем к каждому образцу добавляли 25 мкл буфера для лизиса (0,2% неионного поверхностно-активного вещества TRITON X-100™ [Sigma #93443], разведенного в 1xPBS), после чего обрабатывали ультразвуком в течение 1-2 минут и центрифугировали при 12000-14000 об/мин в течение 10 минут при 4°C. Для анализа на активность, 25 мкл образца лизиса клеток смешивали с 25 мкл 2,5 мМ MUGal в буфере McIlvaine, pH 4,6. Реакционные планшеты запечатывали и инкубировали при 37°C в течение 60 минут перед гашением реакции 150 мкл 0,5 М карбоната натрия, pH 10,2 на лунку. Гидролиз MUGal определяли с использованием устройства для считывания микропланшетов ENVISION® (PerkinElmer) с мониторингом флуоресценции (на длине волны поглощения 355 нм, на длине волны излучения 460 нм). На Фигуре 8 представлен график поглощения очищенных вариантов GLA клетками в культивируемых фибробластах пациентов с болезнью Фабри после 4-часового инкубирования и 3-дневной промывки при 37°C.

ПРИМЕР 14

In vivo характеристика вариантов GLA

[0203] В этом примере описаны эксперименты, проведенные с использованием животных-моделей для характеристики некоторых вариантов GLA. Краткое описание протокола исследования для оценки фармакокинетических профилей у мышей представлено в Таблице 14-1. Исследование проводили в одну стадию на 36 мышам-самцах линии C57Bl/6 (массой 20-25 г). Животных оставляли для акклиматизации не менее чем за трое суток до эксперимента. Всем животным в хвостовую вену вводили однократную внутривенную инъекцию 1 мг/кг либо GLA дикого типа (SEQ ID NO: 2), либо вариантов GLA. Индивидуальные дозы вычисляли на основе массы тела, определенной в день введения дозы.

Таблица 14-1. Краткое описание протокола исследования
--

Группа #/Фермент SEQ ID NO:	Число мышей	CDX- вариант (мг/кг)	Объем доз (мл)	Время забора крови после введения дозы
1/SEQ ID NO: 2	6	1	0,2	5, 20, 40 и 240 минут
2/ SEQ ID NO: 4	6	1	0,2	
3/ SEQ ID NO: 58	6	1	0,2	
4/ SEQ ID NO: 2	6	1	0,2	10, 30, 60 и 360 минут
5/ SEQ ID NO: 4	6	1	0,2	
6/ SEQ ID NO: 58	6	1	0,2	

[0204] В заранее определенные моменты времени, у шести мышей на каждую испытуемую пробу брали приблизительно 150 мкл цельной крови (по очереди у двух групп, включающих по 6 животных для каждого периода времени как показано в Таблице 14-1) в гепаринизированные капиллярные пробирки, которые сразу же обрабатывали для получения плазмы и хранили при -80°C до проведения анализа. Активность GLA в плазме оценивали с использованием стандартного флуорометрического анализа MuGal, как описано в Примере 5. В целом, варианты GLA продемонстрировали превосходные фармакокинетические профили в плазме по сравнению с SEQ ID NO: 2, при этом, последний имел самый быстрый клиренс с предполагаемым периодом полувыведения ($t_{1/2}$) приблизительно 10 минут. Для сравнения, $t_{1/2}$ для вариантов GLA был приблизительно в 10 раз выше. Данные представлены в Таблице 14-2.

Таблица 14-2. ФК-параметры вариантов GLA после внутривенного введения мышам					
Фермент (SEQ ID NO:)	Время полужизни (ч.)	$C_{\max}$ (мкг/мл)	AUC_{0-t} (мкг*ч/мл)	CL (л/ч/кг)	V_z (л/кг)
SEQ ID NO: 2	0,15	4,96	1,26	0,792	0,170
SEQ ID NO: 4	1,58	13,3	12,37	0,076	0,174
SEQ ID NO: 58	1,70	26,6	18,25	0,051	0,125

[0205] В дополнение к описанным выше исследованиям на мышах, были проведены эксперименты по определению фармакокинетики некоторых вариантов GLA у здоровых крыс. Краткий протокол исследования показан в Таблице 14-3. Первое исследование было проведено в 3 стадии и включало 21 крысу. Животных оставляли для акклиматизации по меньшей мере за трое суток до проведения эксперимента. Всем животным внутривенно через канюлю в яремную вену вводили либо GLA дикого типа (SEQ ID NO: 2), либо вариант GLA. Индивидуальные дозы вычисляли на основе массы тела, определенной в день введения дозы.

Таблица 14-3. Краткое описание протокола исследования
--

Группа #/Фермент SEQ ID NO:	Число крыс	CDX- вариант	Объем доз (мл/кг)	Время забора крови
1/ SEQ ID NO: 2	3	1	0.5	5, 10, 20, 30, 60 минут; 4 и 8 часов
2/ SEQ ID NO: 6	3	1	0,5	
3/ SEQ ID NO: 16	3	1	0,5	
4/ SEQ ID NO: 58	3	1	0,5	
5/ SEQ ID NO: 60	3	1	0,5	
6/ SEQ ID NO: 40	3	1	0,5	
7/ SEQ ID NO: 62	3	1	0,5	

[0206] Кровь (приблизительно 0,25 мл) брали в заранее определенные моменты времени, показанные в Таблице 14-3, от каждой крысы в пробирки с сепаратором для EDTA, сразу обрабатывали для получения плазмы и хранили при -80°C до проведения анализа. Активность GLA в плазме оценивали с помощью стандартного флуорометрического анализа MuGal, как описано в Примере 5. Все варианты GLA продемонстрировали улучшенные фармакокинетические свойства по сравнению с SEQ ID NO: 2. Данные для всех фармакокинетических параметров представлены в Таблице 14-4.

Таблица 14-4. ФК-параметры вариантов GLA после внутривенного введения крысам						
Фермент (SEQ ID NO:)	Время полужизни (ч.)	C _{max} (μRFU/мл)	AUC _{0-t} (RFU*ч/мл)	AUC _{0-inf} (RFU*ч/мл)	CL (мл/ч/кг на RFU/нг)	Vz (мл/кг на RFU/нг)
SEQ ID NO: 2	0,29	27928	25119	30043	33,29	177,7
SEQ ID NO: 6	4,03	31448	151918	204505	4,89	28,5
SEQ ID NO: 16	1,90	29612	103002	108390	9,23	25,3
SEQ ID NO: 58	2,36	28501	80216	88512	11,3	38,5
SEQ ID NO: 60	2,24	32473	79210	86890	11,5	37,2
SEQ ID NO: 40	2,03	28158	60334	64303	15,6	45,5
SEQ ID NO: 62	2,11	32811	104884	113191	8,83	26,9

[0207] Краткий протокол ФК-исследования для крыс группы 2 показан в Таблице 14-5. Исследование было проведено в 1 стадию и включало 18 крыс. Животных оставляли

для акклиматизации по меньшей мере за трое суток до проведения эксперимента. Всем животным внутривенно через канюлю в яремную вену вводили либо GLA дикого типа (SEQ ID NO: 2), либо вариант GLA. Индивидуальные дозы вычисляли на основе массы тела, определенной в день введения дозы.

Таблица 14-5. Краткое описание протокола исследования					
Группа #/Фермент SEQ ID NO:	Число крыс	CDX- вариант (мг/кг)	Объем доз (мл/кг)	Время забора крови	
1/ SEQ ID NO: 2	3	1	0,5	5, 10, 20, 30, 60 минут; 4 и 8 часов	
3/ SEQ ID NO: 4	3	1	0,5		
4/ SEQ ID NO: 6	3	1	0,5		
5/ SEQ ID NO: 8	3	1	0,5		
6/ SEQ ID NO: 58					

[0208] Кровь (приблизительно 0,25 мл) брали в заранее определенные моменты времени, показанные в Таблице 14-5, в пробирки с сепаратором для EDTA, сразу обрабатывали для получения плазмы и хранили при -80°C до проведения анализа. Активность GLA в плазме оценивали с помощью стандартного флуорометрического анализа MuGal, как описано в Примере 5. Все дозы вариантов GLA продемонстрировали улучшенные фармакокинетические свойства по сравнению с SEQ ID NO: 2. Данные для всех ФК-параметров представлены в Таблице 14-6.

Таблица 14-6. ФК-параметры вариантов GLA после внутривенного введения крысам					
Фермент (SEQ ID NO:)	Время полужизни (ч.)	C_{max} (μRFU/мл)	AUC_{0-t} (RFU*ч/мл)	CL (мл/ч/кг на RFU/нг)	Vz (мл/кг на RFU/нг)
SEQ ID NO: 2	0,23	21119	14268	70,1	23,6
SEQ ID NO: 4	4,24	23545	96634	7,47	45,7
SEQ ID NO: 6	2,94	21708	72432	11,68	49,5
SEQ ID NO: 8	3,43	23922	86509	9,34	46,2
SEQ ID NO: 58	2,02	23055	55193	16,96	49,3

[0209] В дополнение к описанным выше исследованиям на мышах и крысах, были проведены эксперименты на приматах-моделях. Краткий протокол исследования показан в Таблице 14-7. Исследование было проведено в 1 стадию и включало 12 самцов собакоподобных обезьян (2-3 кг). Животные были получены из группы животных Испытательного Центра и рассматривались как животные с дефицитом нужного белка. Всем животным внутривенно вводили либо GLA дикого типа (SEQ ID NO: 2), либо вариант GLA. Индивидуальные дозы вычисляли на основе массы тела, взятой в день

введения дозы.

Таблица 14-7. Краткое описание протокола исследования				
Группа #/Фермент SEQ	Число обезьян	CDX-вариант (мг/кг)	Объем доз (мл/кг)	Время забора крови
1/ SEQ ID NO: 2	4	1	1	15, 30, 45, 60, 90 минут; 2, 4, 6, 8, 12, 24 и 48 часов
2/ SEQ ID NO: 4	4	1	1	
3/ SEQ ID NO: 58	4	1	1	

[0210] Кровь (приблизительно 0,5 мл) брали в заранее определенные моменты времени, показанные в Таблице 14-7, в пробирки с сепаратором для EDTA, сразу обрабатывали для получения плазмы и хранили при -80°C до проведения анализа. Активность GLA в плазме оценивали с помощью стандартного флуорометрического анализа MuGal, как описано в Примере 5. Все дозы вариантов GLA продемонстрировали улучшенные фармакокинетические свойства по сравнению с SEQ ID NO: 2. Данные для всех ФК-параметров представлены в Таблице 14-8.

Таблица 14-8. ФК-параметры вариантов GLA после внутривенного введения собакоподобным обезьянам					
Фермент (SEQ ID NO:)	Время полужизни (ч.)	C_{max} (мкг/мл)	AUC_{0-t} (мкг*ч/мл))	CL (л/ч/кг)	V_z (л/кг)
SEQ ID NO: 2	0,19	21,9	10,2	0,15	0,04
SEQ ID NO: 4	5,2	33,5	108	0,009	0,07
SEQ ID NO: 58	1,32	26,5	35,2	0,03	0,05

[0211] Краткий протокол исследования показан в Таблице 14-9 для второго исследования ФК у обезьян. Исследование было проведено в 1 стадию и включало 12 собакоподобных обезьян (3 животных на группу). Животные были получены из группы животных Испытательного Центра и рассматривались как животные с дефицитом белка GLA. Всем животным внутривенно вводили либо GLA дикого типа (SEQ ID NO: 2), либо вариант GLA. Индивидуальные дозы вычисляли на основе массы тела, взятой в день введения дозы. Пробы крови брали в следующие моменты времени: перед введением дозы (за 3 часа), через 1, 5, 15, 30 минут и через 1, 2, 4, 8, 12 и 24 часа после введения дозы.

Таблица 14-9. Краткое описание протокола исследования				
Фермент (SEQ ID NO:)	Способ введения	Уровень доз ТІ (мг/кг)	Концентрация ТІ (мг/мл)	Объем доз ТІ (мл/кг)
SEQ ID NO: 2	IV	1	1	1
SEQ ID NO: 158				
SEQ ID NO: 704				

SEQ ID NO: 1022				
-----------------	--	--	--	--

[0212] Кровь (приблизительно 1 мл) брали в заранее определенные моменты времени, показанные в Таблице 14-7, в пробирки с сепаратором для EDTA, сразу обрабатывали для получения плазмы и хранили при -80°C до проведения анализа. Активность GLA в плазме оценивали с помощью стандартного флуорометрического анализа MuGal, как описано в Примере 5. Все дозы вариантов GLA продемонстрировали улучшенные фармакокинетические свойства по сравнению с SEQ ID NO: 2. Данные для всех ФК-параметров представлены в Таблице 14-10.

Таблица 14-10. ФК-параметры вариантов GLA после внутривенного введения обезьянам					
Фермент (SEQ ID NO:)	Время полужизни (ч.)	C_{max} (мкг/мл)	AUC_{0-t} (мкг*ч/мл)	CL (л/ч/кг)	Vz (л/кг)
SEQ ID NO: 2	0,23	19,7	5,63	0,185	0,061
SEQ ID NO: 158	1,96	33,2	19,8	0,051	0,144
SEQ ID NO: 704	2,46	24,5	14,8	0,074	0,266
SEQ ID NO: 1022	3,60	24,9	14,1	0,071	0,370

Эффективность вариантов GLA по сравнению с rhGLA у мышей с нокаутом гена Фабри

[0213] Мыши с болезнью Фабри (5-месячные самки; Jackson, линия № 3535) и мыши дикого типа соответствующего возраста/пола с идентичным генетическим фоном были использованы для оценки эффективности шести вариантов GLA (SEQ ID NO: 4, 58, 158, 704, 1022 и 1864) по сравнению с GLA дикого типа (SEQ ID NO: 2). Мышам вводили варианты фермента (0,1, 0,3 или 1,0 мг/кг посредством инъекции в хвостовую вену) один раз в неделю в течение 4 недель (n=5/группу). Через 7 дней после последней инъекции, животных анестезировали для осуществления пункции сердца для забора крови в пробирки К3 с EDTA, а затем подвергали эвтаназии. Перфузию всего тела через сердце проводили с использованием холодного физиологического раствора для удаления загрязняющей крови из тканей. Ткани, пораженные заболеванием (например, сердце и почки), разрезали на две части (одну брали для анализа на ферментативную активность, а другую для количественного определения Gb3 и лизо-Gb3), а затем замораживали на сухом льду и хранили при -80°C до проведения анализа. Кровь сразу обрабатывали для получения плазмы и хранили при -80°C до проведения анализа. Активность GLA в плазме и в тканях оценивали с помощью стандартного флуорометрического анализа MuGal, как описано в Примере 5. Уровни Gb3 и лизо-Gb3 в плазме и тканях оценивали методом, описанным в Примере 10, и ткани гомогенизировали, как описано в Примере 10. За исключением некоторых случаев, например, SEQ ID NO: 1864, все варианты GLA были более эффективными, чем SEQ ID NO: 2 у мышей с моделью болезни Фабри.

[0214] На фигурах 9 и 10 представлены графики, иллюстрирующие активность

ферментов *in vivo* в сердце и почках, соответственно, у мышей с моделью болезни Фабри через 7 дней после последней обработки. На фигуре 9, данные представлены как среднее $\pm$ SEM. Для сравнения результатов с результатами для SEQ ID NO: 2 проводили двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с постериорным критерием Даннета; « $\wedge$ », $p < 0,0001$, неблагоприятные значительные увеличения по сравнению с SEQ ID NO: 2 на этой фигуре не показаны. На фигуре 10, данные представлены как среднее $\pm$ SEM. Для сравнения результатов с результатами для SEQ ID NO: 2 проводили двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным критерием Даннета; «*» $p < 0,05$; «**» $p < 0,005$; и « $\wedge$ », $p < 0,0001$, неблагоприятные значительные увеличения по сравнению с SEQ ID NO: 2 на этой фигуре не показаны. На фигурах 11 и 12 представлены графики разложения Gb3 в тканях сердца и почек, соответственно. На фигуре 11, данные представлены как среднее $\pm$ SEM. Для сравнения результатов с результатами для SEQ ID NO: 2 проводили двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным критерием Даннета; при дозе 0,1 мг/кг, «*», $p < 0,05$ для SEQ ID NO: 158 и 1022; и при дозе 0,3 мг/кг, « $\wedge$ », $p < 0,0001$, для SEQ ID NO: 158; «**», $p < 0,005$ для SEQ ID NO: 58, 704, 1022 и 1864. На фигуре 12, данные представлены как среднее $\pm$ SEM. Для сравнения результатов с результатами для SEQ ID NO: 2 проводили двухфакторный дисперсионный анализ с апостериорным критерием Даннета; при дозе 0,1 мг/кг, « $\wedge$ », $p < 0,0001$ для SEQ ID NO: 4, 58, 158, 704 и 1022; и при дозе 0,3 мг/кг « $\wedge$ », $p < 0,0001$, для SEQ ID NO: 158; «**», $p < 0,005$ для SEQ ID NO: 4, 58, 704 и 1022. На Фигурах 13 и 14 представлены графики разложения лизо-Gb3 в тканях сердца и почек, соответственно. На фигуре 13, данные представлены как среднее $\pm$ SEM. Для сравнения результатов с результатами для SEQ ID NO: 2 проводили двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным критерием Даннета. На фигуре 14, данные представлены как среднее $\pm$ SEM. Для сравнения результатов с результатами для SEQ ID NO: 2 проводили двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным критерием Даннета; при дозе 0,1 мг/кг, «**», $p < 0,005$ для SEQ ID NO: 4, 58, 158; «*», $p < 0,05$ для SEQ ID NO: 704.

[0215] Несмотря на то, что настоящее изобретение было описано со ссылкой на конкретные варианты осуществления изобретения, в него могут быть внесены различные изменения и эквиваленты для адаптации к конкретной ситуации, материалу, составу вещества, способу, стадии или стадиям способа, и тем самым для достижения преимуществ изобретения, не выходя за рамки заявленного объема изобретения.

[0216] Для всех целей, в Соединенных Штатах Америки каждая публикация и каждый патентный документ, цитируемые в настоящей заявке, включены в настоящий документ посредством ссылки, так, как если бы каждая такая публикация или документ были конкретно и отдельно указаны для включения в настоящую заявку посредством ссылки. Ссылки на публикации и патентные документы не должны рассматриваться как указание на то, что любой такой документ относится к известному уровню техники, а также не указывает на то, что он имеет содержание, относящееся к известному уровню техники или имеет более раннюю дату публикации.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фрагмент рекомбинантной альфа-галактозидазы А и/или биологически активной рекомбинантной альфа-галактозидазы А, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 374, 704 и/или 1022.

2. Рекомбинантная альфа-галактозидаза А по п. 1, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 8 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 2, 4, 5, 24/59, 24/143/144, 24/143/202/333, 24/143/202/352/390/391, 24/143/333/352/387/390/391, 24/143/390/391, 24/202, 24/202/271, 24/202/333/352, 24/271/352, 24/352/387/390/391, 24/387/391, 31, 40, 59, 59/143, 59/143/202, 59/143/202/271/333, 59/143/271, 59/143/333, 59/202, 59/202/333, 59/271/387/390, 73, 76, 80, 83, 84, 91/215/361, 122, 123, 143, 143/202, 143/271, 143/271/352/390, 143/333, 143/333/387/390, 143/387/391, 147, 155, 164, 165, 179, 186, 202, 202/333, 210, 215/218, 218, 218/361, 218/361/398, 218/398, 246, 254/398, 271, 271/333, 271/333/390/391, 271/333/391, 271/352/391, 273, 275, 277, 278, 280, 281, 283, 284, 287, 300, 303, 304, 325, 331, 332, 333/352, 333/390/391, 333/391, 334, 335, 336, 338, 339, 340, 341, 343, 359, 360, 361, 362, 367, 369, 371, 373, 375, 377, 382, 382/398, 385, 387/391, 390 и 398, где положения аминокислот в указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 704.

3. Рекомбинантная альфа-галактозидаза А по п. 1, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 8 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 10, 39, 44, 47, 92, 166, 206, 217, 247, 261, 271, 302, 316, 322, 337, 368 и 392, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 374.

4. Рекомбинантная альфа-галактозидаза А по п. 1, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 58 или ее функциональному фрагменту, и где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей

мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из 10, 10/392, 31, 31/39/44/166/302, 31/47, 31/283/284, 39, 39/44, 39/44/47, 39/44/47/261/283/284, 39/44/283, 39/44/339, 39/47/261, 39/92, 39/206, 39/284, 44, 44/284/302, 84, 84/92, 84/284/302/392, 84/316, 84/368/392, 92, 92/206/217, 92/206/275, 92/206/284, 92/206/302/368, 92/271, 92/271/277, 92/275/284, 92/283, 92/283/392, 92/284, 92/302, 92/316, 92/368, 155, 155/217, 155/368, 166, 166/283/284, 166/302, 206, 206/217, 206/334, 261, 261/283, 271, 271/368, 275, 283, 283/284, 283/392, 284, 302, 316, 334, 339, 368, 368/392 и 392, где аминокислотные положения указанной полипептидной последовательности пронумерованы со ссылкой на SEQ ID NO: 1022.

5. Рекомбинантная альфа-галактозидаза А по п. 1, где указанная альфа-галактозидаза А содержит по меньшей мере одну мутацию по меньшей мере в одном положении, указанном в Таблицах 11.1, 12.1 и/или 13.1.

6. Рекомбинантная альфа-галактозидаза А по любому из пп. 1-5, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А происходит от альфа-галактозидазы А человека.

7. Рекомбинантная альфа-галактозидаза А, содержащая полипептидную последовательность SEQ ID NO: 374, 704 и/или 1022.

8. Рекомбинантная альфа-галактозидаза А по любому из пп. 1-7, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А является более термостабильной, чем альфа-галактозидаза А SEQ ID NO: 2, 374, 704 и/или 1022.

9. Рекомбинантная альфа-галактозидаза А по любому из пп. 1-8, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А является более стабильной при pH 7, чем альфа-галактозидаза А SEQ ID NO: 2, 374, 704 и/или 1022.

10. Рекомбинантная альфа-галактозидаза А по любому из пп. 1-9, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А является более стабильной при pH 4, чем альфа-галактозидаза А SEQ ID NO: 2, 374, 704 и/или 1022.

11. Рекомбинантная альфа-галактозидаза А по любому из пп. 1-10, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А является более устойчивой к воздействию сыворотки, чем альфа-галактозидаза А SEQ ID NO: 2, 374, 704 и/или 1022.

12. Рекомбинантная альфа-галактозидаза А по любому из пп. 1-11, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А является более стабильной в лизосомах, чем альфа-галактозидаза А SEQ ID NO: 2, 374, 704 и/или 1022.

13. Рекомбинантная альфа-галактозидаза А по любому из пп. 1-12, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А легче поглощается клетками, чем альфа-галактозидаза А SEQ ID NO: 2, 374, 704 и/или 1022.

14. Рекомбинантная альфа-галактозидаза А по любому из пп. 1-13, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А способствует большему выведению глоботриаозилцерамида из клеток, чем альфа-галактозидаза А SEQ ID NO: 2, 374, 704 и/или 1022.

15. Рекомбинантная альфа-галактозидаза А по любому из пп. 1-14, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А является очищенной.

16. Рекомбинантная альфа-галактозидаза А по любому из пп. 1-15, где указанная рекомбинантная альфа-галактозидаза А обладает по меньшей мере одним улучшенным свойством, выбранным из: i) повышенной каталитической активности; ii) повышенной толерантности к рН 7; iii) повышенной толерантности к рН 4; iv) повышенной толерантности к сыворотке; v) повышенного уровня поглощения клетками; vi) повышенного истощения глоботриаозилцерамида из клеток; vii) пониженной иммуногенности; или комбинации любого из i), ii), iii), iv), v), vi) и/или vii) по сравнению с эталонной последовательностью.

17. Рекомбинантная альфа-галактозидаза А по п. 16, где указанная эталонная последовательность выбрана из SEQ ID NO: 374, 704 и/или 1022.

18. Композиция, содержащая по меньшей мере одну рекомбинантную альфа-галактозидазу А по любому из пп. 1-17.

19. Рекомбинантная полинуклеотидная последовательность, кодирующая по меньшей мере одну рекомбинантную альфа-галактозидазу А по любому из пп. 1-18.

20. Рекомбинантная полинуклеотидная последовательность по п. 19, где указанная полинуклеотидная последовательность выбрана из ДНК, РНК и мРНК.

21. Рекомбинантная полинуклеотидная последовательность по п. 20, где указанная полинуклеотидная последовательность была оптимизирована по кодонам.

22. Экспрессионный вектор, содержащий рекомбинантную полинуклеотидную последовательность по пп. 19, 20 и/или 21.

23. Экспрессионный вектор по п. 22, где указанная рекомбинантная полинуклеотидная последовательность функционально связана с одной или более регуляторными последовательностями.

24. Экспрессионный вектор по п. 23, где указанная регуляторная последовательность представляет собой промотор.

25. Экспрессионный вектор по п. 24, где указанный промотор является гетерологичным промотором.

26. Клетка-хозяин, содержащая экспрессионный вектор по любому из пп. 22-25.

27. Клетка-хозяин по п. 26, где указанная клетка-хозяин выбрана из эукариот и прокариот.

28. Клетка-хозяин по п. 26 и/или 27, где указанная клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего.

29. Способ получения варианта альфа-галактозидазы А, включающий культивирование указанной клетки-хозяина по любому из пп. 26-28 в условиях, при которых продуцируется указанная альфа-галактозидаза А, кодируемая указанным рекомбинантным полинуклеотидом.

30. Способ по п. 29, дополнительно включающий стадию выделения указанной альфа-галактозидазы А.

31. Способ по п. 30, дополнительно включающий стадию очистки указанной альфа-галактозидазы А.

32. Фармацевтическая композиция для лечения болезни Фабри, содержащая композицию по п. 18.

33. Фармацевтическая композиция по п. 32, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент.

34. Фармацевтическая композиция по пп. 32 и/или 33, где указанная композиция является подходящей для парентеральной инъекции или инфузии человеку.

35. Фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантный полинуклеотид по любому из пп. 19-21.

36. Способ лечения и/или профилактики симптомов болезни Фабри у индивидуума, включающий определение наличия у индивидуума болезни Фабри и введение указанному индивидууму фармацевтической композиции по любому из пп. 32-35.

37. Способ по п. 36, где указанные симптомы болезни Фабри являются менее тяжелыми.

38. Способ по пп. 36 и/или 37, где указанный индивидуум может соблюдать диету с меньшим ограничением содержания жира, чем диета, необходимая индивидуумам с симптомами болезни Фабри.

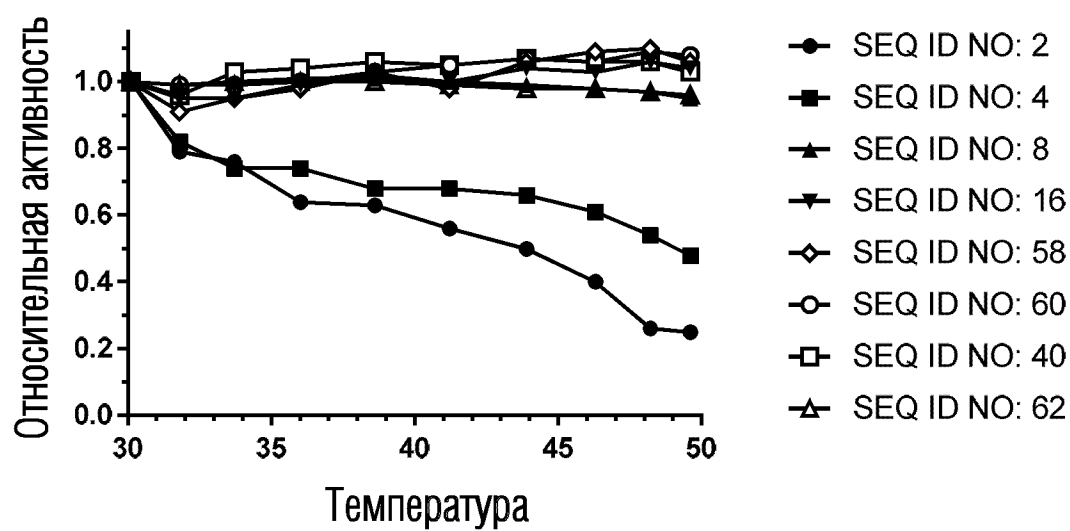
39. Способ по любому из пп. 36-38, где указанным индивидуумом является младенец или ребенок.

40. Способ по любому из пп. 36-39, где указанным индивидуумом является взрослый или молодой человек.

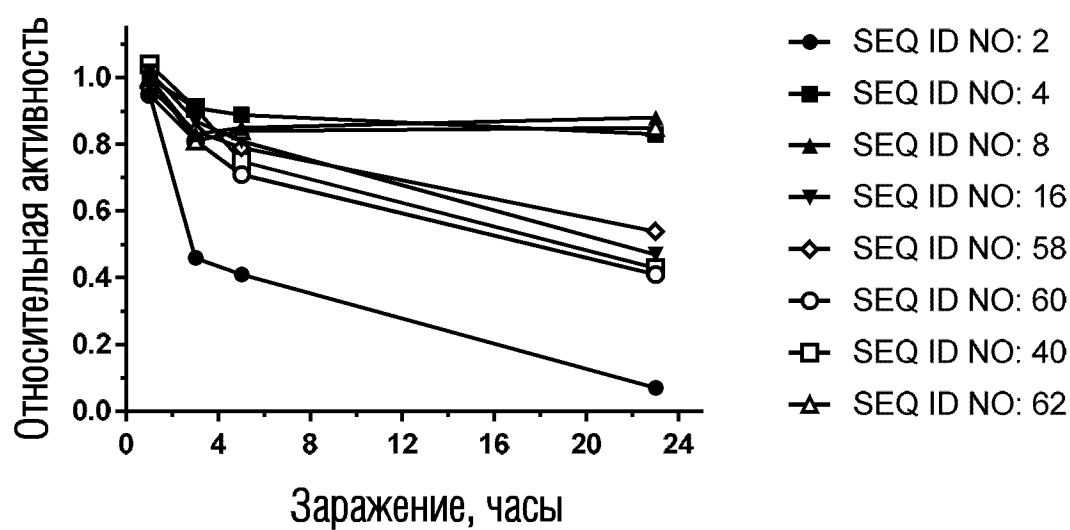
41. Применение композиций по любому из пп. 18 и 32-35.

По доверенности

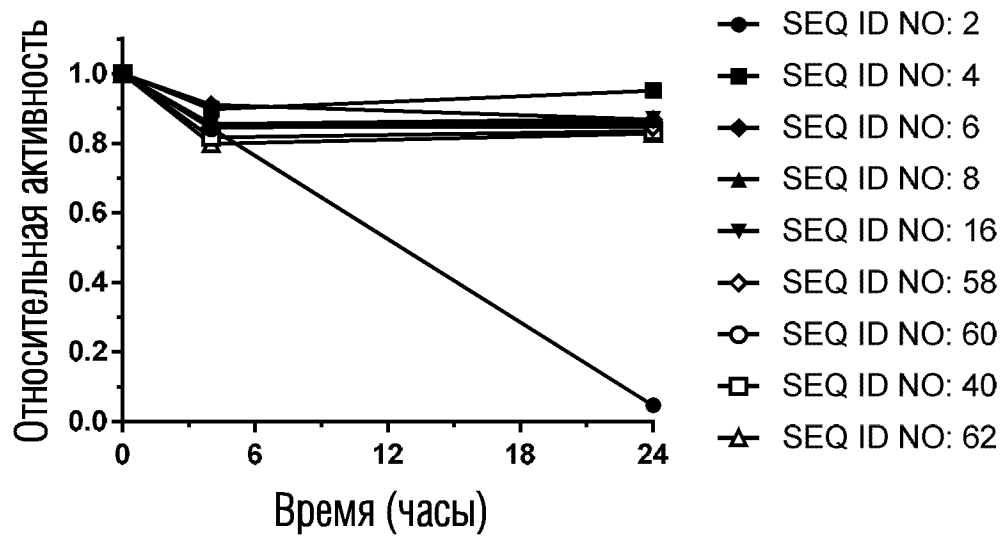
ФИГ. 1



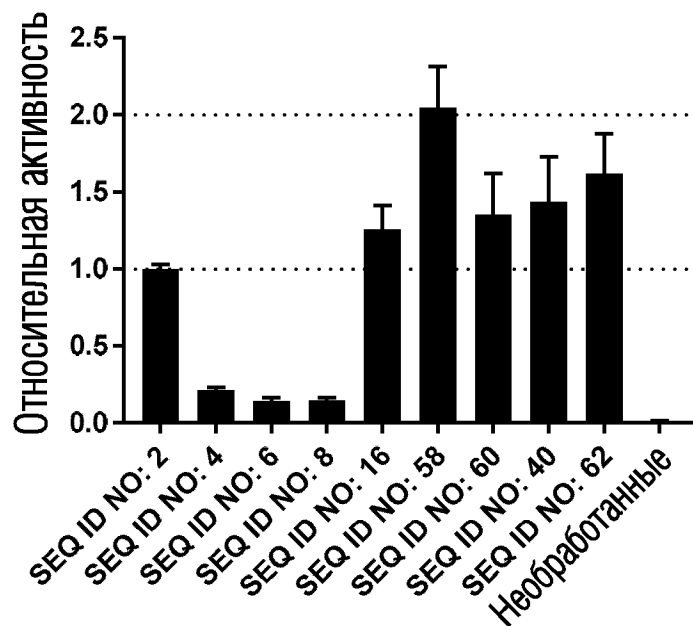
ФИГ. 2



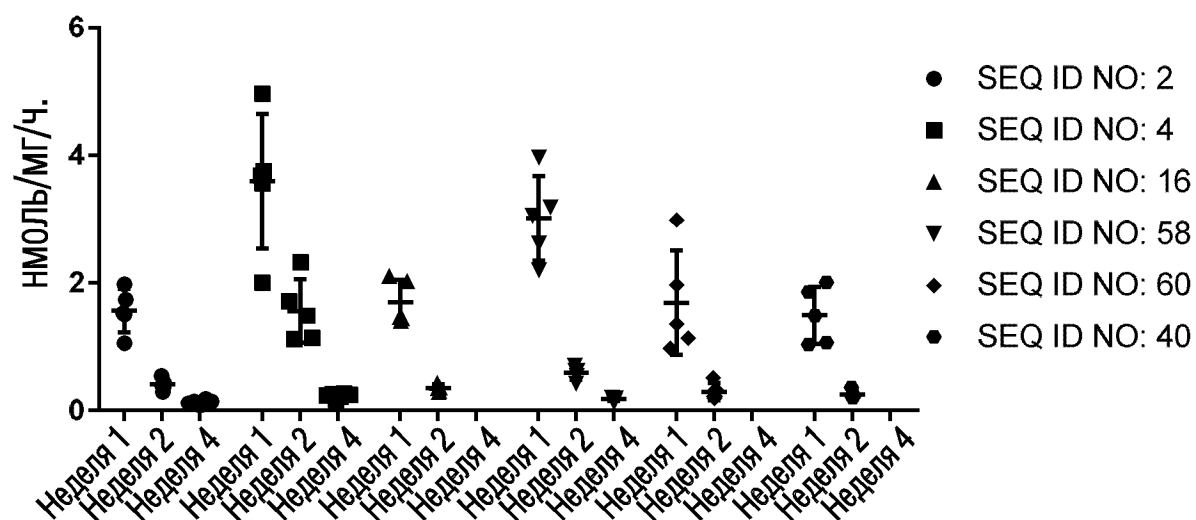
ФИГ. 3



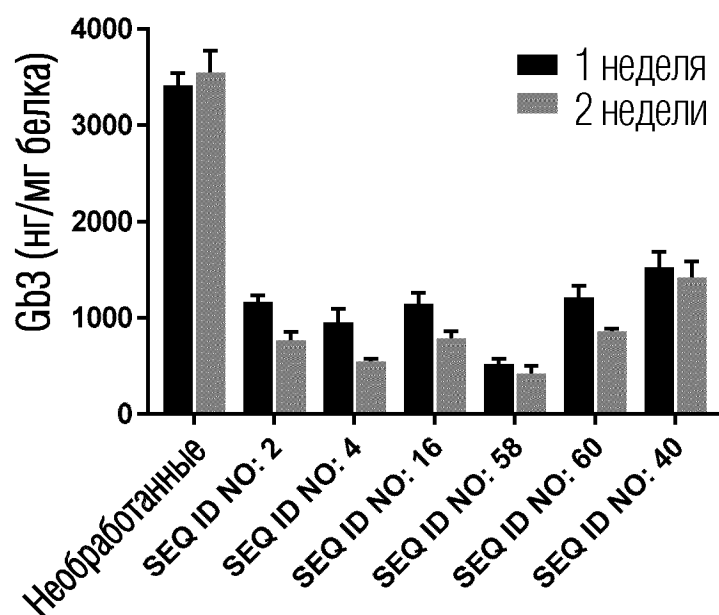
ФИГ. 4



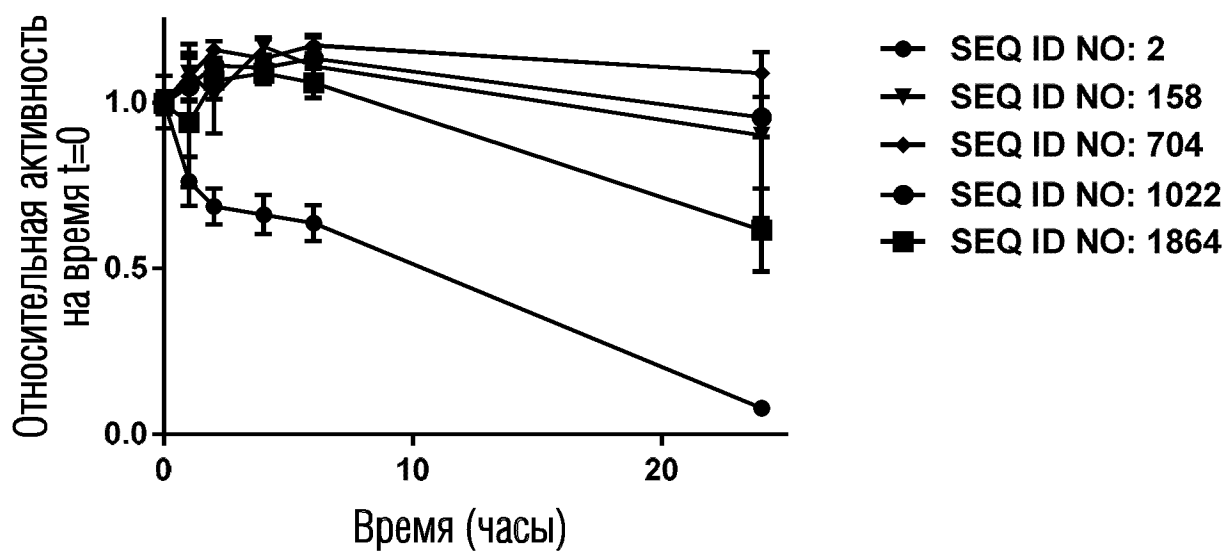
ФИГ. 5



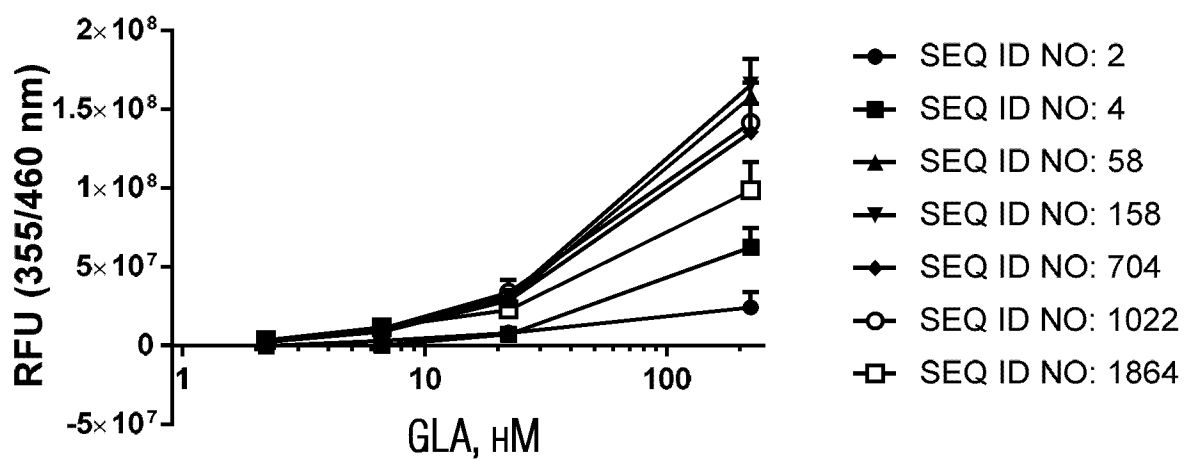
ФИГ. 6



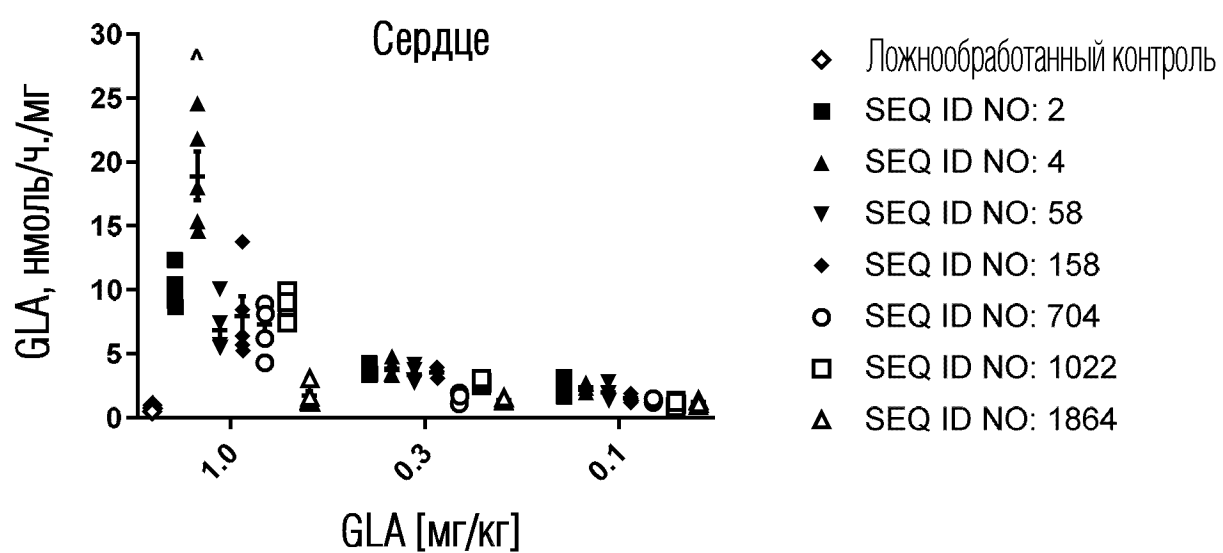
ФИГ. 7



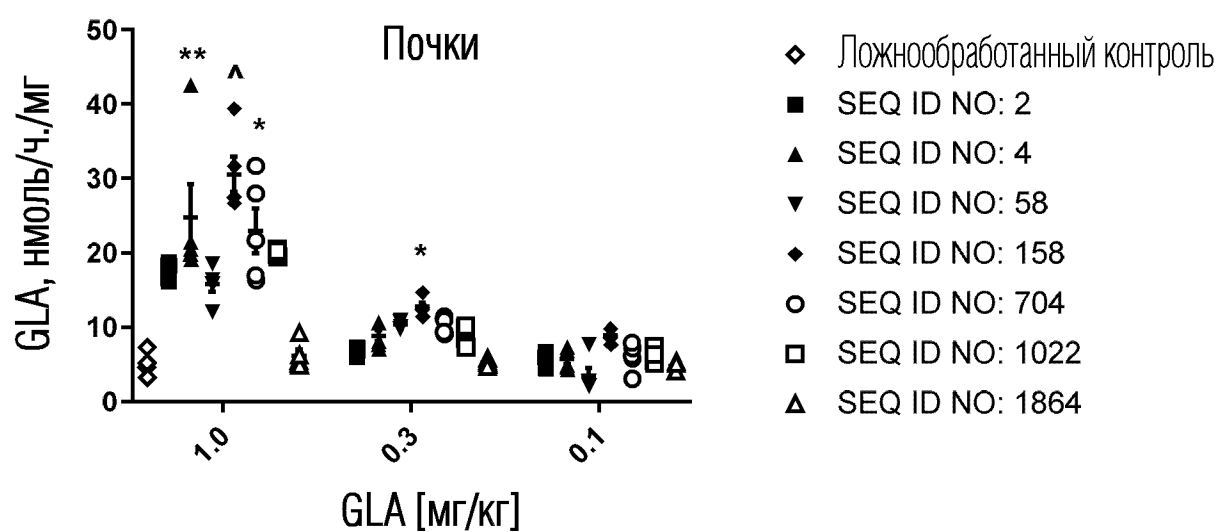
ФИГ. 8



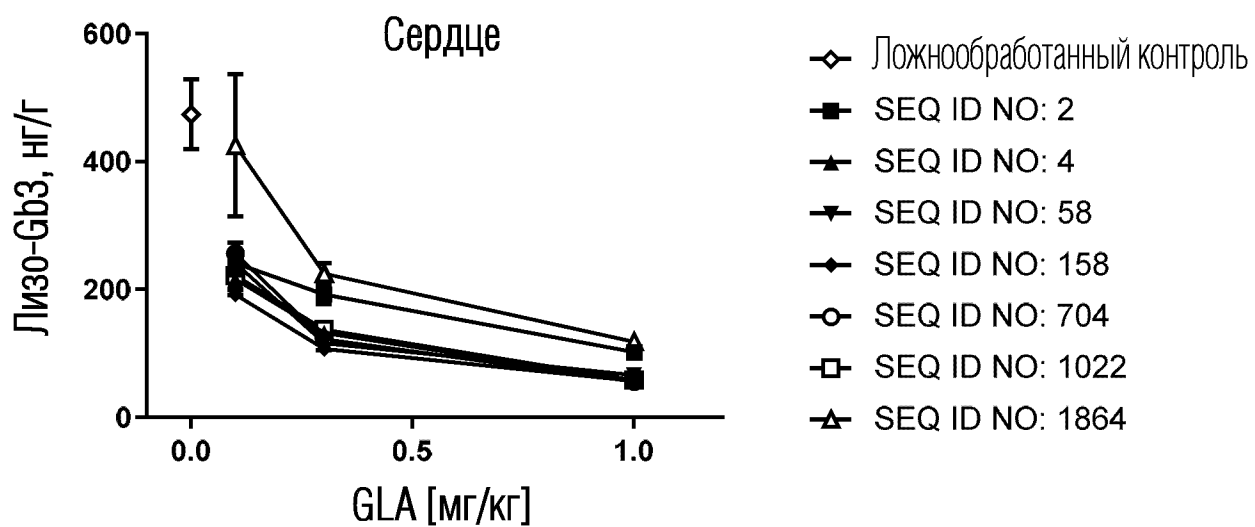
ФИГ. 9



ФИГ. 10



ФИГ. 13



ФИГ. 14

