



(51) МПК
C12N 15/52 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 15/52 (2023.08); *C12N 15/09* (2023.08); *C12N 15/11* (2023.08); *A61K 48/00* (2023.08); *A61P 25/28* (2023.08); *A61K 48/0016* (2023.08); *A61K 48/005* (2023.08); *A61K 48/0066* (2023.08); *C12N 2750/14143* (2023.08); *C12N 9/0071* (2023.08); *C12Y 114/16001* (2023.08)

(21)(22) Заявка: 2021129627, 13.03.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
13.03.2020

Дата регистрации:
22.02.2024

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
13.03.2019 US 62/817,771;
05.06.2019 US 62/857,514

(43) Дата публикации заявки: 13.04.2023 Бюл. № 11

(45) Опубликовано: 22.02.2024 Бюл. № 6

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 13.10.2021

(86) Заявка РСТ:
US 2020/022595 (13.03.2020)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2020/186150 (17.09.2020)

Адрес для переписки:
107045, Москва, Даев переулок, д. 20, ООО
"Иванов, Макаров и Партнеры"

(72) Автор(ы):

КЕРР, Дуглас Антони (US),
САМАЙОА, Филлип (US),
СИЛВЕР, Натаниел (US),
ЧИОККО, Мэттью (US)

(73) Патентообладатель(и):

ДЖЕНЕРЕЙШЕН БИО КО. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2018126112 A1, 05.07.2018. WO
2001068822 A2, 20.09.2001. WO 2019032898 A1,
14.02.2019. RU 2653444 C2, 08.05.2018. Eisensmith
R. C., Woo S. L. C. Gene therapy for
phenylketonuria //European journal of pediatrics,
1996, 155, p. S16-S19. Strisciuglio P., Concolino
D. New strategies for the treatment of
phenylketonuria (PKU) //Metabolites, 2014, (см.
прод.)

(54) НЕВИРУСНЫЕ ДНК-ВЕКТОРЫ И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ
ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ ФЕНИЛАЛАНИНГИДРОКСИЛАЗЫ (РАН)

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Описана группа изобретений, включающая бескапсидный вирусный вектор на основе ДНК с замкнутыми концами (зкДНК) для экспрессии белка фенилаланингидроксилазы (РАН), способ экспрессии белка РАН в клетке, включающий приведение клетки в контакт с вышеуказанным вектором, способ лечения

субъекта, страдающего фенилкетонурией (ФКУ), фармацевтическую композицию для генной терапии, клетку для продуцирования белка РАН, композицию для доставки зкДНК-вектора, набор для доставки зкДНК-вектора. Изобретение расширяет арсенал средств для экспрессии белка РАН. 7 н. и 52 з.п. ф-лы, 14 ил., 15 табл., 15 пр.

(56) (продолжение):
4(4), п. 1007-1017.

R U 2 8 1 4 1 3 7 C 2

R U 2 8 1 4 1 3 7 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 15/52 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12N 15/52 (2023.08); *C12N 15/09* (2023.08); *C12N 15/11* (2023.08); *A61K 48/00* (2023.08); *A61P 25/28* (2023.08); *A61K 48/0016* (2023.08); *A61K 48/005* (2023.08); *A61K 48/0066* (2023.08); *C12N 2750/14143* (2023.08); *C12N 9/0071* (2023.08); *C12Y 114/16001* (2023.08)

(21)(22) Application: **2021129627, 13.03.2020**

(24) Effective date for property rights:
13.03.2020

Registration date:
22.02.2024

Priority:

(30) Convention priority:
13.03.2019 US 62/817,771;
05.06.2019 US 62/857,514

(43) Application published: **13.04.2023** Bull. № 11

(45) Date of publication: **22.02.2024** Bull. № 6

(85) Commencement of national phase: **13.10.2021**

(86) PCT application:
US 2020/022595 (13.03.2020)

(87) PCT publication:
WO 2020/186150 (17.09.2020)

Mail address:
107045, Moskva, Daev pereulok, d. 20, OOO
"Ivanov, Makarov i Partnery"

(72) Inventor(s):

KERR, Douglas Antoni (US),
SAMAJOA, Phillip (US),
SILVER, Nataniel (US),
CHIOKKO, Mettyu (US)

(73) Proprietor(s):

DZHENEREJSHEN BIO KO. (US)

(54) **NON-VIRAL DNA VECTORS AND OPTIONS FOR THEIR USE FOR EXPRESSION OF THERAPEUTIC AGENT BASED ON PHENYLALANINE HYDROXYLASE (PAH)**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: following is described: a group of inventions including a capsid-free viral vector based on closed-ended DNA (ccDNA) for the expression of phenylalanine hydroxylase (PHA) protein, a method of expressing the PHA protein in a cell, including bringing the cell into contact with the above vector, a method of treating a subject suffering from phenylketonuria

(PKU), a pharmaceutical composition for gene therapy, a cell for producing RAS protein, a composition for delivering a cccDNA vector, a kit for delivering a cccDNA vector.

EFFECT: invention expands the range of agents for expressing PHA protein.

59 cl, 14 dwg, 15 tbl, 15 ex

C 2
7
1
4
1
3
7
2
8
1
4
1
3
7
C 2

R U
2
8
1
4
1
3
7
C 2

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке США № 62/817771, поданной 13 марта 2019 г., и предварительной заявке США № 62/857514, поданной 5 июня 2019 г., содержание каждой из которых полностью включено в данный документ посредством ссылки.

5 ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Настоящая заявка включает перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII, а также последовательности в Таблицах 1-15 в данном документе, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки. Указанная копия в формате ASCII, созданная 10 марта 2020 г.,
10 названа 131698-05720_SL.txt и имеет размер 116806 байтов.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Настоящее изобретение относится к области генной терапии, включая невирусные векторы для экспрессии трансгена или выделенных полинуклеотидов у субъекта или в клетке. Настоящее раскрытие также относится к конструкциям
15 нуклеиновых кислот, промоторам, векторам и клеткам-хозяевам, включающим полинуклеотиды, а также к способам доставки экзогенных последовательностей ДНК в целевую клетку, ткань, орган или организм. Например, настоящее раскрытие обеспечивает способы применения невирусных экДНК-векторов для экспрессии фенилаланингидроксилазы (ПАН) из клетки, например, экспрессии терапевтического
20 белка ПАН для лечения субъекта, страдающего фенилкетонурией (ФКУ). Способы и композиции можно применять, например, для лечения заболевания путем экспрессии ПАН в клетке или ткани субъекта, нуждающегося в этом.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Целью генной терапии является улучшение клинических исходов у пациентов,
25 страдающих либо генетическими мутациями, либо приобретенными заболеваниями, вызванными aberrацией в профиле экспрессии генов. Генная терапия включает лечение или предотвращение медицинских состояний, вызванных дефектными генами или аномальной регуляцией или экспрессией, например, недостаточной экспрессией или избыточной экспрессией, что может привести к нарушению, заболеванию,
30 злокачественному новообразованию и т. д. Например, заболевание или нарушение, вызванное дефектным геном, можно лечить, предотвращать или облегчать путем доставки пациенту корректирующего генетического материала, или можно лечить, предотвращать или облегчать путем изменения или подавления у пациента дефектного гена, например, с помощью корректирующего генетического материала, приводящего
35 к терапевтической экспрессии генетического материала в организме пациента.

[0005] Основой генной терапии является обеспечение транскрипционной кассеты с активным генным продуктом (иногда называемым трансгеном), например, который может приводить к положительному эффекту усиления функции, отрицательному эффекту потери функции или другому исходу. Такие исходы можно отнести к экспрессии
40 терапевтического белка, такого как антитело, функциональный фермент или слитый белок. Генную терапию также можно применять для лечения заболевания или злокачественного новообразования, вызванного другими факторами. Моногенные нарушения у человека можно лечить путем доставки нормального гена в клетки-мишени и его экспрессии в них. Доставку и экспрессию корректирующего гена в клетках-мишенях
45 пациента можно осуществлять с применением многочисленных способов, включая применение сконструированных вирусов и вирусных векторов для доставки генов. Среди многочисленных доступных векторов вирусного происхождения (например, рекомбинантный ретровирус, рекомбинантный лентивирус, рекомбинантный аденовирус

и т. п.) рекомбинантный аденоассоциированный вирус (рААВ) приобретает все большую популярность в генной терапии в качестве многоцелевого вектора.

[0006] Аденоассоциированные вирусы (ААВ) принадлежат к семейству Parvoviridae и, более конкретно, составляют род депендопарвовирусов. Векторы, происходящие из ААВ (т. е. рекомбинантные ААВ (рААВ) или ААВ-векторы), являются привлекательным способом доставки генетического материала, поскольку (i) они способны инфицировать (трансдуцировать) широкий спектр типов неделящихся и делящихся клеток, включая миоциты и нейроны; (ii) они лишены вирусных структурных генов, что уменьшает ответы клеток хозяина на вирусную инфекцию, например, опосредуемые интерфероном ответы; (iii) вирусы дикого типа считаются непатологичными у человека; (iv) в отличие от ААВ дикого типа, которые способны интегрироваться в геном клетки хозяина, дефектные по репликации ААВ-векторы лишены гена *rep* и обычно персистируют в виде эписом, что ограничивает риск инсерционного мутагенеза или генотоксичности; и (v) по сравнению с другими векторными системами ААВ-векторы обычно считаются относительно слабыми иммуногенами и, следовательно, не вызывают значительного иммунного ответа (см. ii), обеспечивая, таким образом, персистенцию векторной ДНК и, потенциально, долговременную экспрессию терапевтических трансгенов.

[0007] Однако применение частиц ААВ в качестве вектора для доставки генов имеет несколько серьезных недостатков. Одним из основных недостатков, ассоциированных с рААВ, является ограниченная емкость вирусной упаковки, составляющая примерно 4,5 тыс. п. о. гетерологичной ДНК (Dong et al., 1996; Athanasiopoulos et al., 2004; Lai et al., 2010), вследствие этого применение ААВ-векторов ограничено их способностью кодировать белки размером менее 150000 Да. Вторым недостатком является то, что в результате распространенности инфекции ААВ дикого типа среди населения кандидаты на генную терапию с использованием рААВ должны проходить скрининг на наличие нейтрализующих антител, устраняющих вектор из организма пациента. Третий недостаток связан с иммуногенностью капсида, которая препятствует повторному введению пациентам, которые не были отстранены от начального лечения. Иммунная система пациента может отвечать на вектор, который фактически выступает в роли «бустерной» прививки, стимулирующей выработку высоких титров антител к ААВ иммунной системой, которые исключают возможность лечения в будущем. В некоторых недавних сообщениях выражены опасения, касающиеся иммуногенности в ситуациях, подразумевающих применение высоких доз. Другой заметный недостаток заключается в относительно медленном начале ААВ-опосредуемой экспрессии генов, учитывая, что одноцепочечная ДНК ААВ должна быть преобразована в двухцепочечную ДНК до экспрессии гетерологичного гена.

[0008] Кроме того, обычные вирионы ААВ с капсидами получают путем введения плазмиды или плазмид, содержащих геном ААВ, гены *rep* и гены *cap* (Grimm et al., 1998). Однако было обнаружено, что такие вирусные векторы на основе заключенного в капсид ААВ неэффективно трансдуцируют определенные типы клеток и тканей, а капсиды также индуцируют иммунный ответ.

[0009] Соответственно, применение векторов на основе аденоассоциированного вируса (ААВ) для генной терапии ограничено из-за однократного введения пациентам (вследствие иммунного ответа пациента), ограниченного диапазона трансгенного генетического материала, подходящего для доставки в ААВ-векторах ввиду минимальной емкости вирусной упаковки (около 4,5 тыс. п. о.), и медленной ААВ-опосредуемой экспрессии генов.

[0010] Фенилкетонурия (ФКУ) представляет собой редкий наследственный

врожденный порок метаболизма, вызванный мутацией в гене PАН. Фенилкетонурия (ФКУ) представляет собой врожденный порок метаболизма, который приводит к снижению метаболизма аминокислоты фенилаланина (Phe). Без лечения ФКУ может привести к умственной отсталости, судорожным припадкам, поведенческим расстройствам и психическим нарушениям. Она также может привести к появлению затхлого запаха и осветлению кожи. Младенцы, рожденные от матерей, у которых лечение фенилкетонурии было неэффективным, могут иметь проблемы с сердцем, маленькую голову и небольшую массу при рождении. ФКУ возникает из-за мутаций в гене PАН, что приводит к низким уровням фермента фенилаланингидроксилазы (PАН), т. е. субъекты, страдающие ФКУ, имеют мутации в PАН, которые приводят к дефициту его ферментативной активности. ФКУ является аутосомно-рецессивной, это означает, что для развития состояния должны быть мутированы обе копии гена. Существует два основных типа, классическая ФКУ и вариант ФКУ, в зависимости от того, сохраняется ли какая-либо ферментативная функция. Те, у кого имеется одна копия мутированного гена PАН, как правило, не имеют симптомов.

[0011] PАН представляет собой фермент, который обычно экспрессируется в печени и необходим для метаболизма поступающего с пищей фенилаланина в тирозин, аминокислоту, отвечающую за продукцию нейротрансмиттеров. PАН катализирует гидроксилирование фенилаланина до тирозина. Дефектный фермент PАН приводит к накоплению поступающего с пищей фенилаланина до потенциально токсичных уровней.

[0012] ФКУ может быть вызвана дефектом одного гена фермента фенилаланингидроксилазы (PАН), что приводит к повышению уровня Phe в сыворотке. У позвоночных PАН превращает Phe в тирозин. В отсутствие PАН единственными другими механизмами удаления Phe являются синтез белка и второстепенный путь разрушения, включающий дезаминирование и окислительное декарбоксилирование боковой цепи аланина с образованием характерного фениллактата и фенилацетата, наблюдаемых в моче пациентов, страдающих ФКУ. К сожалению, типичный рацион содержит больше Phe, чем может быть выведено в отсутствие PАН. В результате накопление Phe у пациентов, страдающих ФКУ, приводит к ряду симптомов, включая аномальное развитие мозга и тяжелую умственную отсталость. (Kaufman, Proc Nat'l Acad Sci USA 96: 3160-3164, 1999).

[0013] Современный стандарт лечения представляет собой строго ограничительную диету (ограничение фенилаланина (Phe)), но она не всегда эффективна, поскольку такое диетическое ограничение трудно поддерживать и оно не корректирует основной дефект. Современная терапия ФКУ заключается в соблюдении диеты с низким количеством пищевых продуктов, содержащих фенилаланин, и приеме специальных добавок. Строгая диета должна начинаться как можно раньше после рождения и должна продолжаться по меньшей мере 10 лет, если не всю жизнь. У некоторых пациентов, страдающих ФКУ, можно применять лекарственное средство дигидрохлорид сапроптерина. Без лечения ФКУ может привести к прогрессирующим и тяжелым неврологическим нарушениям. По оценкам от ФКУ страдают приблизительно 15000 человек в США, и отсутствуют доступные способы лечения генетического дефекта при ФКУ.

[0014] Несмотря на огромные успехи в изучении биохимии, молекулярной биологии и генетики ФКУ, в разработке новых способов лечения этого нарушения был достигнут незначительный прогресс. Существует большая неудовлетворенная потребность в модифицирующих заболевании видах терапии при ФКУ. Во-первых, современные виды терапии не модифицируют заболевание и эффективны только у подгруппы пациентов и по-прежнему требуют строгих диетических ограничений, а их несоблюдение может

привести к повреждению нейронов. Во-вторых, отсутствуют одобренные виды генной терапии ФКУ, а виды терапии на основе ААВ не могут применяться у 25%-40% пациентов из-за уже существующих антител. ААВ может быть введен только один раз, и полученные уровни РАН могут быть недостаточно высокими, чтобы быть эффективными, или могут превышать нормальные, уровни доз не поддаются титрованию.

[0015] Соответственно, в данной области существует потребность в технологии, которая обеспечивает экспрессию терапевтического белка РАН в клетке, ткани или в организме субъекта для лечения ФКУ.

10 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

[0016] Технология, описанная в данном документе, относится к способам и композициям для лечения фенилкетонурии (ФКУ) путем экспрессии фермента фенилаланингидроксилазы (РАН) с бескапсидного (например, невирусного) ДНК-вектора с ковалентно замкнутыми концами (называемого в данном документе «ДНК-вектор с замкнутыми концами» или «зкДНК-вектор»), причем указанный зкДНК-вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты РАН или ее варианты, оптимизированные по кодонам. Эти зкДНК-векторы можно применять для получения белков РАН для лечения, мониторинга и диагностики. Применение зкДНК-векторов, экспрессирующих РАН, у субъекта для лечения ФКУ можно применять для: (i) обеспечения модифицирующих заболевание уровней фермента РАН, (ii) минимально инвазивной доставки, (iii) повторяемости и дозирования до достижения эффекта, (iv) быстрого начала терапевтического эффекта, (v) устойчивой экспрессии корректирующего фермента РАН в печени, (vi) восстановления функции цикла мочевины, метаболизма фенилаланина, и/или (vii) титрования для достижения соответствующих фармакологических уровней дефектного фермента.

[0017] Соответственно, настоящее изобретение, описанное в данном документе, относится к бескапсидному (например, невирусному) ДНК-вектору с ковалентно замкнутыми концами (называемому в данном документе «ДНК-вектор с замкнутыми концами» или «зкДНК-вектор»), содержащему гетерогенный ген, кодирующий РАН, чтобы обеспечить экспрессию терапевтического белка РАН в клетке.

[0018] Согласно одному аспекту в данном документе раскрыт вектор на основе ДНК с замкнутыми концами (зкДНК), содержащий по меньшей мере одну гетерологичную нуклеотидную последовательность между фланкирующими инвертированными концевыми повторами (ITR), причем по меньшей мере одна гетерологичная нуклеотидная последовательность кодирует по меньшей мере один белок РАН, при этом указанная по меньшей мере одна гетерологичная нуклеотидная последовательность, которая кодирует по меньшей мере один белок РАН, выбрана из последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности с любой из последовательностей в Таблице 1. Согласно одному варианту реализации зкДНК-вектор представляет собой бескапсидный вектор. Согласно одному варианту реализации последовательности в Таблице 1 выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 380, SEQ ID NO: 381, SEQ ID NO: 382, SEQ ID NO: 383, SEQ ID NO: 384, SEQ ID NO: 385, SEQ ID NO: 386, SEQ ID NO: 387, SEQ ID NO: 388, SEQ ID NO: 389, SEQ ID NO: 390, SEQ ID NO: 391, SEQ ID NO: 392, SEQ ID NO: 393 и SEQ ID NO: 394.

[0019] Согласно одному варианту реализации гетерологичная нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 392. Согласно одному варианту реализации гетерологичная нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 84. Согласно одному варианту реализации гетерологичная нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 394.

5 [0020] зкДНК-векторы для экспрессии продукции белка РАН, описанные в данном документе, представляют собой бескапсидные линейные дуплексные молекулы ДНК, образованные из непрерывной цепи комплементарной ДНК с ковалентно замкнутыми концами (линейная, непрерывная и неинкапсидированная структура), которые содержат последовательность 5' инвертированного концевого повтора (ITR) и последовательность 10 3'-ITR, причем указанные 5'-ITR и 3'-ITR могут иметь одинаковую симметричную трехмерную организацию по отношению друг к другу (т. е. симметричную или по существу симметричную) или, альтернативно, 5'-ITR и 3'-ITR могут иметь различную трехмерную организацию по отношению друг к другу (т. е. асимметричные ITR). Кроме того, ITR могут происходить из одного и того же или разных серотипов. Согласно 15 некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор может содержать последовательности ITR, которые имеют симметричную трехмерную пространственную организацию так, что их структура имеет одинаковую форму в геометрическом пространстве, или имеют одинаковые петли А, С-С' и В-В' в трехмерном пространстве (т. е. они одинаковы или являются зеркальными отображениями по отношению друг к другу). Согласно 20 некоторым вариантам реализации один ITR может происходить из одного серотипа ААВ, а другой ITR может происходить из другого серотипа ААВ.

[0021] Соответственно, некоторые аспекты технологии, описанной в данном документе, относятся к зкДНК-вектору для улучшенной экспрессии и/или продукции белка описанного выше белка РАН, который содержит последовательности ITR, 25 фланкирующие гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую любую последовательность нуклеиновой кислоты РАН, раскрытую в Таблицах 5, при этом указанные последовательности ITR выбраны из любых из: (i) по меньшей мере одного ITR дикого типа (WT) и по меньшей мере одного модифицированного инвертированного концевого повтора (mod-ITR) ААВ (например, асимметричных 30 модифицированных ITR); (ii) двух модифицированных ITR, причем пара mod-ITR имеет различную трехмерную пространственную организацию по отношению друг к другу (например, асимметричные модифицированные ITR), или (iii) пары симметричных или по существу симметричных WT-WT ITR, причем каждый WT-ITR имеет одинаковую трехмерную пространственную организацию, или (iv) пары симметричных или по 35 существу симметричных модифицированных ITR, причем каждый mod-ITR имеет одинаковую трехмерную пространственную организацию. ЗкДНК-векторы, раскрытые в данном документе, могут быть получены в эукариотических клетках и поэтому лишены прокариотических модификаций ДНК и загрязнения бактериальными эндотоксинами в клетках насекомых.

40 [0022] Способы и композиции, описанные в данном документе, частично относятся к открытию невирусного бескапсидного ДНК-вектора с ковалентно замкнутыми концами (зкДНК-векторы), который можно применять для экспрессии по меньшей мере одного белка РАН или более чем одного белка РАН из клетки, включая, но не ограничиваясь ими, клетки печени.

45 [00023] Соответственно, в данном документе в одном аспекте предложены ДНК-векторы (например, зкДНК-векторы), содержащие по меньшей мере одну гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один трансген, кодирующий белки РАН, функционально связанный с промотором,

расположенную между двумя различными последовательностями инвертированных концевых повторов (ITR) AAB, причем один из ITR содержит функциональный сайт концевого разрешения AAB и сайт связывания Rep, а один из ITR содержит делецию, вставку или замену относительно другого ITR; при этом указанный трансген кодирует белок РАН; и при этом указанная ДНК при расщеплении рестрикционным ферментом, имеющим один сайт распознавания на ДНК-векторе, отличается наличием характерных полос линейной и непрерывной ДНК по сравнению с контрольными линейными и прерывистыми ДНК при анализе на неденатурирующем геле. Другие аспекты включают доставку белка РАН путем его экспрессии *in vivo* с зкДНК-вектора, описанного в данном документе, и, кроме того, лечение фенилкетонурии (ФКУ) с применением зкДНК-векторов, кодирующих РАН. В данном документе также предусмотрены клетки, содержащие зкДНК-вектор, кодирующий РАН, описанный в данном документе. В соответствии с некоторыми вариантами реализации зкДНК-вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая на 85% идентична SEQ ID NO: 192. В соответствии с некоторыми вариантами реализации зкДНК-вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая на 90% идентична SEQ ID NO: 192. В соответствии с некоторыми вариантами реализации зкДНК-вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая на 95% идентична SEQ ID NO: 192. В соответствии с некоторыми вариантами реализации зкДНК-вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая на 96% идентична SEQ ID NO: 192. В соответствии с некоторыми вариантами реализации зкДНК-вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая на 97% идентична SEQ ID NO: 192. В соответствии с некоторыми вариантами реализации зкДНК-вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая на 98% идентична SEQ ID NO: 192. В соответствии с некоторыми вариантами реализации зкДНК-вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая на 99% идентична SEQ ID NO: 192. В соответствии с некоторыми вариантами реализации зкДНК-вектор состоит из SEQ ID NO: 192. В соответствии с некоторыми вариантами реализации зкДНК-вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая на 85% идентична SEQ ID NO: 194. В соответствии с некоторыми вариантами реализации зкДНК-вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая на 90% идентична SEQ ID NO: 194. В соответствии с некоторыми вариантами реализации зкДНК-вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая на 95% идентична SEQ ID NO: 194. В соответствии с некоторыми вариантами реализации зкДНК-вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая на 96% идентична SEQ ID NO: 194. В соответствии с некоторыми вариантами реализации зкДНК-вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая на 97% идентична SEQ ID NO: 194. В соответствии с некоторыми вариантами реализации зкДНК-вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая на 98% идентична SEQ ID NO: 194. В соответствии с некоторыми вариантами реализации зкДНК-вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая на 99% идентична SEQ ID NO: 194. В соответствии с некоторыми вариантами реализации зкДНК-вектор состоит из SEQ ID NO: 194.

[0024] Аспекты настоящего изобретения относятся к способам получения зкДНК-векторов, которые можно применять для экспрессии белка РАН в клетке, как описано в данном документе. Другие варианты реализации относятся к зкДНК-вектору, полученному с помощью способа, предложенного в данном документе. Согласно одному варианту реализации бескапсидный (например, невирусный) ДНК-вектор

(зкДНК-вектор) для продукции белка РАН получают из плазмиды (называемой в данном документе «зкДНК-плазмидой»), содержащей полинуклеотидную матрицу экспрессионной конструкции, содержащую в указанном порядке: первый 5'-инвертированный концевой повтор (например, ITR ААВ); гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты; и 3'-ITR (например, ITR ААВ), причем указанные 5'-ITR и 3'-ITR могут быть асимметричными по отношению друг к другу или симметричными (например, WT-ITR или модифицированные симметричные ITR), как определено в данном документе.

[0025] зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, может быть получен с помощью ряда средств, которые будут известны обычному квалифицированному специалисту после прочтения этого раскрытия. Например, полинуклеотидная матрица экспрессионной конструкции, используемая для получения зкДНК-векторов согласно настоящему изобретению, может представлять собой зкДНК-плазмиду, зкДНК-бакмиду и/или зкДНК-бакуловирус. Согласно одному варианту реализации зкДНК-плазида содержит сайт рестрикционного клонирования (например, SEQ ID NO: 123 и/или 124), функционально расположенный между ITR, в который может быть вставлена экспрессионная кассета, содержащая, например, промотор, функционально связанный с трансеном, например, нуклеиновой кислотой, кодирующей РАН. Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-векторы для экспрессии белка РАН получают из полинуклеотидной матрицы (например, зкДНК-плазмиды, зкДНК-бакмиды, зкДНК-бакуловируса), содержащей симметричные или асимметричные ITR (модифицированные ITR или WT ITR).

[0026] В пермиссивной клетке-хозяине, в присутствии, например, Rep, полинуклеотидная матрица, имеющая по меньшей мере два ITR, реплицируется с получением зкДНК-векторов, экспрессирующих белок РАН. Получение зкДНК-вектора проходит в два этапа: во-первых, вырезание («извлечение») матрицы из остова матрицы (например, генома зкДНК-плазмиды, зкДНК-бакмиды, зкДНК-бакуловируса и т. д.) посредством белков Rep, и, во-вторых, Rep-опосредуемая репликация вырезанного зкДНК-вектора. Белки Rep и сайты связывания Rep различных серотипов ААВ хорошо известны обычным специалистам в данной области техники. Обычный специалист понимает необходимость выбора белка Rep из серотипа, который связывается с последовательностью нуклеиновой кислоты и реплицирует ее, на основе по меньшей мере одного функционального ITR. Например, если компетентный по репликации ITR происходит из серотипа 2 ААВ, соответствующий Rep будет из серотипа ААВ, который работает с этим серотипом, такого как ITR ААВ2 с Rep ААВ2 или ААВ4, но не Rep ААВ5, который не работает. После репликации зкДНК-вектор с ковалентно замкнутыми концами продолжает накапливаться в пермиссивных клетках, и зкДНК-вектор предпочтительно является достаточно стабильным с течением времени в присутствии белка Rep в стандартных условиях репликации, например, для накопления в количестве, составляющем по меньшей мере 1 пг/клетку, предпочтительно по меньшей мере 2 пг/клетку, предпочтительно по меньшей мере 3 пг/клетку, более предпочтительно по меньшей мере 4 пг/клетку, еще более предпочтительно по меньшей мере 5 пг/клетку.

[0027] Соответственно, один аспект настоящего изобретения относится к способу получения зкДНК-вектора для экспрессии таких белков РАН, включающему этапы: а) инкубации популяции клеток-хозяев (например, клеток насекомых), несущих полинуклеотидную матрицу экспрессионной конструкции (например, зкДНК-плазмиду, зкДНК-бакмиду и/или зкДНК-бакуловирус), лишенную последовательностей, кодирующих вирусный капсид, в присутствии белка Rep в условиях, эффективных для

индукции продуцирования указанного зкДНК-вектора в клетках-хозяевах и в течение периода времени, достаточного для этого, при этом указанные клетки-хозяева не содержат последовательностей, кодирующих вирусный капсид; и b) сбора и выделения зкДНК-вектора из клеток-хозяев. Присутствие белка Rep индуцирует репликацию векторного полинуклеотида с модифицированным ITR с получением зкДНК-вектора для экспрессии белка РАН в клетке-хозяине. Однако вирусные частицы (например, вирионы ААВ) не экспрессируются. Таким образом, отсутствует ограничение по размеру, налагаемое вирионами.

[0028] Наличие пригодного для экспрессии белка РАН зкДНК-вектора, выделенного из клеток-хозяев, можно подтвердить путем расщепления ДНК, выделенной из клетки-хозяина, рестрикционным ферментом, имеющим один сайт распознавания на зкДНК-векторе, и анализа расщепленного ДНК-материала на денатурирующем и неденатурирующем гелях для подтверждения наличия характерных полос линейной и непрерывной ДНК по сравнению с линейной и прерывистой ДНК.

[0029] В данном документе также предложены способы экспрессии белка РАН, который имеет терапевтическое применение, с применением зкДНК-вектора в клетке или у субъекта. Такие белки РАН можно применять для лечения фенилкетонурии (ФКУ). Соответственно, в данном документе предложены способы лечения фенилкетонурии (ФКУ), включающие введение зкДНК-вектора, кодирующего терапевтический белок РАН, субъекту, нуждающемуся в этом. В соответствии с некоторыми вариантами реализации у субъекта наблюдается по меньшей мере примерно 50% снижение уровня фенилаланина в сыворотке по сравнению с уровнем фенилаланина в сыворотке у субъекта до введения. В соответствии с некоторыми вариантами реализации у субъекта наблюдается по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 55%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 65%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 75%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90% или по меньшей мере примерно 95% снижение уровня фенилаланина в сыворотке. В соответствии с некоторыми вариантами реализации после введения уровень фенилаланина в сыворотке у субъекта составляет менее примерно 1500 мкМ. В соответствии с некоторыми вариантами реализации после введения уровень фенилаланина в сыворотке у субъекта составляет менее 1500, менее 1250, менее 1000, менее 750, менее 500, менее 400, менее 300, менее 250, менее 200, менее 100, менее 50 мМ. В соответствии с некоторыми вариантами реализации после введения у субъекта наблюдается повышение активности РАН по меньшей мере примерно на 10% по сравнению с уровнем активности РАН до введения. В соответствии с некоторыми вариантами реализации после введения у субъекта наблюдается повышение активности РАН по меньшей мере примерно на 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% или 55% по сравнению с уровнем активности РАН до введения.

[0030] Согласно некоторым вариантам реализации один аспект технологии, описанной в данном документе, относится к невирусному бескапсидному ДНК-вектору с ковалентно замкнутыми концами (зкДНК-вектору), причем указанный зкДНК-вектор содержит по меньшей мере одну гетерологичную нуклеотидную последовательность, функционально расположенную между двумя последовательностями инвертированных концевых повторов, при этом указанные последовательности ITR могут быть асимметричными или симметричными, или по существу симметричными, в соответствии с определением этих терминов в данном документе, при этом по меньшей мере один из ITR содержит функциональный сайт концевой разрешения и сайт связывания Rep,

и необязательно указанная гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты кодирует трансген (например, белок РАН), и при этом указанный вектор не находится в вирусном капсиде.

[0031] Эти и другие аспекты настоящего изобретения более подробно описаны ниже.

ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0032] Варианты реализации настоящего раскрытия, кратко обобщенные выше и более подробно обсуждаемые ниже, будут понятны со ссылкой на иллюстративные варианты реализации раскрытия, представленные на прилагаемых чертежах. Однако прилагаемые чертежи иллюстрируют только типичные варианты реализации настоящего раскрытия и поэтому не должны рассматриваться, как ограничивающие объем, поскольку раскрытие может допускать другие равно эффективные варианты реализации.

[0033] ФИГ. 1А иллюстрирует примерную структуру зкДНК-вектора для экспрессии белка РАН, раскрытого в данном документе, содержащего асимметричные ITR. Согласно этому варианту реализации примерный зкДНК-вектор содержит экспрессионную кассету, содержащую промотор СAG, WPRE и ВGHpA. Открытая рамка считывания (ORF), кодирующая трансген РАН, может быть вставлена в сайт клонирования (R3/R4) между промотором СAG и WPRE. Экспрессионная кассета фланкирована двумя инвертированными концевыми повторами (ITR) - ITR дикого типа ААВ2 слева (на 5'-конце) и модифицированным ITR справа (на 3'-конце) от экспрессионной кассеты, поэтому два ITR, фланкирующие экспрессионную кассету, асимметричны по отношению друг к другу.

[0034] ФИГ. 1В иллюстрирует примерную структуру зкДНК-вектора для экспрессии РАН, раскрытого в данном документе, содержащего асимметричные ITR с экспрессионной кассетой, содержащей промотор СAG, WPRE и ВGHpA. Открытая рамка считывания (ORF), кодирующая трансген РАН, может быть вставлена в сайт клонирования между промотором СAG и WPRE. Экспрессионная кассета фланкирована двумя инвертированными концевыми повторами (ITR) - модифицированным ITR слева (на 5'-конце) и ITR дикого типа справа (на 3'-конце) от экспрессионной кассеты.

[0035] ФИГ. 1С иллюстрирует примерную структуру зкДНК-вектора для экспрессии РАН, раскрытого в данном документе, содержащего асимметричные ITR, с экспрессионной кассетой, содержащей энхансер/промотор, трансген РАН, посттранскрипционный элемент (WPRE) и сигнал поли(А). Открытая рамка считывания (ORF) позволяет встраивать трансген РАН в сайт клонирования между промотором СAG и WPRE. Экспрессионная кассета фланкирована двумя инвертированными концевыми повторами (ITR), которые асимметричны по отношению друг к другу; модифицированный ITR слева (на 5'-конце) и модифицированный ITR справа (на 3'-конце) от экспрессионной кассеты, причем указанные 5'-ITR и 3'-ITR оба представляют собой модифицированные ITR, но имеют разные модификации (т. е. они не имеют одинаковых модификаций).

[0036] ФИГ. 1D иллюстрирует примерную структуру зкДНК-вектора для экспрессии РАН, раскрытого в данном документе, содержащего симметричные модифицированные ITR или по существу симметричные модифицированные ITR, как определено в данном документе, с экспрессионной кассетой, содержащей промотор СAG, WPRE и ВGHpA. Открытая рамка считывания (ORF), кодирующая трансген РАН, вставлена в сайт клонирования между промотором СAG и WPRE. Экспрессионная кассета фланкирована двумя модифицированными инвертированными концевыми повторами (ITR), причем указанные 5' модифицированный ITR и 3' модифицированный ITR симметричны или по существу симметричны.

[0037] ФИГ. 1Е иллюстрирует примерную структуру зкДНК-вектора для экспрессии РАН, раскрытого в данном документе, содержащего симметричные модифицированные ITR или по существу симметричные модифицированные ITR, как определено в данном документе, с экспрессионной кассетой, содержащей энхансер/промотор, трансген, посттранскрипционный элемент (WPRE) и сигнал поли(А). Открытая рамка считывания (ORF) позволяет вставить трансген (например, РАН) в сайт клонирования между промотором СAG и WPRE. Экспрессионная кассета фланкирована двумя модифицированными инвертированными концевыми повторами (ITR), причем указанные 5′ модифицированный ITR и 3′ модифицированный ITR симметричны или по существу симметричны.

[0038] ФИГ. 1F иллюстрирует примерную структуру зкДНК-вектора для экспрессии РАН, раскрытого в данном документе, содержащего симметричные WT-ITR или по существу симметричные WT-ITR, как определено в данном документе, с экспрессионной кассетой, содержащей промотор СAG, WPRE и ВGHpA. Открытая рамка считывания (ORF), кодирующая трансген (например, РАН), вставлена в сайт клонирования между промотором СAG и WPRE. Экспрессионная кассета фланкирована двумя инвертированными концевыми повторами дикого типа (WT-ITR), причем указанные 5′ WT-ITR и 3′ WT-ITR являются симметричными или по существу симметричными.

[0039] ФИГ. 1G иллюстрирует примерную структуру зкДНК-вектора для экспрессии РАН, раскрытого в данном документе, содержащего симметричные модифицированные ITR или по существу симметричные модифицированные ITR, как определено в данном документе, с экспрессионной кассетой, содержащей энхансер/промотор, трансген (например, РАН), посттранскрипционный элемент (WPRE) и сигнал поли(А). Открытая рамка считывания (ORF) позволяет вставить трансген (например, РАН) в сайт клонирования между промотором СAG и WPRE. Экспрессионная кассета фланкирована двумя инвертированными концевыми повторами дикого типа (WT-ITR), причем указанные 5′ WT-ITR и 3′ WT-ITR являются симметричными или по существу симметричными.

[0040] ФИГ. 2А представляет Т-образную структуру стебель-петля левого ITR дикого типа ААВ2 (SEQ ID NO: 52) с идентификацией плеча А-А′, плеча В-В′, плеча С-С′, двух сайтов связывания Rep (RBE и RBE′), а также показывает сайт концевое разрешение (TRS). RBE содержит группу из 4 дуплексных тетрамеров, которые, как полагают, взаимодействуют либо с Rep 78, либо с Rep 68. Кроме того, также полагают, что RBE′ взаимодействует с комплексом Rep, собранным на ITR дикого типа или мутированном ITR в конструкции. Области D и D′ содержат сайты связывания факторов транскрипции и другую консервативную структуру. ФИГ. 2В показывает предполагаемую Rep-катализируемую никирующую и лигирующую активность в левом ITR дикого типа (SEQ ID NO: 53), включая Т-образную структуру стебель-петля левого ITR дикого типа ААВ2 с идентификацией плеча А-А′, плеча В-В′, плеча С-С′, двух сайтов связывания Rep (RBE и RBE′), а также показывает сайт концевое разрешение (TRS) и область D и D′, содержащую несколько сайтов связывания факторов транскрипции и другую консервативную структуру.

[0041] ФИГ. 3А представляет первичную структуру (полинуклеотидную последовательность) (слева) и вторичную структуру (справа) RBE-содержащих частей плеча А-А′, а также плеча С-С′ и В-В′ левого ITR дикого типа ААВ2 (SEQ ID NO: 54). ФИГ. 3В показывает примерную последовательность мутированного ITR (также называемого модифицированным ITR) для левого ITR. Показана первичная структура (слева) и предсказанная вторичная структура (справа) части RBE плеча А-А′, плеча С

и плеча В-В' примерного мутированного левого ITR (ITR-1, слева) (SEQ ID NO: 113). ФИГ. 3С показывает первичную структуру (слева) и вторичную структуру (справа) RBE-содержащей части петли А-А' и плеч В-В' и С-С' правого ITR дикого типа ААВ2 (SEQ ID NO: 55). ФИГ. 3D показывает примерный правый модифицированный ITR.

5 Показана первичная структура (слева) и предсказанная вторичная структура (справа) RBE-содержащей части плеча А-А', В-В' и плеча С примерного мутантного правого ITR (ITR-1, справа) (SEQ ID NO: 114). Любая комбинация левого и правого ITR (например, ITR ААВ2 или другого вирусного серотипа или синтетических ITR) может использоваться, как описано в данном документе. Каждая из полинуклеотидных

10 последовательностей на ФИГ. 3А-3D относится к последовательности, используемой в геноме плазмиды или бакмиды/бакуловируса, применяемых для получения зкДНК, как описано в данном документе. Также на каждой из ФИГ. 3А-3D приведены соответствующие вторичные структуры зкДНК, выведенные на основании конфигураций зкДНК-вектора в геноме плазмиды или бакмиды/бакуловируса и предсказанных

15 значений свободной энергии Гиббса.

[0042] ФИГ. 4А представляет собой схему, иллюстрирующую подготовительный способ получения инфицированных бакуловирусом клеток насекомых (ВПС), которые можно применять для получения зкДНК-вектора для экспрессии РАН, раскрытого в данном документе, в способе, описанном на схеме на ФИГ. 4В. ФИГ. 4В представляет

20 собой схему примерного способа получения зкДНК, и ФИГ. 4С иллюстрирует биохимический метод и способ подтверждения получения зкДНК-вектора. ФИГ. 4D и ФИГ. 4Е представляют собой схематические иллюстрации, описывающие способ идентификации наличия зкДНК в ДНК, собранной из осадков клеток, полученных во время способов продуцирования зкДНК на ФИГ. 4В. ФИГ. 4D схематически показывает

25 ожидаемые полосы примерной зкДНК, оставленной неразрезанной или расщепленной рестрикционной эндонуклеазой, а затем подвергнутой электрофорезу либо на нативном геле, либо на денатурирующем геле. Самая левая схема представляет собой нативный гель и показывает несколько полос, свидетельствующих о том, что в своей дуплексной и неразрезанной форме зкДНК существует по меньшей мере в мономерном и димерном

30 состояниях, наблюдаемых как быстрее мигрирующий мономер меньшего размера и медленнее мигрирующий димер, размер которого в два раза превышает размер мономера. На второй слева схеме показано, что при разрезании зкДНК рестрикционной эндонуклеазой исходные полосы исчезают и появляются быстрее мигрирующие

35 фрагменты, оставшихся после расщепления. В денатурирующих условиях исходная дуплексная ДНК является одноцепочечной и мигрирует как молекула, размер которой в два раза превышает размер, наблюдаемый на нативном геле, поскольку комплементарные цепи ковалентно связаны. Таким образом, на второй схеме справа расщепленная зкДНК показывает распределение полос, сходное с наблюдаемым на

40 нативном геле, но полосы мигрируют как фрагменты, размер которых в два раза превышает размер их аналогов на нативном геле. На самой правой схеме показано, что неразрезанная зкДНК в денатурирующих условиях мигрирует в виде одноцепочечного раскрытого кольца, поэтому размер наблюдаемых полос в два раза превышает размер полос, наблюдаемых в нативных условиях, в которых кольцо не

45 раскрыто. На этой фигуре «тыс. п. о.» используется для обозначения относительного размера нуклеотидных молекул на основании, в зависимости от контекста, либо длины нуклеотидной цепи (например, для одноцепочечных молекул, наблюдаемых в денатурирующих условиях), либо числа пар оснований (например, для двухцепочечных

молекул, наблюдаемых в нативных условиях). ФИГ. 4Е показывает ДНК, имеющую прерывистую структуру. ЗкДНК может быть разрезана рестрикционной эндонуклеазой, имеющей один сайт распознавания в зкДНК-векторе, с получением двух фрагментов ДНК с разными размерами (1 тыс. п. о. и 2 тыс. п. о.) как в нейтральных, так и в денатурирующих условиях. ФИГ. 4Е также показывает зкДНК, имеющую линейную и непрерывную структуру. ЗкДНК-вектор может быть разрезан рестрикционной эндонуклеазой с получением двух фрагментов ДНК, которые мигрируют как 1 тыс. п. о. и 2 тыс. п. о. в нейтральных условиях, но в денатурирующих условиях цепи остаются соединенными и образуют одиночные цепи, которые мигрируют как 2 тыс. п. о. и 4 тыс. п. о.

[0043] ФИГ. 5 представляет собой примерное изображение анализа в денатурирующем геле примеров зкДНК-векторов с (+) или без (-) расщепления эндонуклеазами (EcoRI для зкДНК-конструкции 1 и 2; BamHI для зкДНК-конструкции 3 и 4; SpeI для зкДНК-конструкции 5 и 6; и XhoI для зкДНК-конструкции 7 и 8). Конструкции 1-8 описаны в Примере 1 РСТ международной заявки РСТ/US18/49996, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. Размеры выделенных звездочкой полос были определены и указаны внизу рисунка.

[0044] ФИГ. 6 отображает результаты экспериментов, описанных в Примере 7, и конкретно показывает изображения IVIS, полученные у мышей, получавших контроль ЛНЧ-поли(С) (крайняя слева мышь), и четырех мышей, получавших ЛНЧ-зкДНК-люциферазу (все, кроме крайней слева мыши). У четырех мышей, обработанных зкДНК, наблюдается значительная флуоресценция в области печени мыши.

[0045] ФИГ. 7 отображает результаты эксперимента, описанного в Примере 8. Темные точки (показаны стрелками) указывают на наличие белка, полученного в результате экспрессии трансгена с зкДНК, и демонстрируют ассоциацию введенной ЛНЧ-зкДНК с гепатоцитами.

[0046] ФИГ. 8А и 8В отображают результаты исследований на глазах, изложенных в Примере 9. ФИГ. 8А показывает типичные изображения IVIS из глаз крысы, в которые инъецировали JetPEI[®]-зкДНК-люциферазу (вверху слева), по сравнению с неинъецированным глазом той же крысы (вверху справа) или глазом крысы, в который инъецировали плазмиду-ДНК люциферазы (внизу слева), и неинъецированным глазом той же крысы (внизу справа). ФИГ. 8В показывает график средней светимости, наблюдаемой в обработанных глазах или соответствующих необработанных глазах в каждой из групп обработки. Крысы, обработанные зкДНК, демонстрировали длительную значительную флуоресценцию (и, следовательно, экспрессию трансгена люциферазы) в течение 99 дней, что существенно разнилось с крысами, получавшими плазмиду-люциферазу, у которых наблюдалась минимальная относительная флуоресценция (и, следовательно, экспрессия трансгена люциферазы).

[0047] ФИГ. 9А и 9В отображают результаты исследования устойчивости зкДНК и повторного введения дозы у мышей Rag2, описанного в Примере 10. ФИГ. 9А показывает график зависимости полного потока от времени, наблюдаемой у получавших ЛНЧ-зкДНК-Luc мышей c57bl/6 дикого типа или мышей Rag2. ФИГ. 9В представляет график, показывающий влияние повторной дозы на уровни экспрессии трансгена люциферазы у мышей Rag2, при этом после введения повторной дозы наблюдали повышенную стабильную экспрессию (стрелка указывает время введения повторной дозы).

[0048] ФИГ. 10 представляет данные исследования экспрессии люциферазы с зкДНК у обработанных мышей, описанного в Примере 11, показывающие полный поток в

каждой группе мышей на протяжении исследования. Высокие уровни неметирированного CpG коррелировали с более низким полным потоком, наблюдаемым у мышей с течением времени, в то время как использование специфического для печени промотора коррелировало с продолжительной стабильной экспрессией трансгена с зкДНК-вектора

5 на протяжении по меньшей мере 77 дней.

[0049] ФИГ. 11 представляет собой график, отображающий результаты эксперимента, описанного в Примере 12. Введение каждой из двух конструкций зкДНК РАН (зкДНК № 1, зкДНК № 2) путем гидродинамической доставки мышам РАН^{enu2} приводило к значительному снижению (уменьшение примерно на 75%) уровней РНЕ в сыворотке

10 по сравнению с уровнями, обнаруженными у контрольных мышей, обработанных поли (С).

[0050] ФИГ. 12 представляет собой график, отображающий результаты эксперимента, описанного в Примере 13. hРАН Codop2 относится к зкДНК, содержащей оптимизированную по кодомам последовательность варианта 2 РАН человека (codop_v2), связанную с промотором VandenDriessche (VD); hРАН Codop4 относится к зкДНК, содержащей VD_промотор, функционально связанный с вариантом 4 РАН человека, оптимизированным по кодомам и минимизированным по CpG (codop_CpGmin_v4); зкДНК кДНК hРАН относится к немодифицированной кДНК РАН человека,

15 протестированной в отношении влияния на коррекцию РНЕ у мышей РАН^{enu2} с дефицитом РАН. ФИГ. 12 показывает динамику уровней РНЕ в сыворотке (показаны как % РНЕ, скорректированный относительно контроля РАН^{enu2}). Введение зкДНК, содержащей hРАН Codop2 и Codop4, привело к снижению уровней РНЕ в сыворотке, это указывает на достаточную активность РАН для коррекции уровней фенилаланина

20 в крови при ФКУ у мышей. Показано, что коррекция стабильна в течение 15 дней эксперимента.

[0051] ФИГ. 13 представляет собой график, отображающий результаты эксперимента, описанного в Примере 14. ЗкДНК, содержащую оптимизированный по кодомам вариант 2 hРАН (Codop2), вводили в низких, средних и высоких дозах. ФИГ. 13 показывает динамику уровней РНЕ в сыворотке (РНЕ, мкМ). Введение зкДНК hРАН Codop2 в низких и средних дозах привело к дозозависимому снижению РНЕ в сыворотке. Примечательно, что введение зкДНК hРАН Codop2 в средней дозировке привело к значительно более сильному эффекту, чем введение в низкой дозе. Было показано, что коррекция стабильна в течение 15 дней эксперимента. У контрольного животного (носитель-КО) концентрация РНЕ в сыворотке не снижалась.

[0052] ФИГ. 14А представляет собой график, отображающий результаты эксперимента, описанного в Примере 15. Исследовали эффект зкДНК Codop2 на отдельных животных через 3 и 7 дней. Как показано на ФИГ. 14А, ко дню 3 введение Codop2 привело к снижению уровней РНЕ в сыворотке, это указывает на достаточную

40 активность РАН для коррекции уровней фенилаланина в крови при ФКУ у мышей уже на 3 день.

[0053] ФИГ. 14В представляет собой график, отображающий ферментативную активность РАН человека и полученные в результате уровни фенилаланина в сыворотке, измеренные в ДЕНЬ 3 и ДЕНЬ 7 после инъекции зкДНК, содержащей VD-hРАН Codop2. Овал относится к данным мышей, не имевшим ответа, собранным в ДЕНЬ 7, и соответствует отсутствию коррекции РНЕ на ФИГ. 14А.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0054] В данном документе предложен способ лечения фенилкетонурии (ФКУ) с

применением зкДНК-вектора, содержащего одну или более нуклеиновых кислот, которые кодируют терапевтический белок РАН или его фрагмент. В данном документе также предложены зкДНК-векторы для экспрессии белка РАН, описанные в данном документе, содержащие одну или более гетерологичных нуклеиновых кислот, которые кодируют белок РАН. Согласно некоторым вариантам реализации экспрессия белка РАН может включать секрецию терапевтического белка из клетки, в которой он экспрессируется, или, альтернативно, в некоторых вариантах реализации экспрессированный белок РАН может действовать или функционировать (например, оказывать свой эффект) внутри клетки, в которой он экспрессируется. Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор экспрессирует белок РАН в печени, мышце (например, скелетной мышце) субъекта или в другой части тела, которая может функционировать как депо для продукции и секреции терапевтического белка РАН во многие системные компартменты.

I. Определения

[0055] Если в данном документе не указано иное, научные и технические термины, используемые применительно к настоящей заявке, должны иметь значения, обычно известные обычным специалистами в области техники, к которой относится данное раскрытие. Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретной методологией, протоколами и реагентами, и т. д., описанными в данном документе, и поэтому допускает варианты. Терминология, используемая в данном документе, предназначена исключительно для описания конкретных вариантов реализации, и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который определен исключительно формулой изобретения. Определения обычных терминов в иммунологии и молекулярной биологии можно найти в *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*, 19 изд., опубликовано Merck Sharp & Dohme Corp., 2011 (ISBN 978-0-911910-19-3); Robert S. Porter et al. (под ред.), *Fields Virology*, 6 изд., опубликовано Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA (2013), Knipe, D.M. and Howley, P.M. (ed.), *The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, опубликовано Blackwell Science Ltd., 1999-2012 (ISBN 9783527600908); и Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, опубликовано VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8); *Immunology*, Werner Luttmann, опубликовано Elsevier, 2006; Janeway's *Immunobiology*, Kenneth Murphy, Allan Mowat, Casey Weaver (под ред.), Taylor & Francis Limited, 2014 (ISBN 0815345305, 9780815345305); *Lewin's Genes XI*, опубликовано Jones & Bartlett Publishers, 2014 (ISBN-1449659055); Michael Richard Green and Joseph Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4 изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA (2012) (ISBN 1936113414); Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (2012) (ISBN 044460149X); *Laboratory Methods in Enzymology: DNA*, Jon Lorsch (ed.) Elsevier, 2013 (ISBN 0124199542); *Current Protocols in Molecular Biology (CPMB)*, Frederick M. Ausubel (ed.), John Wiley and Sons, 2014 (ISBN 047150338X, 9780471503385), *Current Protocols in Protein Science (CPPS)*, John E. Coligan (ed.), John Wiley and Sons, Inc., 2005; и *Current Protocols in Immunology (CPI)* (John E. Coligan, ADA M Kruisbeek, David H Margulies, Ethan M Shevach, Warren Strobe, (eds.) John Wiley and Sons, Inc., 2003 (ISBN 0471142735, 9780471142737), содержание которых полностью включено в данный документ посредством ссылки).

[0056] В данном документе термины «введение», «введенный» и их варианты относятся к введению субъекту композиции или агента (например, терапевтической нуклеиновой кислоты или иммуносупрессора, описанных в данном документе) и включают одновременное и последовательное введение одной или более композиций или агентов.

«Введение» может относиться, например, к терапевтическим, фармакокинетическим, диагностическим, исследовательским методам, к плацебо и к экспериментальным методам. «Введение» также включает способы лечения *in vitro* и *ex vivo*. Введение композиции или агента субъекту осуществляют любым подходящим путем, включая перорально, через легкие, интраназально, парентерально (внутривенно, внутримышечно, внутрибрюшинно или подкожно), ректально, введение в лимфатическую систему, внутрь опухоли или местно. Введение субъекту композиции или агента осуществляют с помощью электропорации. Введение включает самостоятельное введение и введение другим лицом. Введение может быть осуществлено любым подходящим путем.

Подходящий путь введения позволяет композиции или агенту выполнять их предусмотренную функцию. Например, если подходящим путем является внутривенный, композицию вводят путем введения указанной композиции или агента в вену субъекта.

[0057] В данном документе выражения «терапевтическое средство на основе нуклеиновой кислоты», «терапевтическая нуклеиновая кислота» и «ТНК» используются взаимозаменяемо и относятся к любому варианту терапевтического средства с использованием нуклеиновых кислот в качестве активного компонента терапевтического агента для лечения заболевания или нарушения. В данном документе указанные выражения относятся к терапевтическим средствам на основе РНК и терапевтическим средствам на основе ДНК. Неограничивающие примеры терапевтических средств на основе РНК включают мРНК, антисмысловую РНК и олигонуклеотиды, рибозимы, аптамеры, интерферирующие РНК (РНКи), дцРНК-субстрат Dicer, короткую шпилечную РНК (кшРНК), асимметричную интерферирующую РНК (аиРНК), микроРНК (миРНК). Неограничивающие примеры терапевтических средств на основе ДНК включают миникольцо ДНК, миниген, вирусную ДНК (например, геном лентивируса или ААВ) или невирусные синтетические ДНК-векторы, линейную дуплексную ДНК с замкнутыми концами (зкДНК/CELiD), плазмиды, бакмиды, ДНК-векторы doggybone (dbDNA™), минималистичный вектор для иммунологически определенной экспрессии гена (MIDGE), невирусный ДНК-вектор с минимальной цепью (линейный ковалентно замкнутый ДНК-вектор) или гантелеобразный минимальный ДНК-вектор («гантелеобразную ДНК»).

[0058] В данном документе «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» терапевтического агента, такого как терапевтический белок РАН или его фрагмент, представляет собой количество, достаточное для получения целевого эффекта, например, обеспечения модифицирующих заболевание уровней фермента РАН, устойчивой экспрессии корректирующего фермента РАН в печени, восстановления функции цикла мочевины, метаболизма фенилаланина и/или достижения соответствующих фармакологических уровней дефектного фермента. Подходящие анализы для измерения экспрессии целевого гена или целевой последовательности включают, например, исследование уровней белка или РНК с применением методик, известных специалистам в данной области техники, таких как дот-блоттинг, Нозерн-блоттинг, гибридизация *in situ*, ИФА, иммунопреципитация, функциональный ферментный анализ, а также фенотипические анализы, известные специалистам в данной области техники. Однако уровни дозировки основаны на различных факторах, включая тип повреждения, возраст, массу тела, пол, медицинское состояние пациента, тяжесть состояния, путь введения и конкретный применяемый активный агент. Соответственно, схема дозирования может значительно изменяться, однако может быть определена обычным путем лечащим врачом с применением стандартных способов. Кроме того, термины «терапевтическое количество», «терапевтически эффективные количества» и

«фармацевтически эффективные количества» включают профилактические или превентивные количества композиций согласно описанному изобретению. В профилактических или превентивных приложениях описанного изобретения фармацевтические композиции или лекарственные средства вводят пациенту, подверженному или по иным причинам имеющему риск развития заболевания, нарушения или состояния, в количестве, достаточном для того чтобы устранить или уменьшить риск, уменьшить степень тяжести или отсрочить начало указанного заболевания, нарушения или состояния, включая биохимические, гистологические и/или поведенческие симптомы указанного заболевания, нарушения или состояния, его осложнения, и промежуточные патологические фенотипы, возникающие в ходе развития указанного заболевания, нарушения или состояния. Обычно предпочтительным является применение максимальной дозы, т. е. самой высокой безопасной дозы в соответствии с некоторым медицинским заключением. В соответствии с некоторыми вариантами реализации заболевание, нарушение или состояние представляет собой ФКУ. Термины «доза» и «дозировка» используются в данном документе взаимозаменяемо.

[0059] В данном документе термин «терапевтический эффект» относится к последствиям лечения, результаты которого оценивают как целевые и благоприятные. Терапевтический эффект может включать, прямо или опосредованно, остановку, уменьшение или устранение проявления заболевания. Терапевтический эффект также может включать, прямо или опосредованно, остановку, уменьшение или устранение прогрессирования проявления заболевания.

[0060] Для любого терапевтического агента, описанного в данном документе, терапевтически эффективное количество может быть изначально определено на основании предварительных исследований *in vitro* и/или в моделях на животных. Терапевтически эффективная доза также может быть определена на основании данных у человека. Применяемая доза может быть скорректирована на основании относительных биодоступности и эффективности вводимого соединения. Коррекция дозы для достижения максимальной эффективности на основе описанных выше способов и других хорошо известных способов находится в пределах возможностей обычного специалиста в данной области техники. Общие принципы определения терапевтической эффективности, с которыми можно ознакомиться в главе 1 руководства Goodman and Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10 изд., McGraw-Hill (New York) (2001), включенного в данный документ посредством ссылки, обобщены ниже.

[0061] Фармакокинетические принципы обеспечивают основу для модификации схемы дозирования для получения целевой степени терапевтической эффективности с минимумом неприемлемых нежелательных явлений. Дополнительные рекомендации по модификации дозировки могут быть получены в ситуациях, когда концентрация лекарственного средства в плазме может быть измерена и соотнесена с терапевтическим окном.

[0062] В данном документе термины «гетерологичная нуклеотидная последовательность» и «трансген» используются взаимозаменяемо и относятся к представляющей интерес нуклеиновой кислоте (отличной от нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид капсида), которая встроена в зкДНК-вектор и может быть доставлена и экспрессирована им, как раскрыто в данном документе.

[0063] В данном документе термины «экспрессионная кассета» и «транскрипционная кассета» используются взаимозаменяемо и относятся к линейному участку нуклеиновых кислот, который включает трансген, функционально связанный с одним или более промоторами или другими регуляторными последовательностями, достаточными для

направления транскрипции трансгена, но который не содержит кодирующих капсид последовательностей, других векторных последовательностей или областей инвертированных концевых повторов. Экспрессионная кассета может дополнительно содержать одну или более цис-действующих последовательностей (например, промоторов, энхансеров или репрессоров), один или более интронов и один или более посттранскрипционных регуляторных элементов.

[0064] Термины «полинуклеотид» и «нуклеиновая кислота», используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, будь то рибонуклеотиды или дезоксирибонуклеотиды. Таким образом, этот термин включает одно-, двух- или многоцепочечные ДНК или РНК, геномную ДНК, кДНК, гибриды ДНК-РНК или полимер, включающий пуриновые и пиримидиновые основания или другие природные, химически или биохимически модифицированные, неприродные или дериватизированные нуклеотидные основания. «Олигонуклеотид» обычно относится к полинуклеотидам, содержащим от примерно 5 до примерно 100 нуклеотидов одно- или двухцепочечной ДНК. Однако для целей настоящего раскрытия верхнего предела длины олигонуклеотида не существует. Олигонуклеотиды также известны как «олигомеры» или «олиго» (oligos) и могут быть выделены из генов или химически синтезированы с помощью способов, известных в данной области техники. Термины «полинуклеотид» и «нуклеиновая кислота» следует понимать как включающие, применительно к описываемым вариантам реализации, одноцепочечные (такие как смысловые или антисмысловые) и двухцепочечные полинуклеотиды. ДНК может быть в форме, например, антисмысловых молекул, плазмидной ДНК, дуплексов ДНК-ДНК, предварительно конденсированной ДНК, продуктов ПЦР, векторов (Р1, РАС, ВАС, УАС, искусственные хромосомы), экспрессионных кассет, химерных последовательностей, хромосомной ДНК или производных и комбинаций указанных групп. ДНК может быть в форме миникольца, плазмиды, бакмиды, минигена, ДНК с минимальной цепью (линейного ковалентно замкнутого ДНК-вектора), линейной дуплексной ДНК с замкнутыми концами (CELiD или зкДНК), ДНК doggybone (dbDNA™), гантелеобразной ДНК, минималистичного вектора для иммунологически определенной экспрессии гена (MIDGE), вирусного вектора или невирусных векторов. РНК может быть в форме короткой интерферирующей РНК (киРНК), дцРНК-субстрата Dicer, короткой шпилечной РНК (кшРНК), асимметричной интерферирующей РНК (аиРНК), микроРНК (миРНК), мРНК, рРНК, тРНК, вирусной РНК (вРНК) и их комбинаций. Нуклеиновые кислоты включают нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги нуклеотидов или модифицированные остатки или связи остова, которые являются синтетическими, природными и неприродными, и которые имеют связывающие свойства, близкие свойствам референсной нуклеиновой кислоты. Примеры таких аналогов и/или модифицированных остатков включают, без ограничения, фосфотиоаты, фосфодиамидат-морфолиновый олигомер (морфолино), фосфоамидаты, метилфосфонаты, хиральные метилфосфонаты, 2'-О-метилрибонуклеотиды, замкнутую нуклеиновую кислоту (LNA™) и пептидные нуклеиновые кислоты (ПНК). За исключением конкретно указанных ограничений термин включает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, которые имеют связывающие свойства, близкие свойствам референсной нуклеиновой кислоты. Если не указано иное, подразумевается также, что конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также включает ее консервативно модифицированные варианты (например, вырожденные замены кодонов), аллели, ортологи, однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) и комплементарные последовательности, а также последовательность, указанную

явным образом.

[0065] «Нуклеотиды» содержат сахар дезоксирибозу (ДНК) или рибозу (РНК), основание и фосфатную группу. Нуклеотиды соединены между собой посредством фосфатных групп.

5 [0066] «Основания» включают пурины и пиримидины, которые, в частности, включают природные соединения аденин, тимин, гуанин, цитозин, урацил, инозин и природные аналоги, а также синтетические производные пуринов и пиримидинов, которые включают, но не ограничиваются перечисленными, модификации, которые вводят новые реакционноспособные группы, такие как, но не ограничиваясь

10 перечисленными, амины, спирты, тиолы, карбоксилаты и алкилгалогениды.
 [0067] В данном документе термин «интерферирующая РНК» или «РНКи», или «последовательность интерферирующей РНК» включает одноцепочечную РНК (например, зрелую миРНК, олигонуклеотиды оцРНКи, олигонуклеотиды оцДНКи), двухцепочечную РНК (т. е. дуплексную РНК, такую как киРНК, дцРНК-субстрат Dicer, кшРНК, айРНК или пре-миРНК), гибрид ДНК-РНК (см., например, публикацию РСТ № WO 2004/078941) или гибрид ДНК-ДНК (см., например, публикацию РСТ № WO 2004/104199), который способен уменьшать или ингибировать экспрессию целевого гена или последовательности (например, опосредуя разрушение или ингибируя трансляцию мРНК, которые комплементарны последовательности интерферирующей РНК), когда интерферирующая РНК находится в той же клетке, что и целевой ген или последовательность. Таким образом, интерферирующая РНК относится к одноцепочечной РНК, которая комплементарна последовательности мРНК-мишени, или к двухцепочечной РНК, образованной двумя комплементарными цепями или одной самокомплементарной цепью. Интерферирующая РНК может иметь существенную или полную идентичность с целевым геном или последовательностью или может содержать область несовпадения (т. е. мотив несовпадения). Последовательность интерферирующей РНК может соответствовать полноразмерному целевому гену или его подпоследовательности. Предпочтительно молекулы интерферирующих РНК синтезируют химическим путем. Раскрытия каждого из упомянутых выше патентных документов полностью включены в данный документ посредством ссылки для всех целей.

[0068] Интерферирующая РНК включает «короткую интерферирующую РНК» или «киРНК», например, интерферирующую РНК из примерно 15-60, 15-50 или 15-40 (дуплекс) нуклеотидов в длину, более типично примерно 15-30, 15-25 или 19-25 (дуплекс) нуклеотидов в длину и предпочтительно составляет примерно 20-24, 21-22 или 21-23 (дуплекс) нуклеотида в длину (например, каждая комплементарная последовательность двухцепочечной киРНК составляет 15-60, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25 или 19-25 нуклеотидов в длину, предпочтительно примерно 20-24, 21-22 или 21-23 нуклеотида в длину, и двухцепочечная киРНК составляет примерно 15-60, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25 или 19-25 пар оснований в длину, предпочтительно примерно 18-22, 19-20 или 19-21 пару оснований в длину). Дуплексы киРНК могут содержать 3'-липкие концы, имеющие от примерно 1 до примерно 4 нуклеотидов или от примерно 2 до примерно 3 нуклеотидов, и 5'-фосфатные концы. Примеры киРНК включают, без ограничения, двухцепочечную полинуклеотидную молекулу, собранную из двух одноцепочечных молекул, причем одна цепь является смысловой цепью, а другая представляет собой комплементарную антисмысловую цепь; двухцепочечную полинуклеотидную молекулу, собранную из одноцепочечной молекулы, в которой смысловая и антисмысловая области соединены линкером на основе нуклеиновой кислоты или на основе, отличной от нуклеиновой

кислоты; двухцепочечную полинуклеотидную молекулу со шпилечной вторичной структурой, имеющей самокомплементарные смысловые и антисмысловые области; и кольцевую одноцепочечную полинуклеотидную молекулу с двумя или более петлевыми структурами и стеблем, имеющим самокомплементарные смысловые и антисмысловые области, причем кольцевой полинуклеотид может подвергаться процессингу *in vivo* или *in vitro* с получением активной двухцепочечной молекулы киРНК. В данном документе термин «киРНК» включает дуплексы РНК-РНК, а также гибриды ДНК-РНК (см., например, публикацию РСТ № WO 2004/078941, полностью включенную в данный документ посредством ссылки).

[0069] В данном документе термин «конструкция нуклеиновой кислоты» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, будь то одноцепочечная или двухцепочечная, которая выделена из природного гена или которая модифицирована так, чтобы она содержала сегменты нуклеиновых кислот, с помощью способа, который в прочих случаях не существовал бы в природе, или является синтетической. Термин «конструкция нуклеиновой кислоты» является синонимом термина «экспрессионная кассета», когда конструкция нуклеиновой кислоты содержит контрольные последовательности, необходимые для экспрессии кодирующей последовательности согласно настоящему раскрытию. «Экспрессионная кассета» включает кодирующую последовательность ДНК, функционально связанную с промотором.

[0070] Под «гибридируемая» или «комплементарная» или «по существу комплементарная» подразумевается, что нуклеиновая кислота (например, РНК) включает последовательность нуклеотидов, которая позволяет ей нековалентно связываться, т. е. формировать пары оснований по Уотсону-Крику и/или пары оснований G/U, «ренатурировать» или «гибридизоваться» с другой нуклеиновой кислотой специфичным для последовательности, антипараллельным образом (т. е. нуклеиновая кислота специфично связывается с комплементарной нуклеиновой кислотой) в соответствующих условиях температуры и ионной силы раствора *in vitro* и/или *in vivo*. Как известно в данной области техники, стандартное спаривание оснований по Уотсону-Крику включает: спаривание аденина (А) с тимидином (Т), спаривание аденина (А) с урацилом (U) и спаривание гуанина (G) с цитозином (С). Кроме того, в данной области техники также известно, что при гибридизации двух молекул РНК (например, дцРНК) гуаниновое (G) основание спаривается с урацилом (U). Например, спаривание оснований G/U частично отвечает за вырожденность (т. е. избыточность) генетического кода в случае спаривания оснований анти-кодонов тРНК с кодонами в мРНК. Применительно к настоящему раскрытию гуанин (G) связывающего белок сегмента (дуплекса дцРНК) нацеливающей на ДНК молекулы РНК согласно настоящему изобретению считается комплементарным урацилу (U), и наоборот. Таким образом, когда пара оснований G/U может быть получена в определенном нуклеотидном положении связывающего белок сегмента (дуплекса дцРНК) нацеливающей на ДНК молекулы РНК согласно настоящему изобретению, это положение не рассматривается как некомплементарное, а вместо этого считается комплементарным.

[0071] Термины «пептид», «полипептид» и «белок» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к полимерной форме аминокислот любой длины, которая может включать кодируемые и не кодируемые аминокислоты, химически или биохимически модифицированные или дериватизированные аминокислоты, и полипептиды, имеющие модифицированные пептидные остовы.

[0072] Последовательность ДНК, которая «кодирует» конкретный белок РАН, представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты ДНК, которая

транскрибируется в конкретную РНК и/или белок. Полинуклеотид ДНК может кодировать РНК (мРНК), которая транслируется в белок, или полинуклеотид ДНК может кодировать РНК, которая не транслируется в белок (например, тРНК, рРНК или нацеливающую на ДНК РНК; также называемые «некодирующими» РНК или

5 «нкРНК»).

В данном документе термин «слитый белок», в используемом в данном документе значении, относится к полипептиду, который содержит белковые домены по меньшей мере из двух разных белков. Например, слитый белок может содержать (i) РАН или его фрагмент и (ii) по меньшей мере один белок, не относящийся к GOI. Слитые белки,

10 охватываемые данным документом, включают, но не ограничиваются перечисленными, антитело или Fc или антигенсвязывающий фрагмент антитела, слитый с белком РАН, например, внеклеточным доменом рецептора, лигандом, ферментом или пептидом. Белок РАН или его фрагмент, который является частью слитого белка, может представлять собой моноспецифичное антитело или биспецифичное или

15 мультиспецифичное антитело.

[0073] В данном документе термин «ген безопасной гавани генома» или «ген безопасной гавани» относится к гену или локусам, в которые последовательность нуклеиновой кислоты может быть вставлена так, чтобы последовательность могла интегрироваться и функционировать предсказуемым образом (например,

20 экспрессировать белок, представляющий интерес) без существенных отрицательных последствий для активности эндогенного гена или стимуляции рака. Согласно некоторым вариантам реализации ген безопасной гавани также представляет собой локусы или ген, в которых вставленная последовательность нуклеиновой кислоты может экспрессироваться эффективнее и на более высоких уровнях, чем в сайте, не

25 являющемся «безопасной гаванью».

[0074] В данном документе термин «доставка гена» означает способ, с помощью которого чужеродную ДНК переносят в клетки-хозяева для приложений генной терапии.

[0075] В данном документе термин «концевой повтор» или «TR» включает любой вирусный концевой повтор или синтетическую последовательность, которая содержит

30 по меньшей мере одну минимальную требуемую точку начала репликации и область, содержащую палиндромную шпильчатую структуру. Связывающая Rep последовательность («RBS») (также называемая RBE (связывающий Rep элемент)) и сайт концевого разрешения («TRS») вместе составляют «минимальную требуемую точку начала репликации» и, соответственно, TR содержит по меньшей мере одну RBS и по

35 меньшей мере один TRS. Каждый из TR, обратных комплементарных по отношению друг к другу в пределах определенного участка полинуклеотидной последовательности, как правило, называют «инвертированным концевым повтором» или «ITR».

Применительно к вирусу ITR опосредуют репликацию, упаковку вируса, интеграцию и освобождение провируса. Как было неожиданно обнаружено, согласно настоящему

40 изобретению TR, которые не являются обратными комплементарными по всей их длине, все еще могут выполнять обычные функции ITR и, таким образом, в данном документе термин ITR относится к TR в геноме зкДНК или зкДНК-векторе, который способен опосредовать репликацию зкДНК-вектора. Обычный специалист в данной области техники поймет, что в зкДНК-векторах сложной конфигурации может присутствовать

45 более двух пар ITR или асимметричных ITR. ITR может представлять собой ITR AAB или ITR, не принадлежащий AAB, или может быть получен из ITR AAB или ITR, не принадлежащего AAB. Например, ITR может происходить из вируса семейства Parvoviridae, которое включает парвовирусы и депендоввирусы (например, собачий

парвовирус, бычий парвовирус, мышинный парвовирус, свиной парвовирус, парвовирус человека В-19), или шпилька SV40, которая служит точкой начала репликации SV40, может применяться в качестве ITR, который может быть дополнительно модифицирован путем усечения, замены, делеции, вставки и/или добавления. Вирусы семейства Parvoviridae состоят из двух подсемейств: Parvovirinae, инфицирующих позвоночных животных, и Densovirinae, инфицирующих беспозвоночных. Депендопарвовирусы включают вирусное семейство аденоассоциированных вирусов (ААВ), которые способны к репликации у позвоночных животных-хозяев, включая, но не ограничиваясь перечисленными, человека, виды приматов, бычьих, собачьих, лошадиных и овечьих. Для удобства в данном документе ITR, расположенный в 5'-направлении (слева) относительно экспрессионной кассеты в зкДНК-векторе, называется «5'-ITR» или «левым ITR», а ITR, расположенный в 3'-направлении (справа) относительно экспрессионной кассеты в зкДНК-векторе, называется «3'-ITR» или «правым ITR».

[0076] «ITR дикого типа» или «WT-ITR» относится к последовательности природной последовательности ITR в ААВ или другом депендовирусе, которая сохраняет, например, активность связывания Rep и никирующую способность Rep. Нуклеотидная последовательность WT-ITR из любого серотипа ААВ может незначительно отличаться от канонической природной последовательности из-за вырожденности генетического кода или дрейфа, и, таким образом, последовательности WT-ITR, предусмотренные для применения в данном документе, включают последовательности WT-ITR, образующиеся в результате природных изменений, происходящих в процессе продуцирования (например, ошибки репликации).

[0077] В данном документе термин «по существу симметричные WT-ITR» или «пара по существу симметричных WT-ITR» относится к паре WT-ITR в одном геноме зкДНК или зкДНК-векторе, которые оба представляют собой ITR дикого типа, которые имеют обратно комплементарные последовательности по всей их длине. Например, ITR может считаться последовательностью дикого типа, даже если он содержит один или более нуклеотидов, отличающихся от канонической природной последовательности, при условии, что указанные изменения не влияют на свойства и общую трехмерную структуру последовательности. Согласно некоторым аспектам отличающиеся нуклеотиды представляют собой консервативные изменения последовательности. В качестве одного неограничивающего примера, последовательность, имеющая по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с канонической последовательностью (измеренной, например, с использованием BLAST при настройках по умолчанию), также имеет симметричную трехмерную пространственную организацию с другой последовательностью WT-ITR так, что их трехмерные структуры имеют одинаковую форму в геометрическом пространстве. По существу симметричный WT-ITR содержит одинаковые петли А, С-С' и В-В' в трехмерном пространстве. То, что по существу симметричный WT-ITR представляет собой WT может быть функционально подтверждено путем определения наличия в нем функционального сайта связывания Rep (RBE или RBE') и сайта концевой разрешения (TRS), который спаривается с соответствующим белком Rep. Могут быть протестированы другие функции, включая экспрессию трансгена в перmissive условиях, но необязательно.

[0078] В данном документе выражения «модифицированный ITR» или «mod-ITR», или «мутантный ITR» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к ITR, который содержит мутацию по меньшей мере в одном или более нуклеотидах по сравнению с WT-ITR из того же серотипа. Мутация может приводить к изменению

в одной или более из областей А, С, С', В, В' в ITR и может приводить к изменению трехмерной пространственной организации (т. е. его трехмерной структуры в геометрическом пространстве) по сравнению с трехмерной пространственной организацией WT-ITR из того же серотипа.

5 [0079] В данном документе термин «асимметричные ITR», также называемые «парами асимметричных ITR», относится к паре ITR в одном геноме зкДНК или зкДНК-векторе, которые не являются обратно комплементарными по их полной длине. В качестве
 10 одного неограничивающего примера, асимметричный ITR в паре не имеет симметричной трехмерной пространственной организации со своим когнатным ITR так, что их трехмерные структуры имеют разные формы в геометрическом пространстве. Другими
 15 словами, асимметричные ITR в паре имеют разные общие геометрические структуры, т. е. они имеют разную организацию их петель А, С-С' и В-В' в трехмерном пространстве (например, один ITR может иметь короткое плечо С-С' и/или короткое плечо В-В' по сравнению с когнатным ITR). Различие по последовательности между двумя ITR может
 20 быть обусловлено добавлением, делецией, усечением или точечной мутацией одного или более нуклеотидов. Согласно одному варианту реализации один ITR из пары асимметричных ITR может представлять собой последовательность ITR дикого типа ААВ, а другой ITR представляет собой модифицированный ITR, как определено в
 25 данном документе (например, последовательность ITR, не относящуюся к дикому типу, или синтетическую последовательность). Согласно другому варианту реализации ни один ITR из пары асимметричных ITR не является последовательностью ААВ дикого типа, и указанные два ITR представляют собой модифицированные ITR, которые имеют разные формы в геометрическом пространстве (т. е. разную общую геометрическую структуру). Согласно некоторым вариантам реализации один mod-ITR из пары
 30 асимметричных ITR может иметь короткое плечо С-С', а другой ITR может иметь другую модификацию (например, одно плечо или короткое плечо В-В' и т. д.) так, что они имеют различную трехмерную пространственную организацию по сравнению с когнатным асимметричным mod-ITR.

[0080] В данном документе термин «симметричные ITR» относится к паре ITR в
 35 одном зкДНК-геноме или зкДНК-векторе, которые представляют собой последовательности дикого типа или мутированные (например, модифицированные относительно дикого типа) депендовиральные последовательности ITR и обратно комплементарны по всей их длине. В одном неограничивающем примере оба ITR представляют собой последовательности ITR дикого типа из ААВ2. В другом примере
 40 ни один из ITR не является последовательностью ITR дикого типа ААВ2 (т. е. они представляют собой модифицированные ITR, также называемые мутантными ITR) и может отличаться по последовательности от ITR дикого типа вследствие добавления, делеции, замены, усечения или точечной мутации нуклеотида. Для удобства в данном документе ITR, расположенный в 5'-направлении (слева) относительно экспрессионной
 45 кассеты в зкДНК-векторе, называется «5'-ITR» или «левым ITR», а ITR, расположенный в 3'-направлении (справа) относительно экспрессионной кассеты в зкДНК-векторе, называется «3'-ITR» или «правым ITR».

[0081] В данном документе термин «по существу симметричные модифицированные ITR» или «пара по существу симметричных mod-ITR» относится к паре
 45 модифицированных ITR в одном геноме зкДНК или зкДНК-векторе, которые оба имеют обратно комплементарные последовательности по всей их длине. Например, модифицированный ITR может считаться по существу симметричным, даже если он имеет некоторые нуклеотидные последовательности, отличающиеся от обратно

комплементарной последовательности, при условии, что указанные изменения не влияют на свойства и общую форму. В качестве одного неограничивающего примера представлена последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с канонической последовательностью (измеренной с помощью BLAST при настройках по умолчанию), а также имеет симметричную трехмерную пространственную организацию в отношении ее когнатного модифицированного ITR так, что их трехмерные структуры имеют одинаковую форму в геометрическом пространстве. Другими словами, пара по существу симметричных модифицированных ITR имеет одинаково организованные в трехмерном пространстве петли А, С-С' и В-В'. Согласно некоторым вариантам реализации ITR из пары mod-ITR могут иметь разные обратно комплементарные нуклеотидные последовательности, но все же иметь одинаковую симметричную трехмерную пространственную организацию, т. е. оба ITR содержат мутации, которые приводят к одинаковой общей трехмерной форме. Например, один ITR (например, 5'-ITR) в паре mod-ITR может происходить из одного серотипа, а другой ITR (например, 3'-ITR) может происходить из другого серотипа, однако оба могут иметь одинаковую соответствующую мутацию (например, если 5'-ITR имеет делецию в области С, то когнатный модифицированный 3'-ITR из другого серотипа имеет делецию в соответствующем положении в области С') так, что пара модифицированных ITR имеет одинаковую симметричную трехмерную пространственную организацию. Согласно таким вариантам реализации каждый ITR в паре модифицированных ITR может происходить из разных серотипов (например, ААВ1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12), таких как комбинация ААВ2 и ААВ6, при этом модификация в одном ITR отображается в соответствующем положении в когнатном ITR из другого серотипа. Согласно одному варианту реализации пара по существу симметричных модифицированных ITR относится к паре модифицированных ITR (mod-ITR) при условии, что различие в нуклеотидных последовательностях между указанными ITR не влияет на свойства или общую форму, и они имеют по существу одинаковую форму в трехмерном пространстве. В качестве неограничивающего примера представлен mod-ITR, который имеет по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с каноническим mod-ITR, как определено с помощью стандартных способов, хорошо известных в данной области техники, таких как BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) или BLASTN, при настройках по умолчанию, а также имеет симметричную трехмерную пространственную организацию так, что их трехмерная структура имеет одинаковую форму в геометрическом пространстве. Пара по существу симметричных mod-ITR имеет одинаковые петли А, С-С' и В-В' в трехмерном пространстве, например, если модифицированный ITR в паре по существу симметричных mod-ITR имеет делецию плеча С-С', то когнатный mod-ITR имеет соответствующую делецию петли С-С', а также имеет сходную трехмерную структуру остальных петель А и В-В' одинаковой формы в геометрическом пространстве со своим когнатным mod-ITR.

[0082] Термин «фланкирование» относится к относительному положению одной последовательности нуклеиновой кислоты по отношению к другой последовательности нуклеиновой кислоты. Обычно в последовательности ABC А и С фланкируют В. То же самое верно для расположения AxVxC. Соответственно, фланкирующая последовательность предшествует фланкируемой последовательности или следует за ней, но не обязательно должна быть смежной с фланкируемой последовательностью или непосредственно прилегать к ней. Согласно одному варианту реализации термин «фланкирование» относится к концевым повторам на каждом конце линейного

дуплексного зкДНК-вектора.

[0083] В данном документе термины «лечить», «осуществлять лечение» и/или «лечение» включают подавление, по существу ингибирование, замедление или обращение прогрессирования состояния, по существу облегчение клинических симптомов состояния, по существу предотвращение появления клинических симптомов состояния, получение благоприятных или целевых клинических результатов. В соответствии с некоторыми вариантами реализации состояние представляет собой ФКУ. Лечение также относится к достижению одного или более из следующих: (a) уменьшения степени тяжести нарушения; (b) ограничения развития симптомов, характерных для нарушения (ий), которое лечат; (c) ограничения ухудшения симптомов, характерных для нарушения (ий), которое лечат; (d) ограничения рецидивирования нарушения (ий) у пациентов, ранее имевших указанное нарушение (ия); и (e) ограничения рецидивирования симптомов у пациентов, ранее не имевших симптомов указанного нарушения (ий). Благоприятные или целевые клинические результаты, такие как фармакологические и/или физиологические эффекты, включают, но не ограничиваются перечисленными, предотвращение наступления заболевания, нарушения или состояния у субъекта, который может быть предрасположен к указанному заболеванию, нарушению или состоянию, но еще не испытывает симптомов или у него еще не проявляются симптомы указанного заболевания (профилактическое лечение), облегчение симптомов указанного заболевания, нарушения или состояния, уменьшение интенсивности заболевания, нарушения или состояния, стабилизацию (т. е., отсутствие ухудшения) указанного заболевания, нарушения или состояния, предотвращение распространения указанного заболевания, нарушения или состояния, задержку или замедление прогрессирования указанного заболевания, нарушения или состояния, облегчение или временное облегчение указанного заболевания, нарушения или состояния, и комбинации перечисленных, а также увеличение продолжительности выживания по сравнению с ожидаемым выживанием без лечения.

[0084] В данном документе термин «увеличение», «усиление», «повышение» (и подобные термины) обычно относится к акту увеличения, прямо или опосредовано, концентрации, уровня, функции, активности или поведения относительно природного, ожидаемого или среднего, или относительно контрольного состояния.

[0085] В данном документе термин «минимизировать», «уменьшать», «снижать» и/или «ингибировать» (и подобные термины) обычно относится к акту уменьшения, прямо или опосредовано, концентрации, уровня, функции, активности, поведения относительно природного, ожидаемого, среднего, или относительно контрольного состояния.

[0086] В данном документе термин «зкДНК-геном» относится к экспрессионной кассете, которая дополнительно включает по меньшей мере одну область инвертированного концевой повтора. ЗкДНК-геном может дополнительно содержать одну или более спейсерных областей. Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-геном включен в виде межмолекулярного дуплексного полинуклеотида ДНК в плазмиду или вирусный геном.

[0087] В данном документе термин «спейсерная область зкДНК» относится к промежуточной последовательности, которая разделяет функциональные элементы в зкДНК-векторе или геноме зкДНК. Согласно некоторым вариантам реализации спейсерные области зкДНК удерживают два функциональных элемента на целевом расстоянии для оптимальной функциональности. Согласно некоторым вариантам реализации спейсерные области зкДНК обеспечивают или увеличивают генетическую

стабильность зкДНК-генома, например, в плазмиде или бакуловирусе. Согласно некоторым вариантам реализации спейсерные области зкДНК облегчают подготовленные генетические манипуляции с зкДНК-геномом, обеспечивая удобное расположение для сайтов клонирования и т.п. Например, согласно определенным аспектам олигонуклеотидный «полилинкер», содержащий несколько сайтов рестрикционных эндонуклеаз, или последовательность не из открытой рамки считывания, сконструированная так, чтобы в ней отсутствовали известные сайты связывания белка (например, транскрипционного фактора), могут быть размещены в зкДНК-геноме для разделения цис-действующих факторов, например, с помощью 6-членной, 12-членной, 18-членной, 24-членной, 48-членной, 86-членной, 176-членной вставки и т. д. между сайтом конечного разрешения и расположенным в 5'-направлении транскрипционным регуляторным элементом. Аналогичным образом, спейсер может быть встроен между последовательностью сигнала полиаденилирования и 3'-сайтом конечного разрешения.

[0088] В данном документе термины «сайт связывания Rep», «элемент связывания Rep», «RBE» и «RBS» используются взаимозаменяемо и относятся к сайту связывания белка Rep (например, Rep 78 AAB или Rep 68 AAB), который после связывания белком Rep позволяет белку Rep выполнять его сайт-специфичную эндонуклеазную активность в отношении последовательности, включающей RBS. Последовательность RBS и ее обратная комплементарная последовательность вместе образуют один RBS. Последовательности RBS известны в данной области техники и включают, например, 5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3' (SEQ ID NO: 60), представляющую собой последовательность RBS, идентифицированную в AAB2. В вариантах реализации настоящего изобретения можно применять любую известную последовательность RBS, включая другие известные последовательности RBS AAB и другие известные природные или синтетические последовательности RBS. Без ограничения какой-либо теорией, считается, что нуклеазный домен белка Rep связывается с дуплексной нуклеотидной последовательностью GCTC и, соответственно, происходит прямое связывание и стабильная сборка двух известных белков Rep AAB на дуплексном олигонуклеотиде 5'-(GCGC)(GCTC)(GCTC)(GCTC)-3' (SEQ ID NO: 60). Кроме того, растворимые агрегированные конформеры (т. е. неопределенное число взаимосвязанных белков Rep) диссоциируют и связываются с олигонуклеотидами, которые содержат сайты связывания Rep. Каждый белок Rep взаимодействует как с азотистыми основаниями, так и с фосфодиэфирным остовом на каждой цепи. Взаимодействия с азотистыми основаниями обеспечивают специфичность в отношении последовательности, в то время как взаимодействия с фосфодиэфирным остовом неспецифичны или менее специфичны в отношении последовательности и стабилизируют комплекс белка с ДНК.

[0089] В данном документе термины «сайт конечного разрешения» и «TRS» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к области, в которой Rep образует тирозин-фосфодиэфирную связь с 5'-тимидином с образованием 3'-ОН, который служит субстратом для удлинения ДНК с помощью клеточной ДНК-полимеразы, например, ДНК-полимеразы дельта или ДНК-полимеразы эпсилон. В качестве альтернативы, комплекс Rep-тимидин может принимать участие в скоординированной реакции лигирования. Согласно некоторым вариантам реализации TRS включает, как минимум, неспаренный тимидин. Согласно некоторым вариантам реализации никирующую эффективность TRS по меньшей мере отчасти можно контролировать за счет расстояния между ним и RBS в пределах одной молекулы. Если акцепторный субстрат представляет собой комплементарный ITR, тогда полученный

продукт представляет собой внутримолекулярный дуплекс. Последовательности TRS известны в данной области техники и включают, например, 5'-GGTTGA-3' (SEQ ID NO: 61), представляющую собой гексануклеотидную последовательность, идентифицированную в AAB2. В вариантах реализации настоящего изобретения можно применять любую известную последовательность TRS, включая другие известные последовательности TRS AAB и другие известные природные или синтетические последовательности TRS, такие как AGTT (SEQ ID NO: 62), GGTTGG (SEQ ID NO: 63), AGTTGG (SEQ ID NO: 64), AGTTGA (SEQ ID NO: 65), и другие мотивы, такие как RRTTRR (SEQ ID NO: 66).

[0090] В данном документе термин «зкДНК-плазида» относится к плазмиде, которая содержит зкДНК-геном в виде межмолекулярного дуплекса.

[0091] В данном документе термин «зкДНК-бакмида» относится к геному инфекционного бакуловируса, содержащему зкДНК-геном в виде межмолекулярного дуплекса, который способен размножаться в *E. coli* в виде плазмиды и, соответственно, может выполнять роль челночного вектора для бакуловируса.

[0092] В данном документе термин «зкДНК-бакуловирус» относится к бакуловирусу, который содержит зкДНК-геном в виде межмолекулярного дуплекса в геноме бакуловируса.

[0093] В данном документе термины «инфицированная зкДНК-бакуловирусом клетка насекомого» и «зкДНК-ВПС» используются взаимозаменяемо и относятся к клетке беспозвоночного животного-хозяина (включая, но не ограничиваясь этим, клетку насекомого (например, клетку Sf9)), инфицированной зкДНК-бакуловирусом.

[0094] В данном документе термин «зкДНК» относится к бескапсидной линейной двухцепочечной (дц) дуплексной ДНК с замкнутыми концами для невирусного переноса генов, синтетической или другой. Подробное описание зкДНК приведено в международной заявке PCT/US2017/020828, поданной 3 марта 2017 г., содержание которой полностью явным образом включено в данный документ посредством ссылки. Некоторые способы получения зкДНК, содержащей различные последовательности и конфигурации инвертированных концевых повторов (ITR), с использованием клеточных методов описаны в Примере 1 международной заявки PCT/US18/49996, поданной 7 сентября 2018 г., и PCT/US2018/064242, поданной 6 декабря 2018 г., каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки. Некоторые способы получения синтетических зкДНК-векторов, содержащих различные последовательности и конфигурации ITR, описаны, например, в международной заявке PCT/US2019/14122, поданной 18 января 2019 г., содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

[0095] В данном документе термин «ДНК-вектор с замкнутыми концами» относится к бескапсидному ДНК-вектору по меньшей мере с одним ковалентно замкнутым концом, причем по меньшей мере часть вектора имеет структуру внутримолекулярного дуплекса.

[0096] В данном документе термины «зкДНК-вектор» и «зкДНК» используются взаимозаменяемо и относятся к ДНК-вектору с замкнутыми концами, содержащему по меньшей мере один концевой палиндром. Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК содержит два ковалентно замкнутых конца.

[0097] В данном документе термин «нзДНК» или «никированная зкДНК» относится к ДНК с замкнутыми концами, содержащей одноцепочечный разрыв или пропуск размером 1-100 пар оснований в области «стебля» или спейсерной области, расположенной в 5'-направлении относительно открытой рамки считывания (например, промотора и трансгена, подлежащего экспрессии).

[0098] В данном документе термины «пропуск» и «одноцепочечный разрыв» используются взаимозаменяемо и относятся к прерванной части синтетического ДНК-вектора согласно настоящему изобретению, создавая участок части одноцепочечной ДНК в двухцепочечной в других местах зкДНК. Пропуск может иметь от 1 пары оснований до 100 пар оснований в длину в одной цепи дуплексной ДНК. Типичные пропуски, разработанные и созданные с применением способов, описанных в данном документе, и синтетические векторы, полученные с применением указанных способов, могут иметь, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 или 60 пар оснований в длину. Примерные пропуски в настоящем раскрытии могут иметь от 1 пары оснований до 10 пар оснований в длину, от 1 до 20 пар оснований в длину, от 1 до 30 пар оснований в длину.

[0099] Как определено в данном документе «репортеры» относятся к белкам, которые можно применять для обеспечения детектируемых показателей. Репортеры обычно производят измеряемый сигнал, такой как флуоресценция, цвет или люминесценция. Последовательности, кодирующие репортерные белки, кодируют белки, присутствие которых в клетке или в организме легко наблюдать. Например, флуоресцентные белки заставляют клетку флуоресцировать при возбуждении светом с конкретной длиной волны, люциферазы заставляют клетку катализировать реакцию, которая производит свет, а ферменты, такие как β -галактозидаза, преобразуют субстрат в окрашенный продукт. Примерные репортерные полипептиды, которые можно применять для экспериментальных или диагностических целей, включают, но не ограничиваются перечисленными, β -лактамазу, β -галактозидазу (LacZ), щелочную фосфатазу (AP), тимидинкиназу (TK), зеленый флуоресцентный белок (GFP) и другие флуоресцентные белки, хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), люциферазу и другие, хорошо известные в данной области техники.

[00100] В данном документе термины «смысловой» и «антисмысловой» относятся к ориентации структурного элемента на полинуклеотиде. Смысловой и антисмысловой варианты элемента обратно комплементарны друг другу.

[00101] В данном документе термин «синтетический ААВ-вектор» и «получение ААВ-вектора синтетическим путем» относится к ААВ-вектору и синтетическим способам его получения в полностью бесклеточной среде.

[00102] В данном документе «репортеры» относятся к белкам, которые можно применять для обеспечения детектируемых показателей. Репортеры обычно производят измеряемый сигнал, такой как флуоресценция, цвет или люминесценция.

Последовательности, кодирующие репортерные белки, кодируют белки, присутствие которых в клетке или в организме легко наблюдать. Например, флуоресцентные белки заставляют клетку флуоресцировать при возбуждении светом с конкретной длиной волны, люциферазы заставляют клетку катализировать реакцию, которая производит свет, а ферменты, такие как β -галактозидаза, преобразуют субстрат в окрашенный продукт. Примерные репортерные полипептиды, которые можно применять для экспериментальных или диагностических целей, включают, но не ограничиваются перечисленными, β -лактамазу, β -галактозидазу (LacZ), щелочную фосфатазу (AP), тимидинкиназу (TK), зеленый флуоресцентный белок (GFP) и другие флуоресцентные белки, хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), люциферазу и другие, хорошо известные в данной области техники.

[00103] В данном документе термин «эффекторный белок» относится к полипептиду, который обеспечивает детектируемый показатель, либо, например, как репортерный

полипептид, либо, более предпочтительно, как полипептид, уничтожающий клетку, например, токсин, или агент, придающий клетке чувствительность к уничтожению выбранным агентом или при его отсутствии. Эффекторные белки включают любой белок или пептид, который непосредственно нацелен на ДНК и/или РНК клетки-хозяина или повреждает их. Например, эффекторные белки могут включать, но не ограничиваются перечисленными, рестрикционную эндонуклеазу, которая нацелена на последовательность ДНК клетки-хозяина (будь то геномный или внехромосомный элемент), протеазу, которая расщепляет полипептид-мишень, необходимый для выживания клетки, ингибитор ДНК-гиразы и токсин рибонуклеазного типа. Согласно некоторым вариантам реализации экспрессия эффекторного белка, контролируемая синтетическим биологическим контуром, описанным в данном документе, может принимать участие в качестве фактора в другом синтетическом биологическом контуре, что расширяет диапазон и сложность восприимчивости системы биологического контура.

[00104] Транскрипционные регуляторы относятся к транскрипционным активаторам и репрессорам, которые либо активируют, либо репрессируют транскрипцию представляющего интерес гена, такого как РАН. Промоторы представляют собой области нуклеиновой кислоты, которые иницируют транскрипцию конкретного гена. Транскрипционные активаторы, как правило, связываются поблизости от транскрипционных промоторов и привлекают РНК-полимеразу для непосредственной инициации транскрипции. Репрессоры связываются с транскрипционными промоторами и стерически затрудняют инициацию транскрипции РНК-полимеразой. Другие транскрипционные регуляторы могут служить либо активаторами, либо репрессорами в зависимости от места их связывания и условий в клетке и в окружающей среде.

Неограничивающие примеры классов транскрипционных регуляторов включают, но не ограничиваются перечисленными, белки гомеодомена, белки с цинковыми пальцами, белки с мотивом «крылатая спираль» (белки Forkhead) и белки с лейциновой молнией.

[00105] В данном документе «репрессорный белок» или «индукторный белок» представляет собой белок, который связывается с элементом регуляторной последовательности и репрессирует или активирует, соответственно, транскрипцию последовательностей, функционально связанных с указанным элементом регуляторной последовательности. Предпочтительные репрессорные и индукторные белки, описанные в данном документе, чувствительны к присутствию или отсутствию по меньшей мере одного вносимого агента или фактора внешней среды. Предпочтительные белки, описанные в данном документе, являются модульными по форме и содержат, например, отделяемые ДНК-связывающие и связывающие вводимые агенты, или реагирующие на них, элементы или домены.

[00106] В данном документе термин «носитель» включает любые и все возможные растворители, дисперсионные среды, основы, покрытия, разбавители, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие абсорбцию агенты, буферы, растворы-носители, суспензии, коллоиды и т.п. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. В композиции также могут быть включены вспомогательные активные ингредиенты. Выражение «фармацевтически приемлемый» относится к молекулярным частицам и композициям, которые не приводят к токсической, аллергической или схожей нежелательной реакции при введении хозяину.

[00107] В данном документе термин «домен, реагирующий на вводимый агент» представляет собой домен транскрипционного фактора, который связывает или иначе

отвечает на условие или вводимый агент таким способом, который придает восприимчивость присоединенного к нему ДНК-связывающего слитого домена к наличию указанного условия или вводимого агента. Согласно одному варианту реализации наличие указанного условия или вводимого агента приводит к конформационному изменению в отвечающем на вводимый агент домене, или в белке, с которым он слит, которое модифицирует модулирующую транскрипцию активность транскрипционного фактора.

[00108] Термин «in vivo» относится к анализам или способам, которые реализуют на организме или в организме, таком как многоклеточное животное. Согласно некоторым аспектам, описанным в данном документе, считается, что способ или применение реализуют «in vivo», если используется одноклеточный организм, такой как бактерия. Термин «ex vivo» относится к способам и вариантам применения, которые выполняют с использованием живой клетки с интактной мембраной, находящейся вне организма многоклеточного животного или растения, например, эксплантатов, культивируемых клеток, включая первичные клетки и линии клеток, трансформированных линий клеток, а также экстрагированных тканей или клеток, включая клетки крови, помимо прочего. Термин «in vitro» относится к анализам и способам, которые не требуют присутствия клетки с интактной мембраной, например, клеточных экстрактов, и могут относиться к введению программируемого синтетического биологического контура в бесклеточной системе, такой как среда, не содержащая клеток или клеточных систем, таких как клеточные экстракты.

[00109] В данном документе термин «промотор» относится к любой последовательности нуклеиновой кислоты, которая регулирует экспрессию другой последовательности нуклеиновой кислоты за счет управления транскрипцией указанной последовательности нуклеиновой кислоты, которая может представлять собой гетерологичный целевой ген, кодирующий белок или РНК. Промоторы могут быть конститутивными, индуцируемыми, репрессируемыми, тканеспецифическими или могут представлять собой любую комбинацию перечисленных. Промотор представляет собой контрольную область последовательности нуклеиновой кислоты, в которой осуществляется контроль инициации и скорости транскрипции остальной части последовательности нуклеиновой кислоты. Промотор также может содержать генетические элементы, с которыми могут связываться регуляторные белки и молекулы, такие как РНК-полимераза и другие транскрипционные факторы. Согласно некоторым вариантам реализации аспектов, описанных в данном документе, промотор может управлять экспрессией транскрипционного фактора, который регулирует экспрессию самого промотора. В последовательности промотора может быть расположен сайт инициации транскрипции, а также связывающие белки домены, отвечающие за связывание РНК-полимеразы. Эукариотические промоторы часто, однако не всегда, будут содержать «ТАТА»-боксы и «САТ»-боксы. Различные промоторы, включая индуцируемые промоторы, могут применяться для управления экспрессией трансгенов в зкДНК-векторах, раскрытых в данном документе. Последовательность промотора может быть ограничена на ее 3'-конце сайтом инициации транскрипции и простирается в восходящем направлении (в 5'-направлении), включая минимальное количество оснований или элементов, необходимых для инициации транскрипции на уровнях, детектируемых выше фона.

[00110] В данном документе термин «энхансер» относится к цис-действующей регуляторной последовательности (например, 50-1500 пар оснований), которая связывает один или более белков (например, белки-активаторы или транскрипционный фактор)

для повышения транскрипционной активации последовательности нуклеиновой кислоты. Эхансеры могут быть расположены на расстоянии до 1000000 пар оснований выше сайта начала гена или ниже сайта начала гена, который они регулируют. Эхансер может быть расположен в пределах интронной области или в экзонной области

5 неродственного гена.

[00111] Можно сказать, что промотор управляет экспрессией или управляет транскрипцией последовательности нуклеиновой кислоты, которую он регулирует. Выражения «функционально связанный», «функционально расположенный», «с функциональной связью», «под контролем» и «под транскрипционным контролем»

10 указывают, что промотор находится в корректном функциональном положении и/или ориентации относительно последовательности нуклеиновой кислоты, которую он регулирует, для контроля инициации транскрипции и/или экспрессии указанной последовательности. В данном документе «инвертированный промотор» относится к промотору, в котором последовательность нуклеиновой кислоты располагается в

15 обратной ориентации так, что цепь, которая была смысловой, становится некодирующей цепью, и наоборот. Последовательности инвертированных промоторов могут применяться в различных вариантах реализации для регуляции состояния переключателя. Кроме того, согласно различным вариантам реализации промотор может применяться в сочетании с эхансером.

[00112] Промотор может представлять собой промотор, который в естественных условиях ассоциирован с геном или последовательностью, а также может быть получен путем выделения некодирующих 5'-последовательностей, расположенных в 5'-

20 направлении относительно кодирующего сегмента и/или экзона определенного гена или последовательности. Такой промотор может быть назван «эндогенным».

25 Аналогичным образом, согласно некоторым вариантам реализации, эхансер может представлять собой эхансер, который в естественных условиях ассоциирован с последовательностью нуклеиновой кислоты и расположен либо в 3', либо в 5'-направлении от указанной последовательности.

[00113] Согласно некоторым вариантам реализации кодирующий сегмент нуклеиновой

30 кислоты расположен под контролем «рекомбинантного промотора» или «гетерологичного промотора», оба указанных термина относятся к промотору, который обычно не ассоциирован с кодируемой последовательностью нуклеиновой кислоты, с которой промотор функционально связан, в ее естественной среде. Рекомбинантный или гетерологичный эхансер относится к эхансеру, обычно не ассоциированному с

35 конкретной последовательностью нуклеиновой кислоты в ее естественной среде. Такие промоторы или эхансеры могут включать промоторы или эхансеры других генов; промоторы или эхансеры, выделенные из любой другой прокариотической, вирусной или эукариотической клетки; и синтетические промоторы или эхансеры, которые не являются «природными», т. е. содержат различные элементы разных транскрипционных

40 регуляторных областей и/или изменяющие экспрессию мутации, введенные с применением способов генетического конструирования, известных в данной области техники. Наряду с получением последовательностей нуклеиновых кислот промоторов и эхансеров синтетическим путем, последовательности промоторов могут быть получены с использованием рекомбинантного клонирования и/или технологии

45 амплификации нуклеиновых кислот, включая ПЦР, применительно к синтетическим биологическим контурам и модулям, раскрытым в данном документе (см., например, патент США № 4683202, патент США № 5928906, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки). Кроме того, также предусмотрена возможность

применения контрольных последовательностей, которые управляют транскрипцией и/или экспрессией последовательностей в неядерных органеллах, таких как митохондрии, хлоропласты и т.п.

[00114] Как описано в данном документе, «индуцируемый промотор» представляет собой промотор, который характеризуется инициацией или усилением транскрипционной активности в присутствии, под влиянием или при контакте с индуктором или индуцирующим агентом. «Индуктор» или «индуцирующий агент», как определено в данном документе, может быть эндогенным или обычно является экзогенным соединением или белком, которые вводят таким образом, чтобы обеспечить их активность по индукции транскрипционной активности индуцируемого промотора. Согласно некоторым вариантам реализации индуктор или индуцирующий агент, т. е. химическое вещество, соединение или белок, сам может быть получен в результате транскрипции или экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты (т. е. индуктор может представлять собой индукторный белок, экспрессируемый другим компонентом или модулем), который сам может находиться под контролем индуцируемого промотора. Согласно некоторым вариантам реализации индуцируемый промотор индуцируется в отсутствие определенных агентов, таких как репрессор. Примеры индуцируемых промоторов включают, но не ограничиваются перечисленными, чувствительные к тетрациклину, металлотионину, экдизону промоторы, промоторы вирусов млекопитающих (например, поздний промотор аденовируса; и промотор длинного концевой повтора вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV-LTR)) и другие чувствительные к стероидам промоторы, чувствительные к рапамицину промоторы и т.п.

[00115] Термины «регуляторные последовательности ДНК», «контрольные элементы» и «регуляторные элементы», используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к транскрипционным и трансляционным контрольным последовательностям, таким как промоторы, энхансеры, сигналы полиаденилирования, терминаторы, сигналы разрушения белка и т.п., которые обеспечивают и/или регулируют транскрипцию некодирующей последовательности (например, нацеливающей на ДНК РНК) или кодирующей последовательности (например, сайт-направленного модифицирующего полипептида или полипептида Cas9/Csn1) и/или регулируют трансляцию кодируемого полипептида.

[00116] «Функционально связанный» относится к размещению в непосредственной близости, при котором описываемые так компоненты находятся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать предусмотренным для них образом. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если указанный промотор влияет на ее транскрипцию или экспрессию. «Экспрессионная кассета» включает гетерологичную последовательность ДНК, которая функционально связана с промотором или другой регуляторной последовательностью, достаточными для управления транскрипцией трансгена в зкДНК-векторе. Подходящие промоторы включают, например, тканеспецифические промоторы. Промоторы также могут происходить из ААВ.

[00117] В данном документе термин «субъект» относится к человеку или животному, которому предоставляют лечение, включая профилактическое лечение, с применением зкДНК-вектора в соответствии с настоящим изобретением. Обычно животное представляет собой позвоночное животное, такое как, но не ограничиваясь перечисленными, примат, грызун, домашнее животное или промысловое животное. Приматы включают, но не ограничиваются перечисленными, шимпанзе, яванских

макак, коат и макак, например, макак-резусов. Грызуны включают мышей, крыс, сурков, хорьков, кроликов и хомяков. Домашние и промысловые животные включают, но не ограничиваются перечисленными, коров, лошадей, свиней, оленей, бизона, буйвола, виды кошачьих, например, домашнюю кошку, виды собачьих, например, собаку, лису, волка, виды птиц, например, курицу, эму, страуса, и рыб, например, форель, сома и лосося. В определенных вариантах реализации аспектов, описанных в данном документе, субъект представляет собой млекопитающее, например, примата или человека. Субъект может быть мужского или женского пола. Кроме того, субъект может быть младенцем или ребенком. Согласно некоторым вариантам реализации субъект может представлять собой новорожденного или нерожденного субъекта, например, субъекта *in utero*. Предпочтительно субъект представляет собой млекопитающее. Млекопитающее может представлять собой человека, не являющегося человеком примата, мышь, крысу, собаку, кошку, лошадь или корову, однако указанные примеры не являются ограничивающими. Млекопитающие, отличные от человека, могут быть предпочтительно использованы в качестве субъектов в моделях заболеваний и нарушений на животных. Кроме того, способы и композиции, описанные в данном документе, могут быть использованы для одомашненных животных и/или животных-компаньонов. Человек-субъект может быть любого возраста, пола, расы или этнической группы, например, может быть европеоидом (белым), азиатом, африканцем, черным, афроамериканцем, афроевропейцем, испаноамериканцем, представителем ближневосточного этноса и т. д. Согласно некоторым вариантам реализации субъект может представлять собой пациента или другого субъекта в клинических условиях. Согласно некоторым вариантам реализации субъект уже проходит курс лечения. Согласно некоторым вариантам реализации субъект представляет собой эмбрион, плод, новорожденного, младенца, ребенка, подростка или взрослую особь. Согласно некоторым вариантам реализации субъект представляет собой плод человека, новорожденного человека, младенца-человека, ребенка-человека, подростка-человека или взрослого человека. Согласно некоторым вариантам реализации субъект представляет собой эмбрион животного или эмбрион, не принадлежащий человеку, или эмбрион примата, не являющегося человеком. Согласно некоторым вариантам реализации субъект представляет собой эмбрион человека.

[00118] В данном документе термин «клетка-хозяин» включает любой тип клеток, которые являются восприимчивыми к трансформации, трансфекции, трансдукции и т.п. с использованием конструкции нуклеиновой кислоты или зкДНК-вектора для экспрессии согласно настоящему изобретению. В качестве неограничивающих примеров, клетка-хозяин может представлять собой выделенную первичную клетку, плюрипотентные стволовые клетки, CD34⁺ клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки или любую из ряда иммортализованных клеточных линий (например, клетки HerG2). В качестве альтернативы, клетка-хозяин может представлять собой клетку *in situ* или *in vivo* в ткани, органе или организме.

[00119] Термин «экзогенный» относится к веществу, присутствующему в клетке, отличной от его природного источника. В данном документе термин «экзогенный» может относиться к нуклеиновой кислоте (например, нуклеиновой кислоте, кодирующей полипептид) или к полипептиду, которые были введены посредством процесса, включающего действия человека, в биологическую систему, такую как клетка или организм, в которой они обычно не обнаруживаются, и введение нуклеиновой кислоты или полипептида в такую клетку или организм является желательным. В качестве альтернативы, «экзогенный» может относиться к нуклеиновой кислоте или полипептиду,

которые были введены посредством процесса, включающего действия человека, в биологическую систему, такую как клетка или организм, в которой они обнаруживаются в относительно низких количествах, и увеличение количества нуклеиновой кислоты или полипептида в клетке или организме является желательным, например, для

5 получения эктопической экспрессии или уровней. В отличие от этого термин «эндогенный» относится к веществу, которое является нативным для биологической системы или клетки.

[00120] Термин «идентичность последовательности» относится к сродству между двумя нуклеотидными последовательностями. Для целей настоящего раскрытия степень

10 идентичности последовательностей между двумя дезоксирибонуклеотидными последовательностями определяется с использованием алгоритма Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, 1970, выше), реализованного в программе Needle пакета EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, выше), предпочтительно, версии 3.0.0 или более поздней. Используемые необязательные

15 параметры представляют собой штраф за открытие пропуска 10, штраф за продление пропуска 0,5 и матрицу замены EDNAFULL (версия EMBOSS NCBI NUC4.4). Выходной показатель Needle, называемый «наибольшей длиной идентичного фрагмента» (полученный с применением опции «-nobrief») используют в качестве процента идентичности и вычисляют следующим образом: (Идентичные дезоксирибонуклеотиды

20 $\times 100$)/(Длина выравнивания - Общее число пропусков в выравнивании). Длина выравнивания составляет предпочтительно по меньшей мере 10 нуклеотидов, предпочтительно по меньшей мере 25 нуклеотидов, более предпочтительно по меньшей мере 50 нуклеотидов и наиболее предпочтительно по меньшей мере 100 нуклеотидов.

[00121] В данном документе термин «гомология» или «гомологичный» определяется

25 как процент нуклеотидных остатков, которые идентичны нуклеотидным остаткам в соответствующей последовательности на хромосоме-мишени после выравнивания последовательностей и введения пробелов, при необходимости, для достижения максимального процента идентичности последовательностей. Выравнивание с целью определения процента гомологии нуклеотидной последовательности может быть

30 достигнуто различными путями, известными в данной области техники, например, с применением общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN, ClustalW2 или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для

35 достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Согласно некоторым вариантам реализации последовательность нуклеиновой кислоты (например, последовательность ДНК), например, гомологичное плечо, считается «гомологичной», когда последовательность 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

40 меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или более идентична соответствующей нативной или неотредактированной последовательности нуклеиновой кислоты (например, геномной последовательности) клетки-хозяина.

[00122] В данном документе термин «гетерологичный» означает нуклеотидную или полипептидную последовательность, которая не обнаружена в нативной нуклеиновой кислоте или белке, соответственно. Гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты может быть связана с природной последовательностью нуклеиновой кислоты

(или ее вариантом) (например, путем генетического конструирования) с получением химерной нуклеотидной последовательности, кодирующей химерный полипептид. Гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты может быть соединена с вариантом полипептида (например, путем генетического конструирования) с получением нуклеотидной последовательности, кодирующей слитый вариант полипептида.

[00123] «Вектор» или «экспрессионный вектор» представляет собой репликон, такой как плазида, бакмида, фаг, вирус, вирион или космида, к которому может быть присоединен другой сегмент ДНК, т. е. «вставка», чтобы вызвать репликацию присоединенного сегмента в клетке. Вектор может представлять собой конструкцию нуклеиновой кислоты, разработанную для доставки в клетку-хозяина или для переноса между разными клетками-хозяевами. В данном документе вектор может быть вирусным или невирусным по происхождению и/или в конечной форме, однако для цели настоящего раскрытия «вектор» обычно относится к зкДНК-вектору в соответствии с использованием этого термина в данном документе. Термин «вектор» включает любой генетический элемент, который способен к репликации, когда он ассоциирован с надлежащими контрольными элементами, и который может переносить генные последовательности в клетки. Согласно некоторым вариантам реализации вектор может представлять собой экспрессионный вектор или рекомбинантный вектор.

[00124] В данном документе термин «экспрессионный вектор» относится к вектору, который управляет экспрессией РНК или полипептида с последовательностей, связанных с транскрипционными регуляторными последовательностями на векторе.

Экспрессируемые последовательности часто, но не обязательно, будут гетерологичными по отношению к клетке. Экспрессионный вектор может содержать дополнительные элементы, например, экспрессионный вектор может иметь две системы репликации, что позволяет поддерживать его в двух организмах, например, в клетках человека для экспрессии и в прокариотическом хозяине для клонирования и амплификации. Термин «экспрессия» относится к клеточным процессам, участвующим в продуцировании РНК и белков и, в соответствующих случаях, в секретировании белков, включая, где это применимо, но не ограничиваясь этим, например, транскрипцию, процессинг транскрипта, трансляцию и укладку, модификацию и процессинг белка. «Продукты экспрессии» включают РНК, транскрибированную с гена, и полипептиды, полученные путем трансляции мРНК, транскрибированной с гена. Термин «ген» означает последовательность нуклеиновой кислоты, которая транскрибируется (ДНК) в РНК *in vitro* или *in vivo*, когда она функционально связана с соответствующими регуляторными последовательностями. Ген может включать, но не обязательно, области, предшествующие кодирующей области и следующие за ней, например, 5'-нетранслируемые (5'-UTR) или «лидерные» последовательности и 3'-UTR или «трейлерные» последовательности, а также промежуточные последовательности (интроны) между отдельными кодирующими сегментами (экзонами).

[00125] Под «рекомбинантным вектором» подразумевается вектор, который включает гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты или «трансген», который способен к экспрессии *in vivo*. Следует понимать, что векторы, описанные в данном документе, в некоторых вариантах реализации, можно комбинировать с другими подходящими композициями и видами терапии. Согласно некоторым вариантам реализации вектор является эписомальным. Применение подходящего эписомального вектора обеспечивает средство поддержания представляющего интерес нуклеотида у субъекта в многокопийной внехромосомной ДНК, что устраняет потенциальные эффекты интеграции в хромосому.

[00126] В данном документе выражение «генетическое заболевание» относится к заболеванию, частично или полностью, прямо или опосредованно, вызванному одной или более аномалиями в геноме, в частности, к состоянию, присутствующему с момента рождения. Аномалия может представлять собой мутацию, вставку или делецию.

5 Аномалия может влиять на кодирующую последовательность гена или его регуляторную последовательность. Генетическое заболевание может представлять собой, но не ограничивается перечисленными, ФКУ, мышечную дистрофию Дюшенна (МДД), гемофилию, муковисцидоз, хорею Хантингтона, семейную гиперхолестеринемию (дефект рецептора ЛПНП), гепатобластому, болезнь Вильсона, врожденную печеночную порфирию, наследственные нарушения метаболизма печени, синдром Леша-Нихана, 10 серповидноклеточную анемию, талассемии, пигментную ксеродерму, анемию Фанкони, пигментный ретинит, атаксию-телеангиэктазию, синдром Блума, ретинобластому и болезнь Тея-Сакса.

[00127] В данном документе термин «ингибирующий полинуклеотид» относится к 15 молекуле ДНК или РНК, которая уменьшает или предотвращает экспрессию (транскрипцию или трансляцию) второго (целевого) полинуклеотида. Ингибирующие полинуклеотиды включают антисмысловые полинуклеотиды, рибозимы и внешние направляющие последовательности. Термин «ингибирующий полинуклеотид» дополнительно включает молекулы ДНК и РНК, например, РНКи, которые кодируют 20 существующие ингибирующие молекулы, такие как молекулы ДНК, которые кодируют рибозимы.

[00128] В данном документе «подавление гена» или «подавленный ген» в отношении активности молекулы РНКи, например, киРНК или миРНК, относится к снижению в клетке уровня мРНК гена-мишени.

25 [00129] В данном документе термин «РНКи» относится к любому типу интерферирующей РНК, включая, но не ограничиваясь перечисленными, киРНКи, кшРНКи, эндогенную микроРНК и искусственную микроРНК. Например, он включает последовательности, ранее идентифицированные как киРНК, независимо от механизма последующего процессинга РНК (т. е., несмотря на то, что киРНК, как полагают, имеют 30 специфичный способ процессинга *in vivo*, приводящий к расщеплению мРНК, такие последовательности могут быть включены в векторы между фланкирующими последовательностями, описанными в данном документе). Термин «РНКи» может включать как молекулы РНКи, подавляющие ген, так и эффекторные молекулы РНКи, которые активируют экспрессию гена. Только в качестве примера, согласно некоторым 35 вариантам реализации агенты РНКи, которые служат для ингибирования или подавления гена, можно применять в способах, наборах и композициях, раскрытых в данном документе, например, для ингибирования иммунного ответа (например, врожденного иммунного ответа).

[00130] В данном документе термин «содержащий» или «содержит» используется в 40 отношении композиций, способов и их соответствующего компонента (компонентов), существенных для указанного способа или композиции, но допускающих включение не указанных элементов, будь то существенных или нет.

[00131] В данном документе термин «состоящий по существу из» относится к 45 элементам, необходимым для конкретного варианта реализации. Термин допускает наличие элементов, которые не влияют существенным образом на основную и новую или функциональную характеристику (характеристики) указанного варианта реализации. Использование термина «содержащий» указывает на включение, а не на ограничение.

[00132] Термин «состоящий из» относится к композициям, способам и их

соответствующим компонентам, описанным в данном документе, которые не включают никаких элементов, не перечисленных в указанном описании варианта реализации.

5 [00133] В данном документе термин «состоящий по существу из» относится к элементам, необходимым для конкретного варианта реализации. Термин допускает наличие дополнительных элементов, которые не оказывают существенного влияния на основную и новую или функциональную характеристику (характеристики) указанного варианта реализации настоящего изобретения.

10 [00134] В настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения термины в единственном числе (соотв. «a», «an» и «the» в исходном тексте на английском языке) включают их эквиваленты во множественном числе, если иное явным образом не следует из контекста. Соответственно, например, ссылка на «способ» включает один или более способов и/или этапов типа, описанного в данном документе, и/или таких, которые будут понятны специалистам в данной области техники после прочтения настоящего раскрытия, и т.п. Аналогичным образом, предусмотрено, что термин «или» включает 15 «и», если из контекста явным образом не следует иное. Несмотря на то, что при практической реализации или тестировании настоящего раскрытия могут применяться способы и материалы, сходные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, ниже описаны подходящие способы и материалы. В данном документе «например» (сокращение «e.g.» в исходном тексте на английском языке, произошедшее 20 от латинского выражения «exempli gratia») указывает на неограничивающий пример. Соответственно, «например» синонимично термину «к примеру».

[00135] Группы альтернативных элементов или вариантов реализации настоящего изобретения, раскрытых в данном документе, не должны рассматриваться как 25 ограничения. На каждый член группы можно сослаться и заявлять его индивидуально или в любой комбинации с другими членами группы или другими элементами, представленными в данном документе. Один или более членов группы могут быть включены или исключены из группы по соображениям удобства и/или патентоспособности. При любом таком включении или исключении в данном документе 30 считается, что описание изобретения содержит группу, измененную таким образом, чтобы она удовлетворяла условию письменного описания всех групп Маркуша, используемых в прилагаемой формуле изобретения.

[00136] Согласно некоторым вариантам реализации любого из аспектов раскрытие, описанное в данном документе, не касается способа клонирования людей, способов модификации генетической идентичности зародышевой линии человека, вариантов 35 применения эмбрионов человека в промышленных или коммерческих целях, или способов модификации генетической идентичности животных, которые могут причинить им страдания без какой-либо существенной медицинской пользы для человека или животного, а также животных, полученных с помощью таких способов.

40 [00137] Определения других терминов приведены в данном документе в описании различных аспектов настоящего изобретения.

[00138] Все патенты и другие публикации; включая литературные ссылки, выданные патенты, опубликованные заявки на патент и заявки на патент, находящиеся на рассмотрении одновременно с настоящей заявкой; упомянутые в настоящем описании, явным образом включены в данный документ посредством ссылки с целью описания 45 и раскрытия, например, методологий, описанных в таких публикациях, которые могут быть использованы в связи с технологией, описанной в данном документе. Эти публикации представлены исключительно по причине их раскрытия до даты подачи настоящей заявки. Ничто в этом отношении не должно истолковываться как признание

того, что авторы изобретения не обладают правами на более раннее изобретение по отношению к такому раскрытию в силу предшествующего изобретения или по любой другой причине. Все утверждения, касающиеся дат, или представления относительно содержания этих документов основаны на информации, доступной заявителям, и не являются допущением каким-либо образом признания правильности дат или содержания этих документов.

[00139] Описание вариантов реализации настоящего раскрытия не должно рассматриваться как исчерпывающее или ограничивающее настоящее раскрытие точной раскрытой формой. Несмотря на то, что в данном документе в иллюстративных целях описаны конкретные варианты реализации и примеры раскрытия, возможны различные эквивалентные модификации в пределах объема раскрытия, как будет понятно специалистам в соответствующей области техники. Например, хотя этапы или функции способа представлены в указанном порядке, согласно альтернативным вариантам реализации функции могут выполняться в другом порядке, или функции могут выполняться по существу одновременно. Принципиальные положения настоящего раскрытия, предоставленные в данном документе, могут быть применены к другим процедурам или способам в зависимости от ситуации. Различные варианты реализации, описанные в данном документе, могут быть объединены для обеспечения дополнительных вариантов реализации. Аспекты настоящего раскрытия могут быть модифицированы, при необходимости, для применения композиций, функций и концепций вышеупомянутых ссылок и приложения для обеспечения дополнительных вариантов реализации настоящего раскрытия. Кроме того, из соображений биологической функциональной эквивалентности могут быть сделаны некоторые изменения в структуре белка, не влияющие на биологическое или химическое действие в качественном или количественном отношении. Эти и другие изменения могут быть выполнены в раскрытии в свете подробного описания. Все такие модификации предусмотрены, как включенные в объем прилагаемой формулы изобретения.

[00140] Конкретные элементы любого из вышеприведенных вариантов реализации могут быть объединены или заменены элементами других вариантов реализации. Кроме того, хотя преимущества, ассоциированные с некоторыми вариантами реализации настоящего раскрытия, были описаны в контексте этих вариантов реализации, другие варианты реализации также могут демонстрировать такие преимущества, и не все варианты реализации должны обязательно демонстрировать такие преимущества, чтобы попадать в объем раскрытия.

[00141] Описанная в данном документе технология дополнительно иллюстрируется следующими примерами, которые никоим образом не следует истолковывать как дополнительные ограничения. Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретной методологией, протоколами и реагентами, и т. д., описанными в данном документе, и поэтому допускает варианты. Терминология, используемая в данном документе, предназначена исключительно для описания конкретных вариантов реализации и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который определен исключительно формулой изобретения.

I. Экспрессия белка РАН с ДНК-вектора с замкнутыми концами (зкДНК)

[00142] Технология, описанная в данном документе, в целом направлена на экспрессию и/или продукцию белка РАН в клетке с невирусного ДНК-вектора, например, зкДНК-вектора, описанного в данном документе. ЗкДНК-векторы для экспрессии белка РАН описаны в данном документе в разделе, озаглавленном «зкДНК-векторы в целом». В частности, зкДНК-векторы для экспрессии белка РАН содержат пару ITR

(например, симметричных или асимметричных, как описано в данном документе), а между парой ITR содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую белок РАН, как описано в данном документе, функционально связанную с промотором или регуляторной последовательностью. Отличительным преимуществом зкДНК-векторов для экспрессии белка РАН по сравнению с обычными ААВ-векторами и даже лентивирусными векторами является отсутствие ограничения по размеру для гетерологичных последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих целевой белок. Таким образом, даже полноразмерный белок РАН размером 6,8 тыс. п. о. может быть экспрессирован с одного зкДНК-вектора. Таким образом, зкДНК-векторы, описанные в данном документе, можно применять для экспрессии терапевтического белка РАН у субъекта, нуждающегося в этом, например, субъекта, страдающего ФКУ.

[00143] Как будет понятно, технологии зкДНК-векторов, описанные в данном документе, могут быть адаптированы к любому уровню сложности или могут применяться модульно, причем экспрессия различных компонентов белка РАН может контролироваться независимо. Например, конкретно предусмотрено, что технологии зкДНК-векторов, разработанные в данном документе, могут быть простыми, как применение одного зкДНК-вектора для экспрессии одной гетерологичной генной последовательности (например, белка РАН), или могут быть сложными, как применение нескольких зкДНК-векторов, когда каждый вектор экспрессирует несколько белков РАН или ассоциированных кофакторов, или вспомогательных белков, каждый из которых независимо контролируется разными промоторами. Варианты реализации ниже конкретно предусмотрены в данном документе и могут быть адаптированы специалистом в данной области техники при необходимости.

[00144] Согласно одному варианту реализации один зкДНК-вектор можно применять для экспрессии одного компонента белка РАН. В качестве альтернативы, один зкДНК-вектор можно применять для экспрессии нескольких компонентов (например, по меньшей мере 2) белка РАН под контролем одного промотора (например, сильного промотора), необязательно с использованием последовательности (ей) IRES, чтобы обеспечить надлежащую экспрессию каждого из компонентов, например, кофакторов или вспомогательных белков.

[00145] В данном документе также предусмотрен, в другом варианте реализации, один зкДНК-вектор, содержащий по меньшей мере две вставки (например, экспрессирующие тяжелую цепь или легкую цепь), причем экспрессия каждой вставки находится под контролем ее собственного промотора. Промоторы могут включать несколько копий одного и того же промотора, несколько разных промоторов или любую их комбинацию. Специалист в данной области техники поймет, что желательной часто является экспрессия компонентов белка РАН на разных уровнях экспрессии, что позволяет контролировать стехиометрию отдельных экспрессируемых компонентов для обеспечения эффективного укладывания и комбинирования белка РАН в клетке.

[00146] Специалист в данной области техники может предусмотреть дополнительные варианты технологий зкДНК-векторов или адаптировать их из методов получения белка с использованием стандартных векторов.

А. Нуклеиновые кислоты

[00147] В данном документе предложена характеристика и разработка молекул нуклеиновых кислот для потенциального терапевтического применения. В соответствии с некоторыми вариантами реализации нуклеиновые кислоты для терапевтического применения кодируют белок РАН. Согласно некоторым вариантам реализации в соответствующих случаях описана химическая модификация олигонуклеотидов с целью

изменения и улучшения свойств *in vivo* (доставки, стабильности, времени жизни, укладки, специфичности в отношении мишени), а также их биологической функции и механизма, которые напрямую коррелируют с терапевтическим применением.

5 [00148] Иллюстративные терапевтические нуклеиновые кислоты согласно настоящему раскрытию, которые могут быть иммуностимулирующими и требуют применения
иммуносупрессоров, раскрытых в данном документе, могут включать, но не
ограничиваются перечисленными, минигены, плазмиды, миникольца, короткую
интерферирующую РНК (киРНК), микроРНК (миРНК), антисмысловые
10 олигонуклеотиды (ASO), рибозимы, двухцепочечную ДНК с замкнутыми концами
(например, зкДНК, CELiD, линейную ковалентно замкнутую ДНК («с минимальной
цепью»), doggybone (dbDNA™), протеломерную ДНК с замкнутыми концами или
гантелеобразную линейную ДНК), дцРНК-субстрат Dicer, короткую шпилечную РНК
(кшРНК), асимметричную интерферирующую РНК (аиРНК), микроРНК (миРНК),
мРНК, тРНК, рРНК и вирусные ДНК-векторы, вирусный РНК-вектор; и любую их
15 комбинацию.

[00149] киРНК или миРНК, которые могут отрицательно регулировать
внутриклеточные уровни конкретных белков посредством процесса, называемого РНК-
интерференцией (РНКи), также предусмотрены настоящим изобретением в качестве
терапевтических средств на основе нуклеиновых кислот. После введения киРНК или
20 миРНК в цитоплазму клетки-хозяина указанные конструкции двухцепочечной РНК
связываются с белком, называемым RISC. Комплекс RISC удаляет смысловую цепь
киРНК или миРНК. Комплекс RISC в комбинации с комплементарной мРНК расщепляет
мРНК и высвобождает разрезанные цепи. РНКи осуществляется путем индукции
специфичного разрушения мРНК, что приводит к отрицательной регуляции
25 соответствующего белка.

[00150] Антисмысловые олигонуклеотиды (ASO) и рибозимы, которые ингибируют
трансляцию мРНК в белок, могут представлять собой терапевтические средства на
основе нуклеиновых кислот. В случае антисмысловых конструкций указанные
одноцепочечные дезоксирибонуклеиновые кислоты имеют последовательность,
30 комплементарную последовательности мРНК целевого белка, и способны связываться
с мРНК посредством спаривания оснований по Уотсону-Крику. Такое связывание
предотвращает трансляцию целевой мРНК и/или запускает разрушение транскрипта
мРНК РНКазой H. В результате антисмысловой олигонуклеотид имеет повышенную
специфичность действия (т. е. отрицательную регуляцию специфического белка,
35 связанного с заболеванием).

[00151] Согласно любому из способов, предложенных в данном документе,
терапевтическая нуклеиновая кислота может представлять собой терапевтическую
РНК. Терапевтическая РНК может представлять собой ингибитор трансляции мРНК,
агент РНК-интерференции (РНКи), каталитически активную молекулу РНК (рибозим),
40 транспортную РНК (тРНК) или РНК, которая связывает транскрипт мРНК (ASO),
белок или другой молекулярный лиганд (аптамер). Согласно любому из способов,
предложенных в данном документе, агент РНКи может представлять собой
двухцепочечную РНК, одноцепочечную РНК, микроРНК, короткую интерферирующую
РНК, короткую шпилечную РНК или образующий триплекс олигонуклеотид.

45 [00152] В соответствии с некоторыми вариантами реализации терапевтическая
нуклеиновая кислота представляет собой двухцепочечную ДНК с замкнутыми концами,
например, зкДНК. В соответствии с некоторыми вариантами реализации экспрессия
и/или продукция терапевтического белка в клетке происходит с невирусного ДНК-

вектора, например, зкДНК-вектора. Отличительным преимуществом зкДНК-векторов для экспрессии терапевтического белка по сравнению с обычными ААВ-векторами и даже лентивирусными векторами является отсутствие ограничения по размеру для гетерологичных последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих целевой белок. Таким образом, даже большой терапевтический белок может быть экспрессирован с одного зкДНК-вектора. Таким образом, зкДНК-векторы можно применять для экспрессии терапевтического белка у субъекта, нуждающегося в этом.

[00153] В общем случае зкДНК-вектор для экспрессии терапевтического белка, раскрытый в данном документе, содержит, в направлении от 5' к 3': первый инвертированный концевой повтор (ITR) аденоассоциированного вируса (ААВ), нуклеотидную последовательность, представляющую интерес (например, экспрессионную кассету, описанную в данном документе), и второй ITR ААВ. Последовательности ITR выбирают из любых из: (i) по меньшей мере одного WT-ITR и по меньшей мере одного модифицированного инвертированного концевого повтора (mod-ITR) ААВ (например, асимметричных модифицированных ITR); (ii) двух модифицированных ITR, причем пара mod-ITR имеет различную трехмерную пространственную организацию по отношению друг к другу (например, асимметричные модифицированные ITR), или (iii) пары симметричных или по существу симметричных WT-WT-ITR, причем каждый WT-ITR имеет одинаковую трехмерную пространственную организацию, или (iv) пары симметричных или по существу симметричных модифицированных ITR, причем каждый mod-ITR имеет одинаковую трехмерную пространственную организацию.

[00154] Согласно некоторым вариантам реализации трансген, кодирующий белок РАН, также кодирует секреторную последовательность так, что белок РАН направляется в аппарат Гольджи и эндоплазматический ретикулум (ЭР), где будет происходить укладка белка РАН в правильную конформацию молекулами-шаперонами при его прохождении через ЭР и высвобождении из клетки. Примерные секреторные последовательности включают, но не ограничиваются перечисленными, VH-02 (SEQ ID NO: 88) и VK-A26 (SEQ ID NO: 89) и сигнальную последовательность Igk (SEQ ID NO: 126), а также секреторный сигнал Gluc, обеспечивающий секрецию меченого белка из цитозоля (SEQ ID NO: 188), секреторную последовательность TMD-ST, которая направляет меченый белок в аппарат Гольджи (SEQ ID NO: 189).

[00155] Регуляторные переключатели также можно использовать для точной настройки экспрессии белка РАН так, что белок РАН экспрессируется предусмотренным образом, включая, но не ограничиваясь этим, экспрессию белка РАН на целевом уровне экспрессии или в целевом количестве, или, в качестве альтернативы, в присутствии или в отсутствие конкретного сигнала, включая событие клеточной передачи сигнала. Например, как описано в данном документе, экспрессия белка РАН с зкДНК-вектора может быть включена или выключена при возникновении конкретного состояния, как описано в разделе данного документа, озаглавленном «Регуляторные переключатели».

[00156] Например, и только в целях иллюстрации, белки РАН можно применять для выключения нежелательной реакции, такой как слишком высокий уровень продукции белка РАН. Ген РАН может содержать сигнальный пептидный маркер для доставки белка РАН в целевую клетку. Однако в любой ситуации может быть желательно регулировать экспрессию белка РАН. ЗкДНК-векторы легко приспособляются к использованию регуляторных переключателей.

[00157] Отличительным преимуществом зкДНК-векторов по сравнению с обычными ААВ-векторами и даже лентивирусными векторами является отсутствие ограничения

по размеру для гетерологичных последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих белок РАН. Таким образом, даже полноразмерный РАН, а также необязательно любые кофакторы или вспомогательные белки могут быть экспрессированы с одного зкДНК-вектора. Кроме того, в зависимости от необходимой стехиометрии можно
 5 экспрессировать несколько сегментов одного и того же белка РАН и можно использовать один и тот же или разные промоторы, а также можно использовать регуляторные переключатели для точной настройки экспрессии каждой области. Например, как показано в Примерах, можно применять зкДНК-вектор, который содержит двойную промоторную систему, так, что для каждого домена белка РАН используется разный
 10 промотор. Применение зкДНК-плазмиды для получения белка РАН может включать уникальную комбинацию промоторов для экспрессии доменов белка РАН, что приводит к правильному соотношению каждого домена для образования функционального белка РАН. Соответственно, в некоторых вариантах реализации, зкДНК-вектор можно применять для экспрессии различных областей белка РАН по отдельности (например,
 15 под контролем другого промотора).

[0015] Согласно другому варианту реализации белок РАН, экспрессируемый с зкДНК-векторов, дополнительно содержит дополнительную функциональную возможность, такую как флуоресценция, ферментативная активность, сигнал секреции или активатор иммунных клеток.

[00159] Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК, кодирующая белок РАН, может дополнительно содержать линкерный домен, например. В данном документе «линкерный домен» относится к олиго- или полипептидной области от примерно 2 до 100 аминокислот в длину, которая связывает любые домены/области белка РАН,
 20 описанного в данном документе. Согласно некоторым вариантам реализации линкеры могут включать или могут состоять из гибких остатков, таких как глицин и серин, так, что смежные белковые домены могут свободно перемещаться относительно друг друга. Более длинные линкеры могут использоваться, когда желательно гарантировать, что два смежных домена не будут стерически мешать друг другу. Линкеры могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми. Примеры расщепляемых линкеров включают
 25 линкеры 2А (например, Т2А), 2А-подобные линкеры или их функциональные эквиваленты и их комбинации. Линкер может представлять собой линкерную область Т2А, происходящую из вируса *Thosea asigna*.

[00160] Специалист в данной области техники может взять известную и/или общедоступную последовательность белка, например, РАН и т. д., и выполнить обратное
 35 конструирование последовательности кДНК для кодирования такого белка. Затем кДНК может быть оптимизирована по кодонам, чтобы соответствовать предусмотренной клетке-хозяину, и вставлена в зкДНК-вектор, как описано в данном документе.

В. зкДНК-векторы, экспрессирующие белок РАН

[00161] зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, имеющий одну или более последовательностей, кодирующих целевой РАН, может содержать регуляторные последовательности, такие как промоторы, сигналы секреции, области поли(А) и энхансеры. По меньшей мере, зкДНК-вектор содержит одну или более гетерологичных последовательностей, кодирующих белок РАН.

[00162] Для достижения высокоэффективной и точной сборки белка РАН в некоторых вариантах реализации конкретно предусмотрено, что белок РАН содержит лидерную последовательность для эндоплазматического ретикулума (ЭР) для направления его в ЭР, где происходит укладка белка. Например, последовательность, которая направляет

экспрессированный белок (белки) в ЭР для укладки.

[00163] Согласно некоторым вариантам реализации сигнал клеточной или внеклеточной локализации (например, секреторный сигнал, сигнал ядерной локализации, сигнал митохондриальной локализации и т. д.) содержится в зкДНК-векторе, чтобы направлять секрецию или целевую субклеточную локализацию РАН так, что белок РАН может связываться с внутриклеточной мишенью (мишенями) (например, внутри тела) или внеклеточной мишенью (мишенями).

[00164] Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, описанный в данном документе, обеспечивает сборку и экспрессию любого целевого белка РАН модульным способом. В данном документе термин «модульный» относится к элементам в зкДНК-экспрессирующей плазмиде, которые можно легко удалить из конструкции. Например, модульные элементы в зкДНК-генерирующей плазмиде, содержат уникальные пары сайтов рестрикции, фланкирующие каждый элемент в конструкции, что обеспечивает исключительное манипулирование отдельными элементами (см., например, ФИГ. 1А-1G). Таким образом, платформа зкДНК-вектора может обеспечивать экспрессию и сборку любой целевой конфигурации белка РАН. В данном документе в различных вариантах реализации предложены плазмидные зкДНК-векторы, которые могут уменьшить и/или минимизировать количество манипуляций, необходимых для сборки целевого зкДНК-вектора, кодирующего белок РАН.

С. Примерные белки РАН, экспрессируемые зкДНК-векторами

[00165] В частности, зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, может кодировать, например, но не ограничиваясь перечисленными, белки РАН, а также их варианты и/или активные фрагменты для применения в лечении, профилактике и/или облегчении одного или более симптомов фенилкетонурии (ФКУ). В одном аспекте фенилкетонурия (ФКУ) представляет собой фенилкетонурию человека (ФКУ).

(i) Терапевтические белки РАН и их фрагменты

[00166] По существу любой вариант терапевтического белка РАН или его фрагмента (например, функциональный фрагмент) может кодироваться и экспрессироваться с зкДНК-вектора, как описано в данном документе. Специалист в данной области техники поймет, что терапевтический белок РАН включает все варианты сплайсинга и ортологи белка РАН. Терапевтический белок РАН включает интактные молекулы, а также их фрагменты (например, функциональные).

[00167] Отличительным преимуществом зкДНК-векторов по сравнению с обычными ААВ-векторами и даже лентивирусными векторами является отсутствие ограничения по размеру для гетерологичных последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих целевой белок. Таким образом, несколько полноразмерных терапевтических белков РАН могут быть экспрессированы с одного зкДНК-вектора.

[00168] Белок и ген РАН: ген РАН расположен на хромосоме 12 в полосах 12q22-q24.2. По состоянию на 2000 год в гене РАН было обнаружено примерно 400 мутаций, вызывающих заболевание. Фенилаланингидроксилаза (РАН) также может называться фенилаланин-4-монооксигеназой, фенилаланин-4-гидроксилазой, Phe-4-монооксигеназой, EC 1.14.16.1, EC 1.14.16, PKU1, PKU или PH.

[00169] Белковая последовательность РАН приведена далее: трансляция фермента РАН Homo sapiens (450 аминокислот), номер доступа NM_000277.3

MSTAVLENPGLGRKLSDFGQETSIEDNCNQNGAISLIFSLKEEVGALAKVLRRLFEEEN
DVNLTHIESRPSRLKKDEYEFFTHLDKRSPLALTNIIKILRHDIGATVHELSDRDKKDDTVP
WFPRTIQELDRFANQILSYGAELDADHPGFKDPVYRARRKQFADIAYNYRHGQPIPRVE

YMEEEKKTWGTVFKTLKSLYKTHACYEYNHIFPLLEKYCGFHEDNIPQLEDVVSQFLQTC
 TGFRLRPVAGLLSSRDFLGGGLAFRVFHCTQYIRHGSKPMYTPEDICHELLGHVPLFSDR
 SFAQFSQEIGLASLAPDEYIEKLATYWFVTEFGLCKQGDSIKAYGAGLLSSFGELQYC
 LSEKPKLLPLELEKTAIQNYTVTEFQPLYVVAESFNDAKEKVRNFAATIPRPFVRYDPY
 5 TQRIEVLDTQQLKILADSINSEIGILCSALQK (SEQ ID NO: 195)

[00170] РАН преимущественно экспрессируется в печени, с умеренной экспрессией
 в почках и желчном пузыре. Низкие уровни экспрессии РАН также могут
 детектироваться в простате, надпочечниках. Во время внутриутробного развития РАН
 может быть экспрессирован в надпочечниках, сердце, кишечнике, легких и желудке.
 10 Соответственно, зкДНК-вектор, экспрессирующий РАН, можно вводить в любую одну
 или более тканей, выбранных из: печени, почек, желчного пузыря, простаты,
 надпочечников. Согласно некоторым вариантам реализации, когда зкДНК-вектор,
 экспрессирующий РАН, вводят младенцу или вводят субъекту *in utero*, зкДНК-вектор,
 экспрессирующий РАН, можно вводить в любую одну или более тканей, выбранных
 15 из: печени, надпочечников, сердца, кишечника, легкого и желудка.

[00171] Экспрессия терапевтического белка РАН или его фрагмента с зкДНК-вектора
 может быть достигнута как в пространстве, так и во времени с использованием одного
 или более индуцируемых или репрессируемых промоторов, известных в данной области
 техники или описанных в данном документе, включая регуляторные переключатели,
 20 описанные в данном документе.

[00172] Согласно одному варианту реализации терапевтический белок РАН
 представляет собой «вариант терапевтического белка», который относится к
 терапевтическому белку РАН, имеющему измененную аминокислотную
 последовательность, композицию или структуру по сравнению с соответствующим
 25 нативным терапевтическим белком РАН. Согласно одному варианту реализации РАН
 представляет собой функциональный вариант (например, дикий тип). Пригодной также
 может быть экспрессия мутантного варианта белка РАН, такого как точечная мутация
 или делеционная мутация, которая приводит к фенилкетонурии (ФКУ), например, для
 создания модели заболевания на животных и/или для оценки лекарственных средств
 30 для лечения фенилкетонурии (ФКУ). Доставка мутантных или модифицированных
 белков РАН в модельную систему на основе клеток или на животных может быть
 выполнена для создания модели заболевания. Такую модель на основе клеток или на
 животных можно использовать для исследований и/или скрининга лекарственных
 средств. Терапевтический белок РАН, экспрессируемый с зкДНК-векторов, может
 35 дополнительно содержать последовательность/фрагмент, который придает
 дополнительную функциональность, такую как флуоресценция, ферментативная
 активность или сигнал секреции. Согласно одному варианту реализации вариант
 терапевтического белка РАН содержит ненативную последовательность метки для
 идентификации (например, иммунную метку), чтобы его можно было отличить от
 40 эндогенного терапевтического белка РАН в реципиентной клетке-хозяине.

[00173] Специалист в данной области техники может взять известную и/или
 общедоступную последовательность белка, например, терапевтического белка РАН, и
 выполнить обратное конструирование последовательности кДНК для кодирования
 такого белка. Затем кДНК может быть оптимизирована по кодонам, чтобы
 45 соответствовать предусмотренной клетке-хозяину, и вставлена в зкДНК-вектор, как
 описано в данном документе.

[00174] Согласно одному варианту реализации последовательность, кодирующая
 терапевтический белок РАН, может быть получена из существующей клетки-хозяина

или линии клеток, например, путем обратной транскрипции мРНК, полученной от хозяина, и амплификации последовательности с использованием ПЦР.

(i) зкДНК-векторы, экспрессирующие терапевтический белок РАН

[00175] зкДНК-вектор, имеющий одну или более последовательностей, кодирующих целевой терапевтический белок РАН, может содержать регуляторные последовательности, такие как промоторы (например, см. Таблицу 1), сигналы секреции, области поли(А) и энхансеры. По меньшей мере, зкДНК-вектор содержит одну или более гетерологичных последовательностей, кодирующих терапевтический белок РАН или его функциональный фрагмент. Примерные кассетные вставки для получения зкДНК-векторов, кодирующих терапевтические белки РАН, отображены на Фигурах 1А-1G. Согласно одному варианту реализации зкДНК-вектор содержит последовательность РАН, перечисленную в Таблице 1 в данном документе.

[00176] Таблица 1: Примерные последовательности РАН для лечения ФКУ

Описание	Длина	Источник	Содержание CG	SEQ ID NO:	Последовательность
кДНК мышинной фенилаланингидроксилазы (РАН)	1365	(NM_008777.3)	30	380	ATGGCAGCTGTTGTCCTGGAGAACGGAGTCTGAGCAGA AAACTCTCAGACTTTGGGCAGGAAACAAGTTACATCGAA GACAACCTCAATCAAAATGGTGCTGTATCTCTGATATTCT CACTCAAAGAGGAAGTTGGTGCCCTGGCCAAGGTCCTGC GCTTATTTGAGGAGAATGAGATCAACCTGACACACATTG AATCCAGACCTTCCCCTTTAAACAAAGATGAGTATGAGT TTTTACCTATCTGGATAAGCGTAGCAAGCCCGTCCTGGG CAGCATCATCAAGAGCCTGAGGAACGACATTTGGTCCAC TGTCATGAGCTTTCCCGAGACAAGGAAAAGAACACAGT GCCCTGGTTCCCAAGGACCATTCAGGAGCTGGACAGATT CGCCAATCAGATTCTCAGCTATGGAGCCGAACCTGGATGC AGACCACCCAGGCTTTAAAGATCCTGTGTACCGGGCGAG ACGAAAGCAGTTTGTGACATTGCCTACAACCTACCGCCA TGGGCAGCCCATTCCTCGGGTGGAAATACACAGAGGAGGA GAGGAAGACCTGGGGAACGGTGTTCAGGACTCTGAAGGC CTTGATAAAAACACATGCCTGCTACGACACAACCCACT CTTCCCTCTTCTGAAAAGTACTGCGGTTTCCGTGAAGAC AACATCCCGCAGCTGGAAGATGTTTCTCAGTTTCTCAGAGA CTTGTACTGGTTTCCCGCTCCGTCCTGTGTGGCTACTG TCGTCTCGAGATTTCTTGGGTGGCCTGGCCTTCCGAGTCT TCCACTGCACACAGTACATTAGGCATGGATCTAAGCCCA TGACACACCTGAACCTGATATCTGTCATGAACCTTGGG ACATGTGCCCTTGTTTTCAGATAGAAGCTTTGCCAGTTT TCTCAGGAAATTGGGCTTGCATCGCTGGGGCACCTGAT GAGTACATTGAGAAACTGGCCACAATTTACTGGTTTACTG TGGAGTTTGGGCTTTGCAAGGAAGGAGATTCTATAAAGG CATATGGTGCTGGGCTCTGTATCCTTTGGAGAATTACA GTACTGTTTATCAGACAAGCCAAAGCTCCTGCCCTGGAG CTAGAGAAGACAGCCTGCCAGGAGTACTGTACACAGAG TTCCAGCCTCTGACTATGTGGCCGAGAGTTCAATGATG CCAAGGAGAAAGTGAGGACTTTTGTGTCACAATCCCCC GGCCCTTCTCCGTTCCGCTATGACCCCTACACTCAAAGGGT TGAGGTCTGGACAATACCTACGAGTTGAAGATTTAGCT GACTCCATTAATAGTGAGGTTGGAATCCTTTGCCATGCC TGCAGAAAATAAAGTCATGATAA
кДНК фенилаланингидроксилазы (РАН) человека	1362	(U49897.1)	23	381	ATGTCCACTGCGGTCCTGGAAAACCCAGGCTTGGGCAGG AAACTCTCTGACTTTGGACAGGAAACAAGCTATATGAA GACAACCTGCAATCAAAATGGTGCCATATCACTGATCTTCT CACTCAAAGAAGAAGTTGGTGCAATGGCCAAAGTATTGC GCTTATTTGAGGAGAATGATGTAACCTGACCCACATTG AATCTAGACCTTCTCGTTTAAAGAAAGATGAGTATGAATT TTTACCATTGGATAAACGTAGCCTGCCTGCTCTGACA AACATCATCAAGATCTTGAGGCATGACATTTGGTCCACT GTCCATGAGCTTTCACGAGATAAGAAGAAAGACACAGT CCCTGGTTCCCAAGAACCATTCAAGAGCTGGACAGATTT GCCAATCAGATTCTCAGCTATGGAGCGGAACCTGGATGCT GACCACCCTGGTTTTAAAGATCCTGTGTACCGTGCAAGAC GGAAGCAGTTTGTGACATTGCCTACAACCTACCGCCATG GGCAGCCCATCCCTCGAGTGGAAATACATGGAGGAAGAAA AGAAAACATGGGGCACAGTGTCAAGACTCTGAAGTCCCT TGTATAAAAACCCATGCTTGTATGAGTACAATCACATTTT TCCACTTCTTGAAGTACTGTGGCTTCCATGAAGATAAC ATTCCCGAGCTGGAAGAGCTTTCTCAATTCCTGCAGACT GCACTGGTTTCCGCTCCGACCTGTGGCTGGCCTGCTTTC CTCTCGGGATTTCTTGGGTGGCCTGGCCTTCCGAGTCTTC CACTGCACACAGTACATCAGACATGGATCCAAGCCCATG TATACCCCGAACCTGACATCTGCCATGAGCTGTTGGGAC

5					ATGTGCCCTTGTTTTAGATCGCAGCTTTGCCAGTTTTCC CAGGAAATTGGCCTTGCCCTCTCTGGGTGCACCTGATGAAT ACATTGAAAAGCTCGCCACAATTTACTGGTTACTGTGGA GTTTTGGGCTCTGCAACAAGGAGACTCCATAAAGGCATA TGGTGTGGGCTCCTGTATCCTTTGGTGAATTACAGTAC TGCTTATCAGAGAAGCCAAAGCTTCTCCCCCTGGAGCTGG AGAAGACAGCCATCCAAAATTACACTGTCACGGAGTTCC AGCCCCGTATTACGTGGCAGAGATTTTTAATGATGCCAA GGAGAAAGTAAGGAACTTTGCTGCCACAATACCTCGGCC CTTCTCAGTTTCGCTACGACCCATACACCCAAAGGATTGAG GTCTTGGACAATACCCAGCAGCTTAAGATTTTGGCTGATT CCATTAACAGTGAAATTGGAATCCTTTGCAGTGCCCTCCA GAAAATAAAGTAATAA
10					ATGAGCACCGCCGTGCTGGAAAATCCTGGCCTGGGCAGA AAGCTGAGCGACTTCGGCCAAGAGACAAGCTACATCGAG GACAACCTGCAACCAGAACGGCGCCATCAGCCTGATCTTC AGCCTGAAAGAAGAAGTGGGCGCCCTGGCCAAGGTGCTG AGACTGTTTGAAGAGAACGACGTGAACCTGACACACATC GAGAGCAGACCCAGCAGACTGAAGAAGGACGAGTACGA GTTCTTCAACCACCTGGACAAGCGGAGCCTGCCTGCTCTG ACCAACATCATCAAGATCCTGCGGCACGACATCGGCGCC ACAGTGCACGAAGTGGCCGGGACAAGAAAAGGACAC CGTGCCATGGTTCCCAGAACCATCCAAGAGCTGGACAG ATTGCCCAACCAGATCCTGAGCTATGGCGCCGAGCTGGA CGCTGATCACCCCTGGCTTTAAGGACCCCGTGTACCGGGCC AGAAGAAAGCAGTTTGGCGATATCGCCTACAACCTACCGG CACGGCCAGCCTATTCTCGGGTTCGAGTACATGGAAGAG GAAAAGAAAACCTGGGGCACCGTGTCAAGACCCTGAAG TCCCTGTACAAGACCCAGCCTGTACGAGTACAACCCAG ATCTTCCCAGTCTCGAAAAGTACTGCGGCTTCCACGAGG ACAATATCCCTCAGCTTGAGGACGTGTCCCAGTTCCTGCA GACCTGCACCGGCTTTAGACTGAGGCCAGTTGCCGGACT GCTGAGCAGCAGAGATTTTCTCGGGCGCCTGGCCTTCAG AGTGTTCACCTGTACCCAGTACATCAGACACGGCAGCAA GCCCATGTACACCCCTGAGCCTGATATCTGCCACGAGCTG CTGGGACATGTGCCCTGTTCAGCGATAGAAGCTTCGCC AGTTACGCCAAGAGATCGGACTGGCTTCTCTGGGAGCCC CTGACGAGTACATTGAGAAGCTGGCCACCATCTACTGGT TCACCGTGAATTCGGCCTGTGCAAGCAGGGCGACAGCA TCAAAGCTTATGGCGCTGGCCTGCTGTAGCTTCGGCGA GCTGCAGTACTGTCTGAGCGAGAAGCCTAAGCTGTGCC CCTGGAACTGGAAAAGACCCGATCCAGAACTACACCGT GACCGAGTTCAGCCTCTGTACTACGTGGCCGAGAGCTTC AACGACGCCAAAGAAAAGTGGCGGAACTTCGCCGCCACC ATTCTCGGCCTTTCAGCGTCAGATACGCCCTACACAC AGCGGATCGAGGTGTGACAACACACAGCAGCTGAAAA TTCTGGCCGACTCCATCAACAGCGAGATCGGCATCCTGTG CAGCGCCCTGCAGAAAATCAAGTGA
15					
20	Фенилаланингидроксилаза (ПАН) человека, Genscript, оптимизированная по кодонам	1359	(Genscript, оптимизир. по кодонам)	77	382
25					
30					
35					
40	кДНК фенилаланингидроксилазы (ПАН) человека. 100% совпадение с последовательностью uniprot (https://www.uniprot.org/uniprot/P00439).	1359	NM_000277.2	23	383
45					

					GAAAATAAAAGTAA
5	Минимизированная по CpG фенилаланингидроксилаза (PAH) человека. 100% совпадение с последовательностью uniprot (https://www.uniprot.org/uniprot/P00439).	1359	0	384	ATGAGTACAGCTGTGCTTGAAAATCCTGGCCTGGGCAGG AAGCTTAGTGACTTTGGCCAGGAAACATCTTATATTGAAG ACAACCTGCAACCAGAATGGTGCCATTTCTCTTATCTTCTC CCTGAAAGAAGAGGTGGGAGCCCTGGCAAAGGTTTTAAG GCTCTTGAGGAGAATGATGTGAATTTGACACACATTGA GTCCAGGCCTTCTAGACTCAAGAAAGATGAATATGAGT CTTCACCCACCTGGACAAGAGGAGTCTCCCTGCTCTGACC AACATTATCAAGATCTTGAGACATGATATAGGAGCTACA GTGCATGAACTTTCAAGGGATAAAAAGAAGGACACTGTC CCCTGGTTTCCAGA ACTATCCAAGAATTAGACAGGTTTG CCAATCAGATCCTGAGCTATGGTGCAGAATTAGATGCAG ACCACCTGGGTTTAAAGACCCTGTGTATAGAGCCAGAA GAAAGCAGTTTGCTGACATTGCATACTACAGGCATG GGCAGCCCATTCTAGGGTGGAGTACATGGAGGAAGAAA AAAAGACCTGGGGCAGTTTTCAAGACCCTGAAGAGCC TTTACAAGACACATGCCTGCTATGAATATAACCATATATT TCCATTGTTGGAGAAATCTGTGGATTTTATGAAGATAAC ATCCCCAGCTGGAGGATGTTAGTCAGTTTTCTGCAGACCT GCACAGGCTTTAGACTGAGGCCAGTTGCAGGACTGCTAA GTTCTAGGACTTCTGGGTGGGCTAGCCTTCAGAGTGT CCACTGTACCCAAATATAAAGGCATGGATCCAAGCCCAT GTACACCCCTGAGCCTGATATCTGCCATGAGCTATTGGGC CATGTCCCCCTATTTTCTGACAGAAGCTTTGCCAGTTCT CCCAGGAGATTGGATTAGCCTCTCTGGGAGCTCCTGATGA GTACATTGAGAAGTTAGCAACCATCTACTGGTTCACTGTG GAATTTGGCCTTTGCAAACAAGGGGATAGTATAAAGGCT TATGGAGCAGGTCTGCTTAGCAGTTTTGGAGAGCTGCAG TACTGCCTGTCAAGAAAGCCAAAGCTCCTACCATTAGAA CTAGAAAAGACTGCCATCCAGAACTATACAGTCACTGAA TTCCAGCCTCTCTACTATGTGGCTGAGTCTTTCAATGATG CCAAGGAGAAGGTGAGAAATTTGCAGCCACCATTCCCA GGCCCTTCTGTAGATATGACCCTACACTCAGAGGAT TGAGGTCCTGGACAATACCCAGCACTAAAAAATCTGGC TGATTCCATTAATTCTGAAATTGGCATCCTCTGCTCTGCT CTCCAGAAGATTAATGA
10					
15					
20					
25	Экзоны 1 и 2, с интроном MVM между ними, минимизированной по CpG фенилаланингидроксилазы (PAH) человека.	1451	0	385	ATGAGTACAGCTGTGCTTGAAAATCCTGGCCTGGGCAGG AAGCTTAGTGACTTTGGCCAGGAAAGAGGTAAGGTTTTAAG GGATGGTTGGTTGGTGGGGTATTAATGTTAATTACCTGG AGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTTCAGGTTGGGAAACA TCTTATATTGAAGACA ACTGCAACCAGAATGGTGCCATTT CTCTTATCTTCCCTGAAAGAAGAGGTGGGAGCCCTGGC AAAGGTTTTAAGGCTCTTTGAGGAGAATGATGTGAATTTG ACACACATTGAGTCCAGGCCTTCTAGACTCAAGAAAGAT GAATATGAGTCTTTCACCCACCTGGACAAGAGGAGTCTC CCTGCTCTGACCAACATTATCAAGATCTTGAGACATGATA TAGGAGCTACAGTGCATGAACTTTCAAGGGATAAAAAGA AGGACACTGTCCCCTGGTTTCCAGAACTATCCAAGAATT AGACAGGTTTGCCAATCAGATCCTGAGCTATGGTGAGAGA ATTAGATGCAGACCACCCTGGGTTTAAAGACCCTGTGTAT AGAGCCAGAAGAAAGCAGTTTGTGACATTGCATACAAC TACAGGCATGGGCAGCCATTCTAGGGTGGAGTACATG GAGGAAGAAAAAAGACCTGGGGCAGTTTTCAAGACC CTGAAGAGCCTTTACAAGACACATGCCTGCTATGAATAT AACCATATATTTCCATTGTTGGAGAAATCTGTGGATTTC ATGAAGATAACATCCCCAGCTGGAGGATGTTAGTCAGT TTCTGCAGACCTGCACAGGCTTTAGACTGAGGCCAGTTGC AGGACTGCTAAGTTCTAGGACTTCTGGGTGGGCTAGC CTCAGAGTGTCCACTGTACCAATATAAAGGCATGGGA TCCAAGCCATGTACACCCTGAGCCTGATATCTGCCATG AGCTATTGGGCCATGTCCCCTATTTTCTGACAGAAGCTT TGCCCAGTTCTCCCAGGAGATTGGATTAGCCTCTCTGGGA GCTCCTGATGAGTACATTGAGAAGTTAGCAACCATCTACT GGTTCACTGTGGAATTTGGCCTTTGCAAACAAGGGGATA GTATAAAGGCTTATGGAGCAGGTCTGCTTAGCAGTTTTGG AGAGCTGCAGTACTGCCTGTCAAGAAAGCCAAAGCTCCT ACCATTAGAACTAGAAAAGACTGCCATCCAGA ACTATAC AGTCACTGAATCCAGCCTCTCTACTATGTGGCTGAGTCT TTCAATGATGCCAAGGAGAAGGTGAGAAATTTTGCAGCC ACCATTCCCAGGCCCTTCTCTGTAGATATGACCCTACA CTCAGAGGATTGAGGTCCTGGACAATACCCAGCACTAA AAATCTGGCTGATTCCATTAATTCTGAAATTGGCATCCT CTGCTCTGCTCTCCAGAAGATTAATGA
30					
35					
40					
45	Экзоны 1 и 2, с эндогенным первым интроном (5' 1 тыс. п.о., за которым следует 3' участок из 1 тыс.п.о. на интроне для сохранения эндогенных	3359	0	386	ATGAGTACAGCTGTGCTTGAAAATCCTGGCCTGGGCAGG AAGCTTAGTGACTTTGGCCAGGTTGAGCCAGGGCAGCCTG AGCTGCTCAGTTAGGGGAATTTGGCCCTCCAGAGAAGA GATCCCAAGACTGCTGGTGTCTCTGGTTTTCAAGCTCA GTAAGAAGTCTGAATTTGGTTGGAAGCTGATGAGAATATC CAGGAAGTCAACAGACAATGTCTTCAACAATTTTCT AAGTAGGAGAACATCTGTCTGGTGGTCTTACAGGAA TGAATGACCATTGCTTTAGGGGGTTGGGGATCTGGCCTCC AGA ACTGCCACCAATTAGCTGTGTGCTTTGGACAAGTTA

<p>5</p> <p>10</p> <p>15</p> <p>20</p> <p>25</p> <p>30</p> <p>35</p> <p>40</p> <p>45</p>	<p>сайтов сплайсинга) между ними, минимизированной по CpG фенилаланингидроксилазы (PAH) человека.</p>			<p>CTGTCCCTCTCTGTTGTCTGTTTACTCTTCTGTACACTGAA GGGGCTGGTCCCTAATGATCTGGGATGGGATGTGGAATC CTTCTAGATTTCTTTTGTAAATATTTATAAAGTGTCTCAGC AAGGTATCAAAATGGCAAATTTGTGAGTAACTATCCTCC TTTCATTTTGGGAAGAAGATGAGGCATGAAGAGAATTC GACAGAACTTACTCAGACCAGGGGAGGCAGAACTAA GCAGAGAGGAAATGACCAAGAGTTAGCCCTGGGCATGG AATGTGAAAGAACCCTAAAGGTGACTTGAAATAATGCC CAAGGTATATCCATTCTCCTGGATTTGTTGGCATTCTT GAGGTGAAGAATTGCAGAATACATTCTTAATGTGACCT ACATATTTACCCATGTGAGGAAGTCTGCTCCTGGACTCTT GAGATTCAGTCATAAAGCCCAGGCCAGGGAATAATGTA AGTCTGCAGGCCCTGTCATCAGTAGGATTAGGGAGAAG AGTTCTCAGTAGAAAACAGGGAGGCTGGAGAGAAAAGA ATGGTTAATGTTAAGGTTAATATACTAGAAAGACTGCA GAACTTAGGACTGATTTTTATTTGAATCCTTAAAAA AATTTCTTATGAAAATAGTACATGGCTCTTAGGAGACAG AACTTATTGTACAGAGGAACAGTGTGAGAGTCAGAGTGA ATTTTATGTATTATTTTGGACTTAGGCTAATGATTTAGCA AACTCTGGAATGTCAGCCCTAACCCCAACCTTGGTTTCT GTCACATGCATGTAGTAAAGTGTAGATCCTGGACATTCTT TGAGATTTAGTTAAGACTAAGTTTATTTCTGATAGGTT ATTTGTGACTTTCATGGATTTTGTAACTCTTTTCAACAA TTGGATGTCTCAGATCTCAGCATATGGGAGCAAGTTAATG CTTCTGAGATCTTTGCCAAAGGTCAAGAGGTCATTTTGT TGTATTTATAAATTTCCATCATTTTTATATACTTCTCAATA TTCTTTTAAACTATTCTTTCCCTTTTTCATCCTCTGAATA CTGTTTTGACAGATCTTGTATTAGCATGCTTTCAGGGAT GAGAAAACCTAAGAAAGCTGAATGATTTGCCAAAGTAGT CCACCTGGAAAATGAAAGAGAGAGGATTCCAATCCAGGT CTTAGGATTCAAAAGCCTGTGCATGTTCCATTTTAGTAC TTTCCACACTGTATTTCTCAATGCTTTCTGGGACATTTA TAAATCATATTATATCACCTCTAAGGATCTTTCAGTTTGT TATATATGTGCTATTAAGTTAGATTGTGAGCTCCTAAAA GATAAAGCATTGTCTTATTCATCTTAAATTTCTCAGAGC CCAAATAGTGCCTGGAACCTAGTAGTTGCTCAATAAAG GTATTGAATTTACAGGATTGAATGGTGACATCAATGAAT AATTGAAGATTCCTTAAGCTGATACTGACCCAGTAGCA TCATTGATCATTAAATGGCCTGGACTACTTATTTCCAC CACACTACATATTTCTGTATAGAATATATAGCTCATTG TATTGCAAGATTTAACTAGAAGAAAGAGTTTCAATGCTGT TTGTCCATGTAGGTTTAAACAGGAATGAATGCTAAACTGT GGAAAATGTTTTAAACAAATGCATCTTATCCTGTAGGAA ACATCTTATATTGAAGACAACCTGCAACCAGAATGGTGCC ATTTCTTATCTTCTCCCTGAAAGAAGAGGTGGGAGCCC TGGCAAAGGTTTTAAGGCTCTTTGAGGAGAATGATGTGA ATTTGACACACATTGAGTCCAGGCCCTTCTAGACTCAAGAA AGATGAATATGAGTTCTTACCCACCTGGACAAGAGGAG TCTCCCTGCTCTGACCAACATTATCAAGATCTTGAGACAT GATATAGGAGCTACAGTGCATGAACCTTCAAGGGATAAA AAGAAAGGACACTGTCCCTGGTTTCCAGAACTATCCAA GAATTAGACAGGTTTGGCAATCAGATCCTGAGCTATGGT GCAGAATTAGATGCAGACCACCCTGGGTTTTAAGACCCT GTGTATAGAGCCAGAAGAAAGCAGTTTGTGACATTGCA TACAACACTACAGGCATGGGCAGCCATTCTAGGGTGGAG TACATGGAGGAAGAAAAAAGACCTGGGGCAGATTTTTC AAGACCCTGAAGACCTTTACAAGACACATGCCTGCTAT GAATATAACCATATATTTCCATTGTTGGAGAAAATCTGTG GATTTTCAATGAAGATAACATCCCCAGCTGGAGGATGTTA GTCAGTTTCTGCAGACCTGCACAGGCTTTAGACTGAGGCC AGTTGCAGGACTGCTAAGTTCTAGGACTTCTGGGTGG GCTAGCCTTCAAGAGTGTCCACTGTACCCAATATATAAGG CATGGATCCAAGCCCATGTACACCCTGAGCCTGATATCT GCCATGAGCTATTGGGCCATGTCCCTTATTTCTGACAG AAGCTTTGCCAGTTCTCCAGGAGATTGGATTAGCCTCT CTGGGAGCTCCTGATGAGTACATTTGAGAAGTTAGCAACC ATCTACTGGTTCACTGTGGAATTTGGCCTTTGCAAAAAG GGGATAGTATAAAGGCTTATGGAGCAGTCTGCTTAGCA GTTTTGGAGAGCTGCAGTACTGCCTGTCAGAAAAGCCAA AGCTCCTACCATTAGAACTAGAAAAGACTGCCATCCAGA ACTATACAGTCACTGAATCCAGCCTCTCTACTATGTGGC TGAGTCTTTCAATGATGCCAAGGAGAAGGTGAGAAATTT TGCAGCCACCATTCCCAGGCCCTTCTGTTAGATATGAC CCCTACACTCAGAGGATTGAGGTCCTGGACAATACCCAG CAACTAAAAATTTCTGGCTGATTCATTAATTTGAAATTTG GCATCCTCTGCTCTGCTCTCCAGAAGATTAATGA</p>
<p>45</p>	<p>Фенилаланингидроксилаза (PAH) мыши, genscript, оптимизированная по кононам последовательность</p>	<p>1362</p>	<p>72</p>	<p>387</p> <p>ATGGCCGCTGTGGTGTGGAAAATGGCGTGTGAGCAGA AAGCTGAGCGACTTCGGCCAAGAGACAAGCTACATCGAG GACAACAGCAACCAGAACGGCGCTGTGTCCCTGATCTTC AGCCTGAAAGAAGAAGTGGGCGCCCTGGCCAGGTTGCTG AGACTGTTTGGAGAAAACGAGATCACTGACGCACATC GAGAGCAGACCCAGCAGACTGAACAAGGACGAGTACGA GTTCTTACCTACCTGGACAAGAGAAGCAAGCCCGTGT</p>

<p>5</p> <p>10</p> <p>15</p>					<p>GGGCAGCATCATCAAGAGCCTGAGAAACGACATCGGCGC CACCCTGCACGAGCTGAGCAGGGACAAAAGAAAAGAAC CCGTGCCATGGTTCCCCAGGACCATCAAGAGCTGGACA GATTCGCCAACAGATCCTGTCTTACGGCGCCGAGCTGG ACGCTGATCACCCCTGGCTTTAAGGACCCCGTGTACAGAG CCAGAAGAAAGCAGTTCCGCCGATATCGCCTACA ACTACA GACACGGCCAGCCTATTCCTAGAGTCGAGTACACCGAGG AAGAGAGAAAGACCTGGGGCACCGTGTTCAGAACCCTGA AGGCCCTGTACAAGACCCACGCCTGCTACGAGCACAAAC ACATCTTCCACTGCTCGAAAAGTACTGCGGCTTCCGCGA GGATAACATCCCTCAGCTTGAGGACGTGTCCAGTTCCCTG CAGACCTGCACAGGCTTCAGACTGAGGCCAGTTGCTGGC CTGCTGTCCAGCAGAGATTTTCTCGGGCCCTGGCCTTCA GAGTGTTCACCTGTACCCAGTACATCAGGCACGGCAGCA AGCCCATGTACACCCCTGAGCCTGACATCTGCCACGAGC TGCTGGGACATGTGCCTCTGTTACAGCGACAGAAGCTTCGC CCAGTTCAGCCAAGAGATCGGCCTGGCTAGTCTGGGCGC TCCTGATGAGTACATCGAGAAGCTGGCCACCATCTACTG GTTACCCGTGGAATTCGGCCTGTGCAAAAGAGGGCGACAG CATCAAGGCTTATGGCGCCGACTGCTGTCTAGCTTTGGC GAGCTGCAGTACTGTCTGAGCGACAAGCCTAAGTGTCTG CCCTGGAACTGGAAAAGACCGCCTGCCAAGAGTACACA GTGACCGAGTTCAGCCTCTGTACTACGTGGCCGAGAGC TTCAACGACGCCAAAAGAAAAGTGCAGGACCTTCGCCGCT ACAATCCCAGACCTTTCAGCGTCAGATACGACCCCTACA CACAGCGCGTGGAAAGTGTGGACAACACACAGCAGCTGA AGATTCTGGCCGACTCCATCAACAGCGAAGTGGGCATCC TGTGTACGCCCTGCAGAAAATCAAGAGCTGA</p>
<p>20</p> <p>25</p> <p>30</p> <p>35</p> <p>40</p> <p>45</p> <p>кДНК фенилала- нингидроксила- зы человека (ПАН), получен- ная из записи genbank U49897.1 с 1 полным ин- троном. Содерж- ит синонимич- ные мутации ДНК относитель- но NM_000277.2 (hПАН_кД- НК_ORF_v3).</p>	<p>5531</p>	<p>NG_008690.2</p>	<p>39</p>	<p>388</p>	<p>ATGTCCACTGCGGCTCTGGAAAACCCAGGCTTGGGCAGG AAACTCTCTGACTTTGGACAGGTGAGCCACGGCAGCCTG AGCTGCTCAGTTAGGGGAATTTGGGCCTCCAGAGAAAGA GATCCGAAGACTGCTGGTGCTTCCCTGGTTTCATAAGCTCA GTAAGAAGTCTGAATTCGTTGGAAGCTGATGAGAATATC CAGGAAAGTCAACAGACAAAATGTCTCAACAATTTGTTCT AAGTAGGAGAACATCTGTCTCGGTGGCTTTCACAGGAA TGAATGACCATTGCTTTAGGGGGTTGGGGATCTGGCCTCC AGAACTGCCACCAATTAGCTGTGTCTTTGGACAAGTTA CTGTCCCTCTCTGTGTCTGTTACTCTTCTGTACTACTGAA GGGGCTGGTCCCTAATGATCTGGGATGGGATGTGGAATC CTTCTAGATTTCTTTTGTAAATATTTATAAAGTGCTCTCAGC AAGGTATCAAAATGGCAAAATGTGAGTAACTATCCTCC TTTCATTTTGGGAAGAAGATGAGGCATGAAGAGAATTCA GACAGAAACTTACTCAGACCAGGGGAGGCAGAAACTAA GCAGAGAGGAAAATGACCAAGAGTTAGCCCTGGGCATGG AATGTGAAAGAACCCTAAACGTGACTTGGAAATAATGCC CAAGGTATATTCCATTCTCCGGGATTTGTTGGCATTCTT GAGGTGAAGAATTGCAGAATACATTCTTTAATGTGACT ACATATTTACCCATGGGAGGAAGTCTGCTCCTGGACTCTT GAGATTCAGTCATAAAGCCCAGGCCAGGGAAATAATGTA AGTCTGCAGGCCCTGTCTCAGTAGGATTAGGGAGAAG AGTTCTCAGTAGAAAACAGGGAGGCTGGAGAGAAAAGA ATGGTTAATGTTAACGTTAATATACTAGAAAAGACTGCA GAACCTTAGGACTGATTTTTATTTGAATCCTTAAAAA AATTTCTTATGAAAATAGTACATGGCTCTTAGGACAGC AACTTATTGTACAGAGGAACAGCGTGAGAGTCAGAGTGA TCCCAGAACAGGCTCTGGCTCCATCCTGCACATAGTTTGG GTGCTGTGGCAATACGGTCCCCACA ACTGTGGGAAGGG GTTAGGGGCAGGGATCTCATCAGGAAAGCATAGGGGTTT AAAGTTCTTATAGAGCACTTAGAAGATTGAGAATCCAC AAATATATTAATAACAACAAGTAGTGTCTGTTATAT AGTAAATGTGAATTTGCAGACACATTTAGGGAAAAGTTA TAATTA AAAAATAGGCTGTATATATATCAATGGTTCCAA AATTTCTATGGTTAAGAATCACCTGGGATGGTTTGA TGGCAGATTCTAAGACA ACTTGATTCAACAGGTTTAGGTA AAGCCCAGGGA ACTGCATTATAAGAAGGAATCACCTGTA ATTTTGGAGTCAAGATCCAAGGAACACTCATTGAGAAAC ACTGATTTACAAGTGCATGGAGAGAAATGGAGCAAGTG AAGGGGGATCAGCATGGTGAATATAGGCTGTTAGGAGT GCTATTGACTAACTGTCTGGTACTGGACCAGAGTAAATC TTTTACTTTGCAAGAAACAGGACTAAATTTCCCATATTATG TCCATAGCAAAGGGAATTATGTAGAAAATTTGATAATTA GGAGCCTGAGTTCTTGACCAGCCTCCACTACCTATGTGGC CTCAGGTGAGTTATTTCTCCCTTTGGCTCTAAGTTTCCC CATCTGTAATGTAAGGGAGTTTAACTAGATGAGCACTAA GGACAAATCAATTTCTGTGAGTCAATTTATGAAATACC ATGTGGGCATCAAATGCCAAGTGGAAAGCATAGATAAAG AAGTGAATGTGCACCTGGGCTGAGGGGAACAACATTTT CTAAGAGAATTGAGACCCAAAAGAGCCTTTAAGGAAGGT GAGATCTTGGAAAGGGAAATTTGGTGAATCTCTAATGA GGAGCTAAAAGGCAAGAAAGAAAGCAGCTTGGCTGGA AAGGAGTTCTGTAGGTGGCCTCCAGAGATTCGGTAC CACAGAAACTGCCAAACATCAGCAAGAAGCCATGGGGAT GGAGCGTTTGGAGGATTCTAATAAGAAGGACAAGAGTAA</p>

5
10
15
20
25
30
35
40
45

				<p>AAATGTCAGGCTGGATCGATGCAGGCCACTAAGAAATGG ATTCAGGTGATGGCAGTGGGAAGAAAGGACCTGATGCC AGAGGCATTTCTGGAGAAGATGAGATCAGACTTGTGATT GGCTGAACACACACTGTAGTGGGGTGGGGTTAGGGGGT GACTCAACTTCAAGCCAGGTACATTCAAGTCTGAATTGC CCTAGTCAAAAGTGGCATCTGTGGATGTGTATCAGAAAT ATCTTACTTTTCTTGGAAAGCCAACAGGAGAAAAGAGTGC TACCAAGTGAAGTACTAGAGACAGGAATATCTTTTGTCAATTC AAGGAAACTGGAAAGAAAGAAAGGCTCAGTATTCTTTAGTA GGAAGAAGACTTAAAGTCAGAGACTCATCTGTACCTCTCT GGCAGGGTTTAAAAGGGGGAAGAGGAATAGAGGCTGCA AGAGATTGTGATTTCATGGACAGTATGCAGAGATCAAATG ACCTGGGTTTCTGATCCTGGCTCCACTGCTAACTGTGTAAC TATAGGCAAGTTCCCTTAACTCTCTAAAGCCTTAACTTTGT CATCAATAAAAGGGGGCACTTGGTGCCTAATAAACCTA CCTCTTAGGTTGTTGCCAAATTACATGAGATAATCCAAAT CAAGTGCCTATTATAATACCCAGAAATTATAGGCTCTAAA TAAATGTTTATATAGGCTCTAAATAAATGAAGTTTTTTAG AAAGATAACATCATGATCAAAATGGGATATTTAACAGTT TAGTCTTCCATTTCATTGAAGCTCCCTAAAATCACTCTTG CTGATAAATTTGTTTTTCTTACACCTCAGTTTCATGGG ATGTTTTGGCAAAAATCTGAATTTCTGAATTGAAAGAAT TTTTTGCTAAGGGTCACTAGTATTTCATGCAGGGCTTGTTA TTCTGAGTCACTAAGAGTTTCCCTAACACAGCCTTCTCTCA TTGAGATGATGTAACATCTATCCATTAATTTCAATTA TGCTTACAAGAGAGTAATTTGTTCTGCAAAATTTTTTCTTCC CAGTTTTAGGTACCTGCTGCTTATTGTGGACACACATAGA ATTTTATGATTAATTTTTCGACTTAGGCTAATGATTTAGCA AACTCTGGAATGTCAGCCCTAACCCCACTTGGTTTTCT GTCACATGCATGTAGTAAGTGTAGATCCTGGACATTCTT TGAGATTTAGTTTAAAGACTAAGTTTATTTCTGATAGGTT ATTTGTACTTTTCATGGATTTTGAACCTTTTTCAACAA TTGGATGCTCAGATCTCAGCATATGGGAGCAAGTTAATG CTTCCTGAGATCTTTGCCAAAGGTCAAGAGGTCATTTTTG TGTATTTATAATTTCCATCATTTTTATATACTTCTCAATA TTCTTTTTAAACTATTCTTTTCCCTTTTTTTCATCCTCTGAATA CTGTTTTGACAGATCTTGTATTAGCATGCTTTCACGGAT GAGAAAAGTAAAGAAAGTGAATGATTTGCCCAAAGTAGT CCACCTGGAAAATGAAAGAGAGAGGATTCGAATCCAGGT CTTACGATTCAAAAGCCTGTGCATGTTCCATTTTTAGTAC TTTCCACACTGTATTTCTCAATGCTTTCTGGGACATTTTA TAAATCATATTATACACCTCTAAGGATCTTTCAGTTTGT TATATATGTGCTATTAAGTTAGATTGTGAGCTCTTAAAA GATAAAGCATTGTCTTATTCATCTTAAATTTCTCAGAGC CCAAATAGTGCCTGGAACCTAGTAGTTGCTCAATAAAAG GTATTGAATTTACAGGATTGAATGGTGACATCAATGAAT AATTGAAGATTCCTTAAGCTGATAACTGACCCAGTAGCA TCATTGATCATTAAATTGCCCTGGACTTACTTATTTCCAC CACTACATATTTCTGTATAGAATATATAGCTCATTG TATTGCAAGATTTAACTAGAAGAAAGAGTTTATGCTTGGCT TTGTCCATGGAGGTTTAAACAGGAATGAATTGCTAAACTGT GGAAAATGTTTTAAACAAATGCATCTTATCCTGTAGGAA ACAAGCTATATTGAAGACAAGTCAATCAAAATGGTGCC ATATCACTGATCTTCTCACTCAAAGAAGAAGTTGGTGCA TGGCCAAAGTATTGCGCTTATTGAGGAGAATGATGTAA ACCTGACCCACATTGAATCTAGACCTTCTCGTTTTAAAGAA AGATGAGTATGAATTTTTACCCATTTGGATAAACGTAGC CTGCCTGCTCTGACAAACATCATCAAGATCTTGAGGCATG ACATTGGTGCCACTGTCCATGAGCTTTCACGAGATAAGA AGAAAGACACAGTGCCTGGTTCCCAAGAACCATTCAAG AGCTGGACAGATTTGCCAATCAGATCTCAGCTATGGAG CGGAACTGGATGCTGACCACCCTGGTTTTAAAGATCCTGT GTACCGTGCAAGACGGAAGCAGTTTGGCTGACATTGCCTA CAACTACCGCCATGGGCAGCCCATCCCTCGAGTGGGAATA CATGGAGGAAGAAAAGAAAACATGGGGCACAGTGTTC AGACTCTGAAGTCTTGTATAAAACCCATGCTTGCTATGA GTACAATCACATTTTTCCACTTCTTGAAGAAAGTACTGTGGC TTCCATGAAGATAACATTCCTCAGCTGGAAGACGTTTTCT AATTCCTGCAGACTTGCACTGGTTTCCGCCTCCGACCTGT GGCTGGCCTGCTTTTCTCTCGGGATTTCTTGGGTGGCCTG GCCTCCGAGTCTTCCACTGCACACAGTACATCAGACATG GATCCAAGCCCATGTATACCCCGAACCTGACATCTGCCA TGAGCTGTTGGGACATGTGCCCTTGTTTTTCAGATCGCAGC TTTGCCAGTTTTCCAGGAAATTGGCCTTGCTCTCTGG GTGCACCTGATGAATACATTGAAAAGCTCGCCACAATTT ACTGGTTTACTGTGGAGTTTGGGCTCTGCAACAAGGAG ACTCCATAAAGGCATATGGTGCTGGGCTCCTGTCATCCTT TGGTGAATTACAGTACTGCTTATCAGAGAAGCCAAAGCT TCTCCCCCTGGAGCTGGAGAAGACAGCCATCCAAAATTA CACTGTCAGGAGTTCCAGCCCTGTATTACGTGGCAGAG AGTTTTAATGATGCCAAGGAGAAAGTAAGGAACCTTGTCT GCCACAATACCTCGGCCCTTCTCAGTTCGCTACGACCCAT ACACCCAAAGGATTGAGGCTTTGGACAATACCCAGCAGC</p>
--	--	--	--	---

					TTAAGATTTTGGCTGATTCCATTAACAGTGAAATTGGAAT CCTTTCAGTGCCCTCCAGAAAATAAAGTAA
5	кДНК фенилаланин-гидроксилазы человека (PAH), полученная из записи genbank U49897.1. Содержит синонимичные мутации ДНК относительно NM_000277.2 (hPAH_кДНК_ORF_v3)-G1155A и A696G. Это 100% совпадение с последовательностью uniprot (https://www.uniprot.org/uniprot/P00439).	1359	U49897.1	23	389
10					
15					
20					
25	кДНК фенилаланин-гидроксилазы человека (PAH), полученная из записи genbank U49897.1 с интроном MVM. Содержит синонимичные мутации ДНК относительно NM_000277.2 (hPAH_кДНК_ORF_v3)	1451		23	390
30					
35					
40					
45	кДНК фенилаланин-гидроксилазы человека (PAH), полученная из записи genbank U49897.1 с модифицированным интроном 1	1588		26	391

<p>5 10 15 20</p> <p>(5' 121 п.о. и 100 п.о. от 3' первого интрона hPAH). Содержит синонимичные мутации ДНК относительно NM_000277.2 (hPAH_кД-НК_ORF_v3)</p>					<p>GCAATCAAAATGGTGCCATATCACTGATCTTCTCACTCAA AGAAGAAGTTGGTGCCATTGGCCAAAGTATTGCGCTTATTT GAGGAGAATGATGTAACCTGACCCACATTGAATCTAGA CCTTCTCGTTTAAAGAAAGATGAGTATGAATTTTTCACCC ATTTGGATAAACGTAGCCTGCCTGCTCTGACAAACATCAT CAAGATCTTGAGGCATGACATTGGTGCCACTGTCCATGA GCTTTCACGAGATAAGAAGAAAGACACAGTGGCCCTGGTT CCCAAGAACCATTCAAGAGCTGGACAGATTTGCCAATCA GATTCTCAGCTATGGAGCGGAACTGGATGCTGACCACCC TGGTTTTAAAGATCCTGTGTACCGTGAAGACGGAAGCA GTTTGTGACATTGCCTACAACCTACCGCCATGGGCAGCCC ATCCCTCGAGTGGAAATACATGGAGGAAGAAAAGAAAAC ATGGGGCAGAGTTCAGACTCTGAAGTCTTGTATAA AACCCATGCTTGTATGAGTACAATCACATTTTCCACTT CTTGAAAAGTACTGTGGCTTCCATGAAGATAACATTCCCC AGCTGGAAGACGTTTCTCAATTCCTGCAGACTTGCAGTGG TTTCCGCCTCCGACCTGTGGCTGGCCTGCTTTCCTCTCGG GATTTCTTGGGTGGCCTGGCCTCCGAGTCTTCCACTGCA CACAGTACATCAGACATGGATCCAAGCCCATGTATACCC CCGAACCTGACATCTGCCATGAGCTGTTGGGACATGTGC CCTTGTTTTCAGATCGCAGCTTTGCCAGTTTTCCAGGA AATTGGCCTTGCCTCTCTGGGTGCACCTGATGAATACATT GAAAAGCTCGCCACAATTTACTGGTTTACTGTGGAGTTTG GGCTCTGCAAACAAGGAGACTCCATAAAGGCATATGGTG CTGGGCTCCTGTATCCTTTGGTGAATTACAGTACTGCTT ATCAGAGAAGCCAAAGCTTCTCCCCCTGGAGCTGGAGAA GACAGCCATCCAAAATTACACTGTACGGAGTTCAGCC CCTGTATTACGTGGCAGAGAGTTTTAATGATGCCAAGGA GAAAGTAAGGAACCTTGTGTCACACAATACCTCGGCCCTT CTCAGTTCGCTACGACCCATACACCCAAAGGATTGAGGT CTTGACAATACCCAGCAGCTTAAGATTTTGGCTGATTCC ATTAACAGTGAAATTGAATCCTTTCAGTGCCCTCCAGA AAATAAAGTAA</p>
<p>25 30 35 40</p> <p>кДНК фенилаланин-гидроксилазы мыши с линкером GGGGS и 6xHis-меткой</p>	<p>1398</p>		<p>30</p>	<p>392</p>	<p>ATGGCAGCTGTTGTCCTGGAGAACGGAGTCTGAGCAGA AAACTCTCAGACTTTGGGCAGGAAACAAGTTACATCGAA GACAACCTCAATCAAAATGGTGCTGTATCTCTGATATTTCT CACTCAAAGAGGAAGTTGGTGCCCTGGCCAAGTCTTCG GCTTATTTGAGGAGAATGAGATCAACCTGACACACATTG AATCCAGACCTTCCCCTTAAACAAAGATGAGTATGAGT TTTTACCTATCTGGATAAGCGTAGCAAGCCCGTCCCTGGG CAGCATCATCAAGAGCCTGAGGAACGACATTTGGTGCCAC TGTCCATGAGCTTTCCCGAGACAAGGAAAAGAACACAGT GCCCTGGTTCCCAAGGACCATTCAGGAGCTGGACAGATT CGCCAATCAGATTCTCAGCTATGGAGCCGAACCTGGATGC AGACCACCCAGGCTTTAAAGATCCTGTGTACCGGGCGAG ACGAAAGCAGTTTGTGACATTGCCTACAACCTACCGCCA TGGGCAGCCCATTCCTCGGGTGGAAATACACAGAGGAGGA GAGGAAGACCTGGGGAACGGTGTTCAGGACTCTGAAGGC CTTGTATAAAAACACATGCCTGCTACGAGCACAACCCAT CTTCCCTCTTCTGGAAAAGTACTGCGGTTCCCGTGAAGAC AACATCCCGCAGCTGGAAAGATGTTTCTCAGTTTCTGCAGA CTTGTACTGGTTTCCCGCTCCGTCCTGTTGCTGGCTTACTG TCGTCTCGAGATTTCTTGGGTGGCCTGGCCTTCCGAGTCT TCCACTGCACACAGTACATTAGGCATGGATCTAAGCCCA TGTACACACCTGAACCTGATATCTGTATGAACCTTGGG ACATGTGCCCTTGTTTTCAGATAGAAGCTTTGCCAGTTT TCTCAGGAAATTGGGCTTGCATCGCTGGGGCACCTGAT GAGTACATTGAGAAACTGGCCACAATTTACTGGTTTACTG TGAGTTTTGGGCTTTGCAAGGAAGGAGATTCTATAAAGG CATATGGTGCTGGGCTCTTGTATCCTTTGGAGAATTACA GTACTGTTATCAGACAAGCCAAAGCTCCTGCCCCTGGAG CTAGAGAAGACAGCCTGCCAGGAGTACTGTACACAGAG TTCCAGCCTCTGACTATGTGGCCGAGAGTTCAATGATG CCAAGGAGAAAGTGAGGACTTTTGTGTCACACAATCCCCC GGCCCTTCTCCGTTCCGCTATGACCCCTACACTCAAAGGGT TGAGGTCTGGACAATACTCAGCAGTTGAAGATTTTAGCT GACTCCATTAATAGTGAGGTTGGAATCCTTTGCCATGCC TGCAGAAAATAAAGTCAGGGGGTGGAGGCTCTCATACC ATCACCATCACTAATGA</p>
<p>45</p> <p>кДНК фенилаланин-гидроксилазы мыши с линкером GGGGS и 6xHis-меткой</p>	<p>1395</p>		<p>68</p>	<p>393</p>	<p>ATGGCCGCTGTTGGTGCTGGAGAACGGCGTGTCTGCAGA AAGCTGTCTGACTTCCGACAGGAGACCAGCTACATCGAG GATAACTCCAACCAGAACGGCGCGCTGAGCCTGATCTTC TCCCTGAAGGAGGAAGTGGGAGCCCTGGCTAAGGTGCTG AGACTGTTTGGAGGAGAACGAGATCAACCTGACCCACATC GAGTCCAGGCCCTTCTAGACTGAACAAGGACGAGTACGAG TTCTTTACATACTGGATAAGCGGCTTAAGCCAGTGGCTGG GCTCTATCATCAAGAGCCTGAGAAACGATATCGGAGCTA CCGTGCACGAGCTGAGCCGGGACAAGGAGAAGAACACC GTGCCCTGTTTCCCAGGACAATCCAGGAGCTGGATAGA TTTGCCAACCAGATCCTGAGCTACGGAGCTGAGCTGGAC GCTGATCACCTGGATTCAAGGACCCCGTGTACCGCGCTA GGAGAAAGCAGTTTGGCCGACATCGCTTACAACACTACAGGC</p>

5				<p>ACGGACAGCCAATCCCTCGCGTGGAGTACACAGAGGAGG AGAGGAAGACCTGGGGAACAGTGTTCAGAACCCTGAAGG CCCTGTACAAGACACACGCTTGCTACGAGCACAACCACA TCTTCCCCTGCTGGAGAAGTACTGTGGCTTTAGGGAGGA CAACATCCCTCAGCTGGAGGACGTGAGCCAGTTCCTGCA GACCTGCACAGGATTTAGGCTGAGGCCAGTGGCCGGACT GCTGAGCTCCCGGATTTCCCTGGGCGGACTGGCTTTCCGC GTGTTTCACTGCACCCAGTACATCAGGCACGGCTCTAAGC CAATGTACACACCAGAGCCGATATCTGTACAGAGCTGC TGGGACACGTGCCCTGTTTAGCGACCCGGTCTTCGCCCA GTTTTCTCAGGAGATCGGCCTGGCCAGCCTGGGAGCTCCT GACGAGTACATCGAGAAGCTGGCTACCATCTACTGGTTC ACAGTGGAGTTTGGCCTGTGCAAGGAGGGAGATTCCATC AAGGCCTACGGCGCTGGACTGCTGTCTAGCTTCGGCGAG CTGCAGTACTGCCTGTCTGACAAGCCAAAGTGTCTGCC TGGAGCTGGAGAAGACCCGCTGTACAGGAGTACACCGTGA CAGAGTCCAGCCCTGTACTACGTGGCCGAGAGCTTTAA CGACGCTAAGGAGAAGGTGCGCACCTTCGCCGCTACAAT CCCTCGGCCATTTTCCGTGCGCTACGACCCTTACACCCAG AGGGTGGAGGTGCTGGATAACACACAGCAGCTGAAGATC CTGGCCGACTCTATCAACAGCGAAGTGGGCATCCTGTGC CACGCTCTGCAGAAGATCAAGTCCGGAGGAGGAGGATCT CATCACCACCACCACCTGA</p>
15 20 25 30 35	кДНК фенилала- нингидроксила- зы (ПАН) челове- ка из SEQ ID NO: 193	1363	394	<p>ATGTCCACTGCGGTCTGGAAAACCCAGGCTTGGGCAGG AAACTCTCTGACTTTGGACAGGAAACAAGCTATATTGAA GACAACTGCAATCAAAATGGTGCCATATCACTGATCTTCT CACTCAAAGAAGAAGTTGGTGCATTGGCCAAAGTATTGC GCTTATTTGAGGAGAATGATGTAACCTGACCCACATTG AATCTAGACCTTCTCCTTTAAAGAAAGATGAGTATGAAT TTTACCATTGGATAAACGTAGCCTGCCTGCTCTGACA AACATCATCAAGATCTTGAGGCATGACATTGGTGCCACT GTCCATGAGCTTTCACGAGATAAGAAGAAAGACACAGTG CCCTGGTCCCAAGAACCATTCAAGAGCTGGACAGATTT GCCAATCAGATTTCTCAGCTATGGAGCGGAACCTGGATGCT GACCACCCTGGTTTTAAAGATCCTGTGTACCGTGCAAGAC GGAAGCAGTTTGTGACATTGCCTACAACCTACCCGCATG GGCAGCCCATCCCTCGAGTGGAAATACATGGAGGAAGAAA AGAAAACATGGGGCACAGTGTTCAGACTCTGAAGTCTCT TGTATAAAACCCATGCTTGTATGAGTACAATCACATTTT TCCACTTTGAAAAGTACTGTGGCTTCCATGAAGATAAC ATTCCCCAGCTGGAAGACGTTTCTCAGTTCCTGCAGACTT GCACTGGTTTCCCGCTCCGACCTGTGGCTGGCCTGCTTTC CTCTCGGGATTTCTTGGGTGGCCTGGCCTTCCGAGTCTTC CACTGCACACAGTACATCAGACATGGATCCAAGCCCATG TATACCCCGAACCTGACATCTGCCATGAGCTGTTGGGAC ATGTGCCCTTGTTCAGATCGCAGCTTTGCCAGTTTTCC CAGGAAATTGGCCTTGCCTCTCTGGGTGCACCTGATGAAT ACATTGAAAAGCTCGCCACAATTTACTGGTTTACTGTGGA GTTTGGGCTCTGCAAAACAAGGAGACTCCATAAAGGCATA TGGTGTGGGCTCCTGTATCCTTTGGTGAATTACAGTAC TGCTTATCAGAGAAGCCAAAGCTTCTCCCTGGAGCTGG AGAAGACAGCCATCCAAATTACACTGTCACGGAGTTC AGCCCTCTATTACGTGGCAGAGAGTTTTAATGATGCCAA GGAGAAAGTAAGGAACCTTGTGTCACAAATACCTCGGCC CTTCTCAGTTCGCTACGACCCATACACCCAAAGGATTGAG GTCTTGGACAATACCCAGCAGCTTAAGATTTGGCTGATT CCATTAACAGTGAAATGGAATCCTTTCAGTGCCTCCA GAAAATAAAGTAATTA</p>

[00177] Согласно одному варианту реализации зкДНК-вектор содержит последовательность ПАН, перечисленную в Таблице 1 в данном документе. Согласно одному варианту реализации зкДНК-вектор содержит последовательность ПАН, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью ПАН, перечисленной в Таблице 1. Согласно одному варианту реализации зкДНК-вектор содержит последовательность ПАН, имеющую по меньшей мере 91% идентичности с последовательностью ПАН, перечисленной в Таблице 1. Согласно одному варианту реализации зкДНК-вектор содержит последовательность ПАН, имеющую по меньшей мере 92% идентичности с последовательностью ПАН, перечисленной в Таблице 1. Согласно одному варианту реализации зкДНК-вектор содержит последовательность ПАН, имеющую по меньшей мере 93% идентичности с последовательностью ПАН, перечисленной в Таблице 1. Согласно одному варианту реализации зкДНК-вектор содержит последовательность ПАН, имеющую по меньшей мере 94% идентичности с последовательностью ПАН, перечисленной в Таблице 1. Согласно одному варианту

Согласно одному варианту реализации последовательность РАН имеет последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 394. Согласно одному варианту реализации последовательность РАН имеет последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 394.

5 Согласно одному варианту реализации последовательность РАН имеет последовательность, имеющую по меньшей мере 97% идентичности с SEQ ID NO: 394. Согласно одному варианту реализации последовательность РАН имеет последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 394.

10 Согласно одному варианту реализации последовательность РАН имеет последовательность, имеющую по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 394. Согласно одному варианту реализации последовательность РАН имеет последовательность, содержащую SEQ ID NO: 394. Согласно одному варианту реализации последовательность РАН имеет последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 394.

15 (iii) Терапевтические белки РАН и варианты их применения для лечения ФКУ

[00182] ЗкДНК-векторы, описанные в данном документе, можно применять для доставки терапевтических белков РАН для лечения ФКУ, ассоциированной с нефизиологической экспрессией белка РАН и/или мутациями в белках РАН.

[00183] ЗкДНК-векторы, описанные в данном документе, можно применять для экспрессии любого целевого терапевтического белка РАН. Примерные терапевтические белки РАН включают, но не ограничиваются им, любой белок РАН, экспрессируемый последовательностями, изложенными в Таблице 1 в данном документе.

[00184] Согласно одному варианту реализации экспрессированный терапевтический белок РАН является функциональным для лечения фенилкетонурии (ФКУ). Согласно некоторым вариантам реализации терапевтический белок РАН не вызывает реакции иммунной системы.

[00185] Согласно другому варианту реализации зкДНК-векторы, кодирующие терапевтический белок РАН или его фрагмент (например, функциональный фрагмент), можно применять для получения химерного белка. Таким образом, в данном документе конкретно предусмотрено, что зкДНК-вектор, экспрессирующий химерный белок, можно вводить, например, в любую одну или более тканей, выбранных из: печени, почек, желчного пузыря, простаты, надпочечников. Согласно некоторым вариантам реализации, когда зкДНК-вектор, экспрессирующий РАН, вводят младенцу или вводят субъекту *in utero*, зкДНК-вектор, экспрессирующий РАН, можно вводить в любую одну или более тканей, выбранных из: печени, надпочечников, сердца, кишечника, легкого и желудка, или в стволовую клетку-предшественника клеток печени для лечения фенилкетонурии (ФКУ) *in vivo* или *ex vivo*.

[00186] ФКУ: ФКУ представляет собой редкий наследственный врожденный порок метаболизма, вызванный мутацией в гене РАН. РАН представляет собой фермент, который обычно экспрессируется в печени и необходим для метаболизма поступающего с пищей фенилаланина в тирозин, аминокислоту, отвечающую за продукцию нейротрансмиттеров. ФКУ возникает в результате мутаций в РАН, которые приводят к дефициту его ферментативной активности. Соответственно, зкДНК-векторы, экспрессирующие белок РАН, могут экспрессировать РАН в печени или других тканях, включая клетки сетчатки, такие как фоторецепторы и/или клетки RPE. Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-векторы экспрессируют по меньшей мере один белок РАН как в фоторецепторах, так и в клетках RPE.

[00187] РАН обычно эндогенно экспрессируется как в клетках типа PR, так и в клетках

типа RPE. Также сообщается, что низкий уровень экспрессии PАН в RPE также может потребоваться для нормальной функции сетчатки. Соответственно, низкий уровень или высокий уровень экспрессии белка PАН зкДНК-вектором в PR, а также необязательно в клетках RPE, иногда может быть необходим для предотвращения дегенерации сетчатки. Этот уровень экспрессии может быть точно настроен с помощью промоторов и/или регуляторных переключателей, описанных в данном документе.

[00188] Соответственно, в некоторых вариантах реализации зкДНК-вектор применяют для экспрессии белка PАН, который представляет собой белок размером 6,8 тыс. п. о., с эндогенного промотора (~1 тыс. п. о.) для восстановления нормального процессинга ретиноидов как в фоторецепторах, так и в RPE. Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор, экспрессирующий белок PАН, вводят супрахориоидальным или интравитреальным путем для лечения большей площади сетчатки. Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор вводят с помощью одного или более из: субретинальной инъекции, супрахориоидальной инъекции или интравитреальной инъекции.

[00189] Способы включают введение субъекту эффективного количества композиции, содержащей зкДНК-вектор, кодирующий терапевтический белок PАН или его фрагмент (например, функциональный фрагмент), как описано в данном документе. Как будет понятно квалифицированному практикующему врачу, термин «эффективное количество» относится к количеству введенной композиции зкДНК, которое приводит к экспрессии белка в «терапевтически эффективном количестве» для лечения заболевания или нарушения.

[00190] Диапазоны дозировок для композиции, содержащей зкДНК-вектор, кодирующий терапевтический белок PАН или его фрагмент (например, функциональный фрагмент), зависят от эффективности (например, эффективности промотора) и включают количества, достаточно большие для получения целевого эффекта, например, экспрессии целевого терапевтического белка PАН для лечения фенилкетонурии (ФКУ). Дозировка не должна быть настолько большой, чтобы вызывать неприемлемые нежелательные побочные эффекты. Обычно дозировка будет варьироваться в зависимости от конкретных характеристик зкДНК-вектора, эффективности экспрессии, а также в зависимости от возраста, состояния и пола пациента. Дозировка может быть определена специалистом в данной области техники и, в отличие от обычных ААВ-векторов, также может быть скорректирована индивидуальным врачом в случае любого осложнения, поскольку зкДНК-векторы не содержат активирующие иммунную систему капсидные белки, которые препятствуют повторному дозированию.

[00191] Введение композиций зкДНК, описанных в данном документе, можно повторять в течение ограниченного периода времени. Согласно некоторым вариантам реализации дозы вводят периодически или с помощью импульсного введения. Согласно предпочтительному варианту реализации указанные выше дозы вводят в течение нескольких месяцев. Продолжительность лечения зависит от клинического прогресса и ответа пациента на терапию. Также предусмотрены «бустерные» обработки с течением времени. Кроме того, уровень экспрессии можно титровать по мере роста субъекта.

[00192] Терапевтический белок PАН может быть экспрессирован у субъекта в течение по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев/одного года, по меньшей мере 2 лет, по меньшей мере 5 лет, по меньшей мере 10 лет, по меньшей мере 15 лет, по меньшей мере 20 лет, по меньшей мере 30 лет, по меньшей мере 40 лет, по меньшей мере 50 лет или более. Долговременная экспрессия может быть достигнута

путем повторного введения зкДНК-векторов, описанных в данном документе, через заранее определенные или желательные интервалы.

[00193] В данном документе термин «терапевтически эффективное количество» представляет собой количество экспрессированного терапевтического белка РАН или его функционального фрагмента, которое достаточно для получения статистически значимого, измеримого изменения экспрессии биомаркера заболевания или уменьшения симптомов данного заболевания (см. «Измерение эффективности» ниже). Такие эффективные количества можно откалибровать в клинических исследованиях, а также в исследованиях на животных для конкретной композиции зкДНК.

[00194] Точные количества зкДНК-вектора, необходимые для введения, зависят от суждения практикующего врача и являются индивидуальными для каждого индивидуума. Подходящие схемы введения также являются варьируемыми, но типичным является начальное введение с последующими повторными дозами с одним или более интервалами с последующей инъекцией или другим введением. В качестве альтернативы, предусмотрена непрерывная внутривенная инфузия, достаточная для поддержания концентраций в крови в диапазонах, указанных для видов терапии *in vivo*, в частности, для лечения острых заболеваний/нарушений.

[00195] Агенты, которые можно применять в способах и композициях, описанных в данном документе, можно вводить местно, внутривенно (с помощью болюсной или непрерывной инфузии), с помощью внутриклеточной инъекции, внутритканевой инъекции, перорально, путем ингаляции, внутривентриально, внутримышечно, подкожно, внутрь полости, а также они могут быть доставлены с помощью перистальтических средств, при необходимости, или других средств, известных специалистам в данной области техники. При необходимости, агент может быть введен системно. Он также может быть введен *in utero*.

[00196] Эффективность конкретного лечения фенилкетонурии (ФКУ) может быть определена квалифицированным врачом. Однако лечение считается «эффективным лечением», в соответствии с использованием этого термина в данном документе, если любой или все признаки или симптомы заболевания или нарушения изменяются благоприятным образом, или если другие клинически принятые симптомы или маркеры заболевания улучшаются или облегчаются, например, по меньшей мере на 10% после лечения зкДНК-вектором, кодирующим РАН или его функциональный фрагмент. Эффективность также может быть измерена по отсутствию у индивидуума ухудшения, которое оценивается по стабилизации заболевания или по потребности в медицинских вмешательствах (т. е. прогрессирование заболевания прекращается или по меньшей мере замедляется). Способы измерения этих показателей известны специалистам в данной области техники и/или описаны в данном документе. Лечение включает любое лечение заболевания у индивидуума или животного (некоторые неограничивающие примеры включают человека или млекопитающее) и включает: (1) ингибирование заболевания, например, прекращение или замедление прогрессирования заболевания или нарушения; или (2) облегчение заболевания, например, вызывающее регресс симптомов; и (3) предотвращение или снижение вероятности развития заболевания, или предотвращение вторичных заболеваний/нарушений, ассоциированных с указанным заболеванием, таких как печеночная или почечная недостаточность. Эффективное количество для лечения заболевания означает такое количество, которое при введении млекопитающему, нуждающемуся в этом, является достаточным, чтобы привести к эффективному лечению этого заболевания, в соответствии с определением этого термина в данном документе.

[00197] Эффективность агента может быть определена путем оценки физических показателей, которые являются специфическими для фенилкетонурии (ФКУ). Стандартные методы анализа показателей ФКУ известны в данной области техники.

[00198] Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, также может кодировать кофакторы или другие полипептиды, смысловые или антисмысловые олигонуклеотиды или РНК (кодирующие или не кодирующие; например, киРНК, кшРНК, микро-РНК и их антисмысловые аналоги (например, antagoMiR)), которые можно применять в сочетании с белком РАН, экспрессируемым с зкДНК. Кроме того, экспрессионные кассеты, содержащие последовательность, кодирующую белок РАН, также могут включать экзогенную последовательность, которая кодирует репортерный белок, который будет использоваться в экспериментальных или диагностических целях, такой как β -лактамаза, β -галактозидаза (LacZ), щелочная фосфатаза, тимидинкиназа, зеленый флуоресцентный белок (GFP), хлорамфениколацетилтрансфераза (CAT), люцифераза и другие, хорошо известные в данной области техники.

[00199] Согласно одному варианту реализации зкДНК-вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты для экспрессии белка РАН, который является функциональным для лечения ФКУ. Согласно предпочтительному варианту реализации терапевтический белок РАН не вызывает реакции иммунной системы, если этого не требуется.

I. ЗкДНК-вектор в целом для применения в получении терапевтических белков РАН

[00200] Варианты реализации настоящего изобретения основаны на способах и композициях, содержащих линейные дуплексные векторы с замкнутыми концами (зкДНК), которые могут экспрессировать трансген РАН. Согласно некоторым вариантам реализации трансген представляет собой последовательность, кодирующую белок РАН. ЗкДНК-векторы для экспрессии белка РАН, описанные в данном документе, не ограничены размером, что позволяет, например, обеспечивать экспрессию всех компонентов, необходимых для экспрессии трансгена, с одного вектора. ЗкДНК-вектор для экспрессии белка РАН предпочтительно является дуплексным, например, самокомплементарным, по меньшей мере в части молекулы, такой как экспрессионная кассета (например, зкДНК не является двухцепочечной кольцевой молекулой). ЗкДНК-вектор имеет ковалентно замкнутые концы и, таким образом, устойчив к расщеплению экзонуклеазой (например, экзонуклеазой I или экзонуклеазой III), например, более часа при 37°C.

[00201] В общем случае зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, содержит, в направлении от 5' к 3': первый инвертированный концевой повтор (ITR) аденоассоциированного вируса (AAB), нуклеотидную последовательность, представляющую интерес (например, экспрессионную кассету, описанную в данном документе), и второй ITR AAB. Последовательности ITR выбирают из любых из: (i) по меньшей мере одного WT-ITR и по меньшей мере одного модифицированного инвертированного концевого повтора AAB (mod-ITR) (например, асимметричных модифицированных ITR); (ii) двух модифицированных ITR, причем пара mod-ITR имеет различную трехмерную пространственную организацию по отношению друг к другу (например, асимметричные модифицированные ITR), или (iii) пары симметричных или по существу симметричных WT-WT-ITR, причем каждый WT-ITR имеет одинаковую трехмерную пространственную организацию, или (iv) пары симметричных или по существу симметричных модифицированных ITR, причем каждый mod-ITR имеет одинаковую трехмерную пространственную организацию.

[00202] В данный документ включены способы и композиции, содержащие зкДНК-вектор для продукции белка РАН, который может дополнительно включать систему доставки, такую как, но не ограничиваясь этим, систему доставки на основе липосомных наночастиц. В данном документе раскрыты неограничивающие примерные системы на основе липосомных наночастиц, предусмотренные для применения. Согласно некоторым аспектам настоящего раскрытия предложена липидная наночастица, содержащая зкДНК и ионизируемый липид. Например, состав липидных наночастиц, который получают и нагружают зкДНК-вектором, полученным указанным способом, раскрыт в международной заявке РСТ/US2018/050042, поданной 7 сентября 2018 г., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[00203] ЗкДНК-векторы для экспрессии белка РАН, раскрытые в данном документе, не имеют ограничений по упаковке, налагаемых ограниченным пространством внутри вирусного капсида. ЗкДНК-векторы представляют собой жизнеспособную продуцируемую эукариотами альтернативу плазмидным ДНК-векторам, продуцируемым прокариотами, в отличие от инкапсулированных геномов ААВ. Это позволяет вставлять контрольные элементы, например, регуляторные переключатели, раскрытые в данном документе, большие трансгены, множественные трансгены и т. д.

[00204] ФИГ. 1А-1Е схематически показывают неограничивающие примерные зкДНК-векторы для экспрессии белка РАН или соответствующую последовательность зкДНК-плазмид. ЗкДНК-векторы для экспрессии белка РАН являются бескапсидными и могут быть получены из плазмиды, кодирующей в указанном порядке: первый ITR, экспрессионную кассету, содержащую трансген, и второй ITR. Экспрессионная кассета может включать одну или более регуляторных последовательностей, которые обеспечивают и/или контролируют экспрессию трансгена, например, экспрессионная кассета может содержать один или более из следующих элементов, в указанном порядке: энхансер/промотор, ORF репортера (трансгена), посттранскрипционный регуляторный элемент (например, WPRE) и сигнал полиаденилирования и терминации (например, BGH поли(А)).

[00205] Экспрессионная кассета также может содержать участок внутренней посадки рибосомы (IRES) и/или элемент 2А. Цис-регуляторные элементы включают, но не ограничиваются перечисленными, промотор, рибопереключател, инсулятор, mi-регулируемый элемент, посттранскрипционный регуляторный элемент, промотор, специфический для ткани и типа клеток, и энхансер. Согласно некоторым вариантам реализации ITR может действовать как промотор трансгена, например, белка РАН. Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор содержит дополнительные компоненты для регуляции экспрессии трансгена, например, регуляторный переключатель, которые описаны в данном документе в разделе, озаглавленном «Регуляторные переключатели», для контроля и регуляции экспрессии белка РАН, и могут включать, при необходимости, регуляторный переключатель, который представляет собой «аварийный выключатель» (kill switch) для обеспечения контролируемой гибели клетки, содержащей зкДНК-вектор.

[00206] Экспрессионная кассета может содержать более 4000 нуклеотидов, 5000 нуклеотидов, 10000 нуклеотидов или 20000 нуклеотидов, или 30000 нуклеотидов, или 40000 нуклеотидов, или 50000 нуклеотидов, или любой диапазон примерно от 4000 до 10000 нуклеотидов, или 10000-50000 нуклеотидов, или более 50000 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации экспрессионная кассета может содержать трансген с длиной в диапазоне от 500 до 50000 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации экспрессионная кассета может содержать трансген с длиной в диапазоне

от 500 до 75000 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации экспрессионная кассета может содержать трансген с длиной в диапазоне от 500 до 10000 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации экспрессионная кассета может содержать трансген с длиной в диапазоне от 1000 до 10000 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации экспрессионная кассета может содержать трансген с длиной в диапазоне от 500 до 5000 нуклеотидов. Векторы зкДНК не имеют ограничений по размеру ААВ-векторов, заключенных в капсид, что позволяет доставлять экспрессионную кассету большого размера для обеспечения эффективной экспрессии трансгена. Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор лишен специфического для прокариот метилирования.

[00207] ЗкДНК-экспрессионная кассета может включать, например, экспрессируемую экзогенную последовательность (например, открытую рамку считывания) или трансген, который кодирует белок, который либо отсутствует, либо не активен, либо обладает недостаточной активностью у субъекта-реципиента, или ген, который кодирует белок, имеющий целевой биологический или терапевтический эффект. Трансген может кодировать продукт гена, функция которого может заключаться в корректировке экспрессии дефектного гена или транскрипта. В принципе, экспрессионная кассета может включать любой ген, который кодирует белок, полипептид или РНК, который либо снижен, либо отсутствует из-за мутации, или который обеспечивает терапевтическую пользу при сверхэкспрессии, и рассматривается, как включенная в объем настоящего раскрытия.

[00208] кспрессионная кассета может содержать любой трансген (например, кодирующий белок РАН), например, белок РАН, который можно применять для лечения ФКУ у субъекта, то есть терапевтический белок РАН. ЗкДНК-вектор можно применять для доставки и экспрессии любого белка РАН, представляющего интерес, у субъекта, по отдельности или в комбинации с нуклеиновыми кислотами, кодирующими полипептиды, или не кодирующими нуклеиновыми кислотами (например, РНКи, miR и т. д.), а также экзогенных генов и нуклеотидных последовательностей, включая вирусные последовательности в геноме субъектов, например, последовательности вируса ВИЧ и тому подобное. Предпочтительно зкДНК-вектор, раскрытый в данном документе, применяют для терапевтических целей (например, для медицинских, диагностических или ветеринарных целей) или для иммуногенных полипептидов. Согласно определенным вариантам реализации зкДНК-вектор можно применять для экспрессии любого гена, представляющего интерес, у субъекта, который включает один или более полипептидов, пептидов, рибозимов, пептидных нуклеиновых кислот, миРНК, РНКи, антисмысловых олигонуклеотидов, антисмысловых полинуклеотидов или РНК (кодирующих или не кодирующих; например, киРНК, кшРНК, микро-РНК и их антисмысловых аналогов (например, antagoMiR)), антител, слитых белков или любую их комбинацию.

[00209] Экспрессионная кассета также может кодировать полипептиды, смысловые или антисмысловые олигонуклеотиды или РНК (кодирующие или не кодирующие; например, миРНК, кшРНК, микро-РНК и их антисмысловые аналоги (например, antagoMiR)). Экспрессионные кассеты могут включать экзогенную последовательность, которая кодирует репортерный белок, который будет использоваться в экспериментальных или диагностических целях, такой как β -лактамаза, β -галактозидаза (LacZ), щелочная фосфатаза, тимидинкиназа, зеленый флуоресцентный белок (GFP), хлорамфениколацетилтрансфераза (CAT), люцифераза и другие, хорошо известные в данной области техники.

[00210] Последовательности, обеспеченные в экспрессионной кассете, экспрессионная конструкция зкДНК-вектора для экспрессии белка РАН, описанного в данном документе, могут быть оптимизированы по кодонам для целевой клетки-хозяина. В данном документе термин «оптимизированный по кодонам» или «оптимизация кодонов»
5 относится к процессу модификации последовательности нуклеиновой кислоты для усиления экспрессии в клетках позвоночного, представляющего интерес, например, мышцы или человека, путем замены по меньшей мере одного или более чем одного или значительного числа кодонов нативной последовательности (например, прокариотической последовательности) кодонами, которые чаще или наиболее часто
10 используются в генах этого позвоночного. Различные виды проявляют определенное предпочтение в отношении некоторых кодонов конкретной аминокислоты. Как правило, оптимизация кодонов не изменяет аминокислотную последовательность исходного транслированного белка. Оптимизированные кодоны могут быть определены с
15 использованием, например, оптимизации кодонов Aptagen's Gene Forge[®] и платформы для синтеза генов по заказу (Aptagen, Inc., 2190 Fox Mill Rd. Suite 300, Херндон, Виржиния, 20171) или другой общедоступной базы данных. Согласно некоторым вариантам реализации нуклеиновая кислота, кодирующая белок РАН, оптимизирована для экспрессии у человека и/или представляет собой РАН человека или его функциональный
фрагмент, как известно в данной области техники.

[00211] Трансген, экспрессируемый зкДНК-вектором для экспрессии белка РАН, как описано в данном документе, кодирует белок РАН. ЗкДНК-векторы для экспрессии белка РАН отличаются от экспрессионных векторов на основе плазмид по многим структурным признакам. ЗкДНК-векторы могут обладать одним или более из
25 следующих признаков: отсутствие исходной (т. е. не вставленной) бактериальной ДНК, отсутствие прокариотической точки начала репликации, самодостаточность, т. е. им не требуются никакие последовательности, кроме двух ITR, включая сайт связывания Rep и сайт концевой разрешения (RBS и TRS), и экзогенную последовательность между ITR, присутствие последовательностей ITR, которые образуют шпильки, и отсутствие метилирования ДНК бактериального типа или фактически любого другого
30 метилирования, которое считается аномальным у млекопитающего-хозяина. В целом векторы согласно настоящему изобретению предпочтительно не содержат никакой прокариотической ДНК, но предусмотрено, что некоторая прокариотическая ДНК может быть вставлена в виде экзогенной последовательности, в качестве неограничивающего примера, в промоторной или энхансерной области. Еще один
35 важный признак, отличающий зкДНК-векторы от экспрессионных векторов на основе плазмид, заключается в том, что зкДНК-векторы представляют собой одноцепочечные линейные ДНК с замкнутыми концами, в то время как плазмиды всегда представляют собой двухцепочечные ДНК.

[00212] ЗкДНК-векторы для экспрессии белка РАН, продуцируемые с помощью
40 способов, предложенных в данном документе, предпочтительно имеют линейную и непрерывную структуру, а не прерывистую структуру, согласно определению с помощью анализа с использованием расщепления рестрикционными ферментами (ФИГ. 4D). Как полагают, линейная и непрерывная структура более устойчива к атаке клеточными эндонуклеазами, а также с меньшей вероятностью рекомбинируется и вызывает
45 мутагенез. Таким образом, зкДНК-вектор в линейной и непрерывной структуре является предпочтительным вариантом реализации. Непрерывный, линейный, одноцепочечный, с внутримолекулярным дуплексом зкДНК-вектор может иметь ковалентно связанные концевые участки без последовательностей, кодирующих белки капсида ААВ. Эти

зкДНК-векторы структурно отличаются от плазмид (включая зкДНК-плазмиды, описанные в данном документе), которые представляют собой кольцевые дуплексные молекулы нуклеиновых кислот бактериального происхождения. Комплементарные цепи плазмид могут быть разделены после денатурации с получением двух молекул нуклеиновых кислот, в то время как зкДНК-векторы, которые имеют комплементарные цепи, представляют собой единую молекулу ДНК и, следовательно, остаются единой молекулой даже после денатурации. Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-векторы, описанные в данном документе, могут быть получены без метилирования оснований ДНК прокариотического типа, в отличие от плазмид. Таким образом, зкДНК-векторы и зкДНК-плазмиды различаются как по структуре (в частности, линейная в сопоставлении с кольцевой), так и с точки зрения методов, используемых для получения и очистки этих различных объектов (см. ниже), а также с точки зрения метилирования ДНК, которое относится к прокариотическому типу для зкДНК-плазмид и эукариотическому типу для зкДНК-вектора.

[00213] Существует несколько преимуществ применения зкДНК-вектора для экспрессии белка РАН, как описано в данном документе, по сравнению с экспрессионными векторами на основе плазмид, такие преимущества включают, но не ограничиваются перечисленными: 1) плазмиды содержат последовательности бактериальной ДНК и подвергаются метилированию, специфическому для прокариотов, например, метилированию 6-метиладенозина и 5-метилцитозина, в то время как последовательности бескапсидного ААВ-вектора имеют эукариотическое происхождение и не подвергаются метилированию, специфическому для прокариотов; в результате бескапсидные ААВ-векторы с меньшей вероятностью индуцируют воспалительные и иммунные ответы по сравнению с плазмидами; 2) в то время как плазмиды требуют присутствия гена устойчивости во время производственного способа, зкДНК-векторы не требуют; 3) в то время как кольцевая плаزمид не доставляется в ядро при введении в клетку и требует чрезмерной нагрузки, чтобы преодолеть разрушение клеточными нуклеазами, зкДНК-векторы содержат вирусные цис-элементы, т. е. ITR, которые придают устойчивость к нуклеазам и могут быть сконструированы для нацеливания и доставки в ядро. Предполагается, что минимальными определяющими элементами, необходимыми для функции ITR, являются сайт связывания Rep (RBS; 5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3' (SEQ ID NO: 60) для ААВ2) и сайт концевого разрешения (TRS; 5'-AGTTGG-3' (SEQ ID NO: 64) для ААВ2) плюс переменная палиндромная последовательность, обеспечивающая образование шпильки; и 4) зкДНК-векторы не имеют избыточной представленности динуклеотидов CpG, часто обнаруживаемых в плазмидах прокариотического происхождения, которые, как сообщается, связывают члена Toll-подобного семейства рецепторов, вызывая опосредуемый Т-клетками иммунный ответ. Напротив, трансдукция бескапсидными ААВ-векторами, описанными в данном документе, может быть эффективно нацелена на типы клеток и тканей, которые трудно трансдуцировать обычными вирионами ААВ с использованием различных реагентов для доставки.

I. Инвертированные концевые повторы (ITR)

[00214] Как раскрыто в данном документе, зкДНК-векторы для экспрессии белка РАН содержат трансген или гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, расположенные между двумя последовательностями инвертированных концевых повторов (ITR), причем указанные последовательности ITR могут представлять собой пару асимметричных ITR или пару симметричных или по существу симметричных ITR, в соответствии с определением этих терминов в данном документе. ЗкДНК-вектор,

раскрытый в данном документе, может содержать последовательности ITR, которые выбраны из любых из: (i) по меньшей мере одного WT ITR и по меньшей мере одного модифицированного инвертированного концевой повтора (mod-ITR) ААВ (например, асимметричных модифицированных ITR); (ii) двух модифицированных ITR, причем пара mod-ITR имеет различную трехмерную пространственную организацию по отношению друг к другу (например, асимметричные модифицированные ITR), или (iii) пары симметричных или по существу симметричных WT-WT ITR, причем каждый WT-ITR имеет одинаковую трехмерную пространственную организацию, или (iv) пары симметричных или по существу симметричных модифицированных ITR, причем каждый mod-ITR имеет одинаковую трехмерную пространственную организацию, при этом указанные способы согласно настоящему раскрытию могут дополнительно включать систему доставки, такую как, но не ограничиваясь этим, система доставки на основе липосомных наночастиц.

[00215] Согласно некоторым вариантам реализации последовательность ITR может происходить из вирусов семейства Parvoviridae, которое включает два подсемейства: Parvovirinae, инфицирующих позвоночных животных, и Densovirinae, инфицирующих насекомых. Подсемейство Parvovirinae (называемое парвовирусами) включает род Dependovirus, члены которого, в большинстве условий, нуждаются в коинфекции вспомогательным вирусом, таким как аденовирус или вирус герпеса, для эффективной инфекции. Род Dependovirus включает аденоассоциированный вирус (ААВ), который обычно инфицирует людей (например, серотипы 2, 3А, 3В, 5 и 6) или приматов (например, серотипы 1 и 4), а также родственные вирусы, которые инфицируют других теплокровных животных (например, аденоассоциированные вирусы бычьих, собачьих, лошадиных и овечьих). Парвовирусы и другие члены семейства Parvoviridae в общих чертах описаны в Kenneth I. Berns, «Parvoviridae: The Viruses and Their Replication», глава 69 в FIELDS VIROLOGY (3 изд. 1996).

[00216] Несмотря на то, что ITR, приведенные в качестве примера в описании и Примерах в данном документе, представляют собой WT-ITR ААВ2, обычный специалист в данной области техники понимает, что, как было указано выше, можно использовать ITR из любого известного парвовируса, например, депендовируса, такого как ААВ (например, из генома ААВ1, ААВ2, ААВ3, ААВ4, ААВ5, ААВ 5, ААВ7, ААВ8, ААВ9, ААВ10, ААВ 11, ААВ12, ААВrh8, ААВrh10, ААВ-DJ и ААВ-DJ8. Например, NCBI: NC 002077; NC 001401; NC001729; NC001829; NC006152; NC 006260; NC 006261), химерные ITR или ITR из любого синтетического ААВ. Согласно некоторым вариантам реализации ААВ может инфицировать теплокровных животных, например, птичьих (ПААВ), бычьих (БААВ), собачьих, лошадиных и овечьих аденоассоциированные вирусы. Согласно некоторым вариантам реализации ITR происходит из парвовируса В19 (номер доступа в GenBank: NC 000883), мелкого мышинового вируса (МВМ) (номер доступа в GenBank NC 001510); гусиного парвовируса (номер доступа в GenBank NC 001701); змеинового парвовируса 1 (номер доступа в GenBank NC 006148). Согласно некоторым вариантам реализации 5' WT-ITR может происходить из одного серотипа, а 3' WT-ITR может происходить из другого серотипа, как обсуждается в данном документе.

[00217] Обычному специалисту известно, что последовательности ITR имеют общую структуру двухцепочечного соединения Холлидея, которое, как правило, представляет собой Т-образную или Y-образную шпильчатую структуру (см., например, ФИГ. 2А и ФИГ. 3А), где каждый WT-ITR образован двумя палиндромными плечами или петлями (В-В' и С-С'), встроенными в большее палиндромное плечо (А-А'), и одноцепочечной последовательностью D (при этом порядок этих палиндромных последовательностей

определяет «флип» или «флоп» ориентацию ITR). См., например, структурный анализ и сравнение последовательностей ITR из различных серотипов ААВ (ААВ1-ААВ6), описанные в Grimm et al., J. Virology, 2006; 80(1); 426-439; Yan et al., J. Virology, 2005; 364-379; Duan et al., Virology 1999; 261; 8-14. Обычный специалист в данной области техники
 5 может легко определить последовательности WT-ITR из любого серотипа ААВ для использования в зкДНК-векторе или зкДНК-плазмиде на основе примерных последовательностей ITR ААВ2, предложенных в данном документе. См., например, сравнение последовательностей ITR из разных серотипов ААВ (ААВ1-ААВ6, птичий ААВ (АААВ) и бычий ААВ (ВААВ)), описанное в Grimm et al., J. Virology, 2006; 80(1);
 10 426-439; в котором показан % идентичности левого ITR ААВ2 с левым ITR из других серотипов: ААВ-1 (84%), ААВ-3 (86%), ААВ-4 (79%), ААВ-5 (58%), ААВ-6 (левый ITR) (100%) и ААВ-6 (правый ITR) (82%).

А. Пары симметричных ITR

[00218] Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии
 15 белка РАН, описанный в данном документе, содержит в направлении от 5' к 3': первый инвертированный концевой повтор (ITR) аденоассоциированного вируса (ААВ), представляющую интерес нуклеотидную последовательность (например, экспрессионную кассету, описанную в данном документе) и второй ITR ААВ, причем указанный первый ITR (5'-ITR) и второй ITR (3'-ITR) симметричны или по существу симметричны по
 20 отношению друг к другу, то есть зкДНК-вектор может содержать последовательности ITR, которые имеют симметричную трехмерную пространственную организацию так, что их структура имеет одинаковую форму в геометрическом пространстве или имеют одинаковые петли А, С-С' и В-В' в трехмерном пространстве. В таком варианте реализации пара симметричных ITR или пара по существу симметричных ITR может
 25 представлять собой модифицированные ITR (например, mod-ITR), которые не являются ITR дикого типа. Пара mod-ITR может иметь одну и ту же последовательность, которая имеет одну или более модификаций относительно ITR дикого типа, и они обратно комплементарны друг другу (инвертированы). Согласно альтернативным вариантам реализации пара модифицированных ITR по существу симметрична, как определено в
 30 данном документе, то есть пара модифицированных ITR может иметь разные последовательности, но соответствующую или одинаковую симметричную трехмерную форму.

(i) ITR дикого типа

[00219] Согласно некоторым вариантам реализации симметричные ITR или по
 35 существу симметричные ITR относятся к дикому типу (WT-ITR), как описано в данном документе. Иными словами, оба ITR имеют последовательность дикого типа, но не обязательно должны представлять собой WT-ITR из одного и того же серотипа ААВ. Иными словами, в некоторых вариантах реализации, один WT-ITR может происходить из одного серотипа ААВ, а другой WT-ITR может происходить из другого серотипа
 40 ААВ. В таком варианте реализации пара WT-ITR по существу симметрична, как определено в данном документе, то есть они могут иметь одну или более консервативных нуклеотидных модификаций, сохраняя при этом симметричную трехмерную пространственную организацию.

[00220] Соответственно, как раскрыто в данном документе, зкДНК-векторы содержат
 45 трансген или гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, расположенные между двумя фланкирующими последовательностями инвертированных концевых повторов дикого типа (WT-ITR), которые либо обратно комплементарны (инвертированы) по отношению друг к другу, либо, альтернативно, являются по

существо симметричными по отношению друг к другу, то есть пара WT-ITR имеет симметричную трехмерную пространственную организацию. Согласно некоторым вариантам реализации последовательность ITR дикого типа (например, WT-ITR AAB) содержит функциональный сайт связывания Rep (RBS; например, 5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3' для AAB2, SEQ ID NO: 60) и функциональный сайт концевой разрешения (TRS; например, 5'-AGTT-3', SEQ ID NO: 62).

[00221] Согласно одному аспекту зкДНК-векторы для экспрессии белка РАН могут быть получены из векторного полинуклеотида, который кодирует гетерологичную нуклеиновую кислоту, функционально расположенную между двумя последовательностями инвертированных концевых повторов WT (WT-ITR) (например, WT-ITR AAB). Иными словами, оба ITR имеют последовательность дикого типа, но не обязательно должны представлять собой WT-ITR из одного и того же серотипа AAB. Иными словами, в некоторых вариантах реализации, один WT-ITR может происходить из одного серотипа AAB, а другой WT-ITR может происходить из другого серотипа AAB. В таком варианте реализации пара WT-ITR по существу симметрична, как определено в данном документе, то есть они могут иметь одну или более консервативных нуклеотидных модификаций, сохраняя при этом симметричную трехмерную пространственную организацию. Согласно некоторым вариантам реализации 5' WT-ITR происходит из одного серотипа AAB, а 3' WT-ITR происходит из того же или другого серотипа AAB. Согласно некоторым вариантам реализации 5' WT-ITR и 3' WT-ITR являются зеркальными отображениями друг друга, то есть они симметричны. Согласно некоторым вариантам реализации 5' WT-ITR и 3' WT-ITR происходят из одного и того же серотипа AAB.

[00222] WT-ITR хорошо известны. Согласно одному варианту реализации два ITR происходят из одного и того же серотипа AAB2. Согласно определенным вариантам реализации можно использовать WT из других серотипов. Существует ряд гомологичных серотипов, например, AAB2, AAB4, AAB6, AAB8. Согласно одному варианту реализации можно применять высокогомологичные ITR (например, ITR со сходной петлевой структурой). Согласно другому варианту реализации можно применять WT-ITR AAB, которые различаются в большей степени, например, AAB2 и AAB5, и еще в одном варианте реализации можно применять ITR, который по существу представляет собой WT, то есть он имеет основную петлевую структуру WT, но некоторые консервативные нуклеотидные изменения, которые не изменяют и не влияют на свойства. При использовании WT-ITR из одного и того же вирусного серотипа можно дополнительно использовать одну или более регуляторных последовательностей. Согласно определенным вариантам реализации регуляторная последовательность представляет собой регуляторный переключатель, который позволяет модулировать активность зкДНК, например, экспрессию кодируемого белка РАН.

[00223] Согласно некоторым вариантам реализации один аспект технологии, описанной в данном документе, относится к зкДНК-вектору для экспрессии белка РАН, причем указанный зкДНК-вектор содержит по меньшей мере одну гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую белок РАН, функционально расположенную между двумя последовательностями инвертированных концевых повторов дикого типа (WT-ITR), при этом указанные WT-ITR могут происходить из одного и того же серотипа, разных серотипов или по существу симметричны по отношению друг к другу (т. е. они имеют симметричную трехмерную пространственную организацию так, что их структура имеет одинаковую форму в геометрическом пространстве, или имеют одинаковые петли А, С-С' и В-В' в трехмерном пространстве).

Согласно некоторым вариантам реализации симметричные WT-ITR содержат функциональный сайт концевой разрешения и сайт связывания Rep. Согласно некоторым вариантам реализации гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты кодирует трансген, и при этом вектор не находится в вирусном капсиде.

5 [00224] Согласно некоторым вариантам реализации WT-ITR являются одинаковыми, но обратно комплементарными по отношению друг к другу. Например, последовательность AACG в 5'-ITR может представлять собой CGTT (т. е. обратно комплементарную последовательность) в 3'-ITR в соответствующем сайте. В одном
10 примере смысловая цепь 5' WT-ITR содержит последовательность ATCGATCG, а соответствующая смысловая цепь 3' WT-ITR содержит CGATCGAT (т. е. обратно комплементарную последовательность ATCGATCG). Согласно некоторым вариантам реализации WT-ITR зкДНК дополнительно содержит сайт концевой разрешения и сайт связывания репликационного белка (RPS) (иногда называемый сайтом связывания репликативного белка), например, сайт связывания Rep.

15 [00225] Примерные последовательности WT-ITR для применения в зкДНК-векторах для экспрессии белка РАН, содержащих WT-ITR, показаны в Таблице 3 в данном документе, которая показывает пары WT-ITR (5' WT-ITR и 3' WT-ITR).

[00226] В качестве иллюстративного примера, согласно настоящему раскрытию предложен зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, содержащий промотор,
20 функционально связанный с трансгеном (например, гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты), с регуляторным переключателем или без него, причем указанная зкДНК лишена капсидных белков и: (а) продуцируется с зкДНК-плазмиды (например, см. ФИГ. 1F-1G), которая кодирует WT-ITR, при этом каждый WT-ITR имеет одинаковое количество внутримолекулярных дуплексных пар оснований
25 в его шпильчатой вторичной конфигурации (предпочтительно, исключая делецию любой концевой петли AAA или TTT в этой конфигурации по сравнению с этими референсными последовательностями), и (b) идентифицирована как зкДНК с использованием анализа для идентификации зкДНК с помощью электрофореза в агарозном геле на нативном геле и в денатурирующих условиях в Примере 1.

30 [00227] Согласно некоторым вариантам реализации фланкирующие WT-ITR по существу симметричны друг другу. Согласно этому варианту реализации 5' WT-ITR может происходить из одного серотипа ААВ, а 3' WT-ITR может происходить из другого серотипа ААВ так, что WT-ITR не являются идентичными обратно комплементарными последовательностями. Например, 5' WT-ITR может происходить из ААВ2, а 3' WT-ITR может происходить из другого серотипа (например, ААВ1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11
35 и 12). Согласно некоторым вариантам реализации WT-ITR могут быть выбраны из двух разных парвовирусов, выбранных из любого из: ААВ1, ААВ2, ААВ3, ААВ4, ААВ5, ААВ6, ААВ7, ААВ8, ААВ9, ААВ10, ААВ11, ААВ12, ААВ13, змеиного парвовируса (например, парвовируса королевского питона), бычьего парвовируса, козьего парвовируса, птичьего парвовируса, лошадиного парвовируса, парвовируса креветок, свиного парвовируса или ААВ насекомых. Согласно некоторым вариантам реализации такая комбинация WT ITR представляет собой комбинацию WT ITR из ААВ2 и ААВ6. Согласно одному варианту реализации WT-ITR являются по существу симметричными, когда один ITR инвертирован относительно другого ITR, который идентичен по меньшей
40 мере на 90%, идентичен по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%...97%...98%...99%...99,5%, включая все промежуточные значения, и имеет одинаковую симметричную трехмерную пространственную организацию. Согласно некоторым вариантам реализации пара WT-ITR по существу симметрична, поскольку

они имеют симметричную трехмерную пространственную организацию, например, имеют одинаковую трехмерную организацию плеч А, С-С', В-В' и D. Согласно одному варианту реализации пара по существу симметричных WT-ITR инвертирована по отношению друг к другу и идентична друг другу по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%...97%...98%...99%...99,5%, включая все промежуточные значения, и один WT-ITR сохраняет сайт связывания Rep (RBS) 5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3' (SEQ ID NO: 60) и сайт концевого разрешения (trs). Согласно некоторым вариантам реализации пара по существу симметричных WT-ITR инвертирована по отношению друг к другу и идентична друг другу по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%...97%...98%...99%...99,5%, включая все промежуточные значения, и один WT-ITR сохраняет сайт связывания Rep (RBS) 5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3' (SEQ ID NO: 60) и сайт концевого разрешения (trs) и в дополнение к вариабельной палиндромной последовательности, обеспечивающей образование шпилечной вторичной структуры. Гомология может быть определена с применением стандартных средств, хорошо известных в данной области техники, таких как BLAST («Basic Local Alignment Search Tool»), BLASTN при настройках по умолчанию.

[00228] Согласно некоторым вариантам реализации структурный элемент ITR может представлять собой любой структурный элемент, который участвует в функциональном взаимодействии ITR с большим белком Rep (например, Rep 78 или Rep 68). Согласно определенным вариантам реализации структурный элемент обеспечивает селективность взаимодействия ITR с большим белком Rep, т. е. определяет, по меньшей мере частично, какой белок Rep функционально взаимодействует с ITR. Согласно другим вариантам реализации структурный элемент физически взаимодействует с большим белком Rep, когда белок Rep связан с ITR. Каждый структурный элемент может представлять собой, например, вторичную структуру ITR, нуклеотидную последовательность ITR, промежуток между двумя или более элементами или комбинацию любого из перечисленных выше. Согласно одному варианту реализации структурные элементы выбраны из группы, состоящей из плеча А и А', плеча В и В', плеча С и С', плеча D, сайта связывания Rep (RBE) и RBE' (т. е. комплементарная последовательность RBE) и сайта концевого разрешения (trs).

[00229] Только в качестве примера, в Таблице 2 указаны примерные комбинации WT-ITR.

[00230] Таблица 2: Примерные комбинации WT-ITR из одного и того же серотипа или разных серотипов, или разных парвовирусов. Показанный порядок не указывает на положение ITR, например, «AAB1, AAB2» демонстрирует, что зкДНК может содержать WT-ITR AAB1 в 5'-положении и WT-ITR AAB2 в 3'-положении или наоборот WT-ITR AAB2 в 5'-положении, а WT-ITR AAB1 в 3'-положении. Сокращения: AAB серотипа 1 (AAB1), AAB серотипа 2 (AAB2), AAB серотипа 3 (AAB3), AAB серотипа 4 (AAB4), AAB серотипа 5 (AAB5), AAB серотипа 6 (AAB6), AAB серотипа 7 (AAB7), AAB серотипа 8 (AAB8), серотипа AAB 9 (AAB9), серотипа AAB 10 (AAB10), серотипа AAB 11 (AAB11) или серотипа AAB 12 (AAB12); геном AABrh8, AABrh10, AAB-DJ и AAB-DJ8 (например, NCBI: NC 002077; NC 001401; NC001729; NC001829; NC006152; NC 006260; NC 006261), ITR из теплокровных животных (птичий AAB (ПААВ), бычий AAB (БААВ), собачий, лошадиный и овечий AAB), ITR из парвовируса В19 (номер доступа в GenBank: NC 000883), мелкого мышиноного вируса (МММ) (номер доступа в GenBank NC 001510); гусь: гусяного парвовируса (номер доступа в GenBank NC 001701); змея: змеиноного парвовируса 1 (номер доступа в GenBank NC 006148).

Таблица 2

	AAB1, AAB1	AAB2, AAB2	AAB3, AAB3	AAB4, AAB4	AAB5, AAB5
	AAB1, AAB2	AAB2, AAB3	AAB3, AAB4	AAB4, AAB5	AAB5, AAB6
	AAB1, AAB3	AAB2, AAB4	AAB3, AAB5	AAB4, AAB6	AAB5, AAB7
	AAB1, AAB4	AAB2, AAB5	AAB3, AAB6	AAB4, AAB7	AAB5, AAB8
5	AAB1, AAB5	AAB2, AAB6	AAB3, AAB7	AAB4, AAB8	AAB5, AAB9
	AAB1, AAB6	AAB2, AAB7	AAB3, AAB8	AAB4, AAB9	AAB5, AAB10
	AAB1, AAB7	AAB2, AAB8	AAB3, AAB9	AAB4, AAB10	AAB5, AAB11
	AAB1, AAB8	AAB2, AAB9	AAB3, AAB10	AAB4, AAB11	AAB5, AAB12
	AAB1, AAB9	AAB2, AAB10	AAB3, AAB11	AAB4, AAB12	AAB5, AABRH8
	AAB1, AAB10	AAB2, AAB11	AAB3, AAB12	AAB4, AABRH8	AAB5, AABRH10
10	AAB1, AAB11	AAB2, AAB12	AAB3, AABRH8	AAB4, AABRH10	AAB5, AAB13
	AAB1, AAB12	AAB2, AABRH8	AAB3, AABRH10	AAB4, AAB13	AAB5, AABDJ
	AAB1, AABRH8	AAB2, AABRH10	AAB3, AAB13	AAB4, AABDJ	AAB5, AABDJ8
	AAB1, AABRH10	AAB2, AAB13	AAB3, AABDJ	AAB4, AABDJ8	AAB5, птичий
	AAB1, AAB13	AAB2, AABDJ	AAB3, AABDJ8	AAB4, птичий	AAB5, бычий
	AAB1, AABDJ	AAB2, AABDJ8	AAB3, птичий	AAB4, бычий	AAB5, собачий
15	AAB1, AABDJ8	AAB2, птичий	AAB3, бычий	AAB4, собачий	AAB5, лошадиный
	AAB1, птичий	AAB2, бычий	AAB3, собачий	AAB4, лошадиный	AAB5, козий
	AAB1, бычий	AAB2, собачий	AAB3, лошадиный	AAB4, козий	AAB5, креветки
	AAB1, собачий	AAB2, лошадиный	AAB3, козий	AAB4, креветки	AAB5, свиной
	AAB1, лошадиный	AAB2, козий	AAB3, креветки	AAB4, свиной	AAB5, насекомых
	AAB1, козий	AAB2, креветки	AAB3, свиной	AAB4, насекомых	AAB5, овечий
20	AAB1, креветки	AAB2, свиной	AAB3, насекомых	AAB4, овечий	AAB5, B19
	AAB1, свиной	AAB2, насекомых	AAB3, овечий	AAB4, B19	AAB5, MVM
	AAB1, насекомых	AAB2, овечий	AAB3, B19	AAB4, MVM	AAB5, гусиный
	AAB1, овечий	AAB2, B19	AAB3, MVM	AAB4, гусиный	AAB5, змеиный
	AAB1, B19	AAB2, MVM	AAB3, гусиный	AAB4, змеиный	
	AAB1, MVM	AAB2, гусиный	AAB3, змеиный		
25	AAB1, гусиный	AAB2, змеиный			
	AAB1, змеиный				
	AAB6, AAB6	AAB7, AAB7	AAB8, AAB8	AAB9, AAB9	AAB10, AAB10
	AAB6, AAB7	AAB7, AAB8	AAB8, AAB9	AAB9, AAB10	AAB10, AAB11
	AAB6, AAB8	AAB7, AAB9	AAB8, AAB10	AAB9, AAB11	AAB10, AAB12
	AAB6, AAB9	AAB7, AAB10	AAB8, AAB11	AAB9, AAB12	AAB10, AABRH8
30	AAB6, AAB10	AAB7, AAB11	AAB8, AAB12	AAB9, AABRH8	AAB10, AABRH10
	AAB6, AAB11	AAB7, AAB12	AAB8, AABRH8	AAB9, AABRH10	AAB10, AAB13
	AAB6, AAB12	AAB7, AABRH8	AAB8, AABRH10	AAB9, AAB13	AAB10, AABDJ
	AAB6, AABRH8	AAB7, AABRH10	AAB8, AAB13	AAB9, AABDJ	AAB10, AABDJ8
	AAB6, AABRH10	AAB7, AAB13	AAB8, AABDJ	AAB9, AABDJ8	AAB10, птичий
	AAB6, AAB13	AAB7, AABDJ	AAB8, AABDJ8	AAB9, птичий	AAB10, бычий
35	AAB6, AABDJ	AAB7, AABDJ8	AAB8, птичий	AAB9, бычий	AAB10, собачий
	AAB6, AABDJ8	AAB7, птичий	AAB8, бычий	AAB9, собачий	AAB10, лошадиный
	AAB6, птичий	AAB7, бычий	AAB8, собачий	AAB9, лошадиный	AAB10, козий
	AAB6, собачий	AAB7, собачий	AAB8, лошадиный	AAB9, козий	AAB10, креветки
	AAB6, лошадиный	AAB7, лошадиный	AAB8, козий	AAB9, креветки	AAB10, свиной
40	AAB6, козий	AAB7, креветки	AAB8, креветки	AAB9, свиной	AAB10, насекомых
	AAB6, креветки	AAB7, свиной	AAB8, свиной	AAB9, насекомых	AAB10, овечий
	AAB6, свиной	AAB7, насекомых	AAB8, насекомых	AAB9, овечий	AAB10, B19
	AAB6, насекомых	AAB7, овечий	AAB8, овечий	AAB9, B19	AAB10, MVM
	AAB6, овечий	AAB7, B19	AAB8, MVM	AAB9, MVM	AAB10, гусиный
	AAB6, B19	AAB7, MVM	AAB8, B19	AAB9, гусиный	AAB10, змеиный
45	AAB6, MVM	AAB7, гусиный	AAB8, змеиный		
	AAB6, гусиный	AAB7, змеиный			
	AAB6, змеиный				
	AAB11, AAB11	AAB12, AAB12	AABRH8, AABRH8	AABRH10, AABRH10	AAB13, AAB13
	AAB11, AAB12	AAB12, AABRH8	AABRH8, AABRH10	AABRH10, AAB13	AAB13, AABDJ

	AAB11, AABRH8	AAB12, AABRH10	AABRH8, AAB13	AABRH10, AABDJ	AAB13, AABDJ8
	AAB11, AABRH10	AAB12, AAB13	AABRH8, AABDJ	AABRH10, AABDJ8	AAB13, птичий
	AAB11, AAB13	AAB12, AABDJ	AABRH8, AABDJ8	AABRH10, птичий	AAB13, бычий
	AAB11, AABDJ	AAB12, AABDJ8	AABRH8, птичий	AABRH10, бычий	AAB13, собачий
5	AAB11, AABDJ8	AAB12, птичий	AABRH8, бычий	AABRH10, собачий	AAB13, лошадиный
	AAB11, птичий	AAB12, бычий	AABRH8, собачий	AABRH10, лошадиный	AAB13, козий
	AAB11, бычий	AAB12, собачий	AABRH8, лошадиный	AABRH10, козий	AAB13, криветки
	AAB11, собачий	AAB12, лошадиный	AABRH8, козий	AABRH10, криветки	AAB13, свиной
	AAB11, лошадиный	AAB12, козий	AABRH8, криветки	AABRH10, свиной	AAB13, насекомых
	AAB11, козий	AAB12, криветки	AABRH8, свиной	AABRH10, насекомых	AAB13, овечий
10	AAB11, криветки	AAB12, свиной	AABRH8, насекомых	AABRH10, овечий	AAB13, B19
	AAB11, свиной	AAB12, насекомых	AABRH8, овечий	AABRH10, B19	AAB13, MVM
	AAB11, насекомых	AAB12, овечий	AABRH8, B19	AABRH10, MVM	AAB13, гусиный
	AAB11, овечий	AAB12, B19	AABRH8, MVM	AABRH10, гусиный	AAB13, змеиный
	AAB11, B19	AAB12, MVM	AABRH8, гусиный	AABRH10, змеиный	
	AAB11, MVM	AAB12, гусиный	AABRH8, змеиный		
15	AAB11, гусиный	AAB12, змеиный			
	AAB11, змеиный				
	AABDJ, AABDJ	AABDJ8, AVVDJ8	птичий, птичий	бычий, бычий	собачий, собачий
	AABDJ, AABDJ8	AABDJ8, птичий	птичий, бычий	бычий, собачий	собачий, лошадиный
	AABDJ, птичий	AABDJ8, бычий	птичий, собачий	бычий, лошадиный	собачий, козий
	AABDJ, бычий	AABDJ8, собачий	птичий, лошадиный	бычий, козий	собачий, криветки
20	AABDJ, собачий	AABDJ8, лошадиный	птичий, козий	бычий, криветки	собачий, свиной
	AABDJ, лошадиный	AABDJ8, козий	птичий, криветки	бычий, свиной	собачий, насекомых
	AABDJ, козий	AABDJ8, криветки	птичий, свиной	бычий, насекомых	собачий, овечий
	AABDJ, криветки	AABDJ8, свиной	птичий, насекомых	бычий, овечий	собачий, B19
	AABDJ, свиной	AABDJ8, насекомых	птичий, овечий	бычий, B19	собачий, MVM
	AABDJ, насекомых	AABDJ8, овечий	птичий, B19	бычий, MVM	собачий, гусиный
25	AABDJ, овечий	AABDJ8, B19	птичий, MVM	бычий, гусиный	собачий, змеиный
	AABDJ, B19	AABDJ8, MVM	птичий, гусиный	бычий, змеиный	
	AABDJ, MVM	AABDJ8, гусиный	птичий, змеиный		
	AABDJ, гусиный	AABDJ8, змеиный			
	AABDJ, змеиный				
30	лошадиный, лошадиный	козий, козий	криветки, криветки	свиной, свиной	насекомых, насекомых
	лошадиный, козий	козий, криветки	криветки, свиной	свиной, насекомых	насекомых, овечий
	лошадиный, криветки	козий, свиной	криветки, насекомых	свиной, овечий	насекомых, B19
	лошадиный, свиной	козий, насекомых	криветки, овечий	свиной, B19	насекомых, MVM
	лошадиный, насекомых	козий, овечий	криветки, B19	свиной, MVM	насекомых, гусиный
	лошадиный, овечий	козий, B19	криветки, MVM	свиной, гусиный	насекомых, змеиный
35	лошадиный, B19	козий, MVM	криветки, гусиный	свиной, змеиный	
	лошадиный, MVM	козий, гусиный	криветки, змеиный		
	лошадиный, гусиный	козий, змеиный			
	лошадиный, змеиный				
	овечий, овечий	B19, B19	MVM, MVM	гусиный, гусиный	змеиный, змеиный
	овечий, B19	B19, MVM	MVM, гусиный	гусиный, змеиный	
40	овечий, MVM	B19, гусиный	MVM, змеиный		
	овечий, гусиный	B19, змеиный			
	овечий, змеиный				

[00231] Только в качестве примера, в Таблице 3 показаны последовательности примерных WT-ITR из некоторых различных серотипов AAB.

Таблица 3

Серотип ААВ	5' WT-ITR (ЛЕВЫЙ)	3' WT-ITR (ПРАВЫЙ)
5 ААВ1	5'- TTGCCCACTCCCTCTCTGCGCGCT CGCTCGCTCGGTGGGGCCTGCGG ACCAAAGGTCCGCAGACGGCAGA GGTCTCCTCTGCCGCCCCACCGA GCGAGCGACGCGCGCAGAGAGGG AGTGGGCAACTCCATCACTAGGG ТАА-3' (SEQ ID NO: 5)	5'- TTACCCTAGTGATGGAGTTGCCCACT CCCTCTCTGCGCGCGTCGCTCGCTCG GTGGGGCCGGCAGAGGAGACCTCTG CCGTCTGCGGACCTTTGGTCCGCAGG CCCCACCGAGCGAGCGAGCGCGCAG AGAGGGAGTGGGCAA-3' (SEQ ID NO: 10)
10 ААВ2	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGCCCCGGGCA AAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTT TGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCG AGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG GCCAACTCCATCACTAGGGGTTC T (SEQ ID NO: 2)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGC CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGT CGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGG GCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC GCAGctgcctgcagg (SEQ ID NO: 1)
15 ААВ3	5'- TTGGCCACTCCCTCTATGCGCACT CGCTCGCTCGGTGGGGCCTGGCG ACCAAAGGTTCGCCAGACGGACGT GGGTTTCCACGTCCGGCCCCACCG AGCGAGCGAGTGCGCATAGAGGG AGTGGCCA ACTCCATCACTAGAG GTAT-3' (SEQ ID NO: 6)	5'- ATACCTCTAGTGATGGAGTTGGCCAC TCCCTCTATGCGCACTCGCTCGCTCG GTGGGGCCGGACGTGGAAACCCACG TCCGTCTGGCGACCTTTGGTCCGAG GCCCCACCGAGCGAGCGAGTGCGCA TAGAGGGAGTGGCCAA-3' (SEQ ID NO: 11)
20 ААВ4	5'- TTGGCCACTCCCTCTATGCGCGCT CGCTCACTCACTCGGCCCTGGAGA CCAAAGGTCTCCAGACTGCCGGC CTCTGGCCGGCAGGGCCGAGTGA GTGAGCGAGCGCGCATAGAGGGA GTGGCCA ACT-3' (SEQ ID NO: 7)	5'- AGTTGGCCACATTAGCTATGCGCGCT CGCTCACTCACTCGGCCCTGGAGACC AAAGGTCTCCAGACTGCCGGCCTCTG GCCGGCAGGGCCGAGTGAGTGAGCG AGCGCGCATAGAGGGAGTGGCCAA- 3' (SEQ ID NO: 12)
25 ААВ5	5'- TCCCCCTGTGCGGTTGCTCGCTCGCT CGCTGGCTCGTTTGGGGGGGCGA CGGCCAGAGGGCCGTCGTCTGGC AGCTCTTTGAGCTGCCACCCCCC AAACGAGCCAGCGAGCGAGCGAA CGCGACAGGGGGGAGAGTGCCAC ACTCTCAAGCAAGGGGGTTTTGTA AG -3' (SEQ ID NO: 8)	5'- CTTACAAAACCCCTTGCTTGAGAGT GTGGCACTCTCCCCCTGTGCGGTT GCTCGCTCGCTGGCTCGTTTGGGGGG GTGGCAGCTCAAAGAGCTGCCAGAC GACGGCCCTTGCCCGTCGCCCCCCC AAACGAGCCAGCGAGCGAGCGAACG CGACAGGGGGGA-3' (SEQ ID NO: 13)
30 ААВ6	5'- TTGCCCACTCCCTCTAATGCGCGC TCGCTCGCTCGGTGGGGCCTGCGG ACCAAAGGTCCGCAGACGGCAGA GGTCTCCTCTGCCGCCCCACCGA GCGAGCGAGCGCGCATAGAGGGA GTGGGCAACTCCATCACTAGGGG TAT-3' (SEQ ID NO: 9)	5'- ATACCCCTAGTGATGGAGTTGCCAC TCCCTCTATGCGCGCTCGCTCGCTCG GTGGGGCCGGCAGAGGAGACCTCTG CCGTCTGCGGACCTTTGGTCCGCAGG CCCCACCGAGCGAGCGAGCGCGCAT TAGAGGGAGTGGGCAA (SEQ ID NO: 14)
35 ААВ5	5'- TCCCCCTGTGCGGTTGCTCGCTCGCT CGCTGGCTCGTTTGGGGGGGCGA CGGCCAGAGGGCCGTCGTCTGGC AGCTCTTTGAGCTGCCACCCCCC AAACGAGCCAGCGAGCGAGCGAA CGCGACAGGGGGGAGAGTGCCAC ACTCTCAAGCAAGGGGGTTTTGTA AG -3' (SEQ ID NO: 8)	5'- CTTACAAAACCCCTTGCTTGAGAGT GTGGCACTCTCCCCCTGTGCGGTT GCTCGCTCGCTGGCTCGTTTGGGGGG GTGGCAGCTCAAAGAGCTGCCAGAC GACGGCCCTTGCCCGTCGCCCCCCC AAACGAGCCAGCGAGCGAGCGAACG CGACAGGGGGGA-3' (SEQ ID NO: 13)
40 ААВ6	5'- TTGCCCACTCCCTCTAATGCGCGC TCGCTCGCTCGGTGGGGCCTGCGG ACCAAAGGTCCGCAGACGGCAGA GGTCTCCTCTGCCGCCCCACCGA GCGAGCGAGCGCGCATAGAGGGA GTGGGCAACTCCATCACTAGGGG TAT-3' (SEQ ID NO: 9)	5'- ATACCCCTAGTGATGGAGTTGCCAC TCCCTCTATGCGCGCTCGCTCGCTCG GTGGGGCCGGCAGAGGAGACCTCTG CCGTCTGCGGACCTTTGGTCCGCAGG CCCCACCGAGCGAGCGAGCGCGCAT TAGAGGGAGTGGGCAA (SEQ ID NO: 14)
45 ААВ6	5'- TTGCCCACTCCCTCTAATGCGCGC TCGCTCGCTCGGTGGGGCCTGCGG ACCAAAGGTCCGCAGACGGCAGA GGTCTCCTCTGCCGCCCCACCGA GCGAGCGAGCGCGCATAGAGGGA GTGGGCAACTCCATCACTAGGGG TAT-3' (SEQ ID NO: 9)	5'- ATACCCCTAGTGATGGAGTTGCCAC TCCCTCTATGCGCGCTCGCTCGCTCG GTGGGGCCGGCAGAGGAGACCTCTG CCGTCTGCGGACCTTTGGTCCGCAGG CCCCACCGAGCGAGCGAGCGCGCAT TAGAGGGAGTGGGCAA (SEQ ID NO: 14)

[00232] Согласно некоторым вариантам реализации нуклеотидная последовательность последовательности WT-ITR может быть модифицирована (например, путем модификации 1, 2, 3, 4 или 5 или более нуклеотидов или любого их диапазона), при этом

указанная модификация представляет собой замену комплементарным нуклеотидом, например, G для C, и наоборот, и T для A, и наоборот.

[00233] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН не имеет WT-ITR, состоящего из нуклеотидной последовательности, выбранной из любой из: SEQ ID NO: 1, 2, 5-14. Согласно альтернативным вариантам реализации настоящего изобретения, если зкДНК-вектор имеет WT-ITR, содержащий нуклеотидную последовательность, выбранную из любой из: SEQ ID NO: 1, 2, 5-14, то фланкирующий ITR также представляет собой WT, и зкДНК-вектор содержит регуляторный переключатель, например, как раскрыто в данном документе и в международной заявке PCT/US18/49996 (например, см. Таблицу 11 PCT/US18/49996, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки). Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН содержит регуляторный переключатель, как раскрыто в данном документе, и выбранный WT-ITR, имеющий нуклеотидную последовательность, выбранную из любой из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1, 2, 5-14.

[00234] ЗкДНК-вектор, для экспрессии белка РАН, описанный в данном документе, может включать структуры WT-ITR, которые сохраняют функциональные части RBE, trs и RBE'. ФИГ. 2А и ФИГ. 2В, с использованием ITR дикого типа для иллюстративных целей, показывают один возможный механизм функционирования сайта trs внутри части структуры ITR дикого типа зкДНК-вектора. Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН содержит одну или более функциональных полинуклеотидных последовательностей WT-ITR, которые содержат Rep-связывающий сайт (RBS; 5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3' (SEQ ID NO: 60) для AAB2) и сайт концевое разрешения (TRS; 5'-AGTT (SEQ ID NO: 62)). Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере один WT-ITR является функциональным. Согласно альтернативным вариантам реализации, в которых зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН содержит два WT-ITR, которые по существу симметричны друг другу, по меньшей мере один WT-ITR является функциональным и по меньшей мере один WT-ITR является нефункциональным.

В. Модифицированные ITR (mod-ITR) в целом для зкДНК-векторов, содержащих пары асимметричных ITR или пары симметричных ITR

[00235] Как обсуждается в данном документе, зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН может содержать пару симметричных ITR или пару асимметричных ITR. В обоих случаях один или оба из ITR могут представлять собой модифицированные ITR - различие заключается в том, что в первом случае (то есть симметричные mod-ITR), mod-ITR имеют одинаковую трехмерную пространственную организацию (т. е. имеют одинаковые конфигурации плеча A-A', C-C' и B-B'), в то время как во втором случае (т. е. асимметричные mod-ITR), mod-ITR имеют разную трехмерную пространственную организацию (т. е. имеют разную конфигурацию плеч A-A', C-C' и B-B').

[00236] Согласно некоторым вариантам реализации модифицированный ITR представляет собой ITR, который модифицирован путем делеции, вставки и/или замены по сравнению с последовательностью ITR дикого типа (например, ITR AAB). Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере один из ITR в зкДНК-векторе содержит функциональный сайт связывания Rep (RBS; например, 5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3' для AAB2, SEQ ID NO 60) и функциональный сайт концевое разрешения (TRS; например, 5'-AGTT-3', SEQ ID NO: 62.) В одном варианте реализации по меньшей мере один из ITR представляет собой нефункциональный ITR. Согласно одному варианту реализации не каждый из разных или модифицированных ITR

представляет собой ITR дикого типа из разных серотипов.

[00237] Конкретные изменения и мутации в ITR подробно описаны в данном документе, но в контексте ITR «измененный», «мутированный» или «модифицированный» указывает на то, что нуклеотиды были вставлены, удалены и/или заменены относительно дикого типа, референса или исходной последовательности ITR. Измененный или мутированный ITR может представлять собой сконструированный ITR. В данном документе термин «сконструированный» относится к аспекту манипулирования человеком. Например, полипептид считается «сконструированным», когда по меньшей мере один аспект полипептида, например, его последовательность, подвергся манипуляции человеком, чтобы отличаться от аспекта, который существует в природе.

[00238] Согласно некоторым вариантам реализации mod-ITR может быть синтетическим. Согласно одному варианту реализации синтетический ITR основан на последовательностях ITR более чем из одного серотипа AAB. Согласно другому варианту реализации синтетический ITR не включает последовательность на основе AAB. В еще одном варианте реализации синтетический ITR сохраняет структуру ITR, описанную выше, хотя имеет только некоторую часть последовательности, полученной из AAB, или не имеет ее. Согласно некоторым аспектам синтетический ITR преимущественно может взаимодействовать с Rep дикого типа или Rep конкретного серотипа, или в некоторых случаях не будет распознаваться Rep дикого типа и будет распознаваться только мутированным Rep.

[00239] Квалифицированный специалист может определить соответствующую последовательность в других серотипах с помощью известных средств. Например, определение того, происходит ли изменение в области A, A', B, B', C, C' или D, и определение соответствующей области в другом серотипе. Для определения соответствующей последовательности можно использовать BLAST[®] (Basic Local Alignment Search Tool) или другие программы гомологического выравнивания с параметрами по умолчанию. Согласно настоящему изобретению также предложены популяции и множество зкДНК-векторов, содержащих mod-ITR из комбинации различных серотипов AAB, то есть один mod-ITR может происходить из одного серотипа AAB, а другой mod-ITR может происходить из другого серотипа. Не ограничиваясь какой-либо теорией, согласно одному варианту реализации один ITR может происходить или основываться на последовательности ITR AAB2, а другой ITR зкДНК-вектора может происходить или основываться на любой одной или более последовательностях ITR AAB серотипа 1 (AAB1), AAB серотипа 4 (AAB4), AAB серотипа 5 (AAB5), AAB серотипа 6 (AAB6), AAB серотипа 7 (AAB7), AAB серотипа 8 (AAB8), AAB серотипа 9 (AAB9), AAB серотипа 10 (AAB10), AAB серотипа 11 (AAB11) или AAB серотипа 12 (AAB12).

[00240] Любой ITR парвовируса можно применять в качестве ITR или основного ITR для модификации. Предпочтительно парвовирус представляет собой депендовирус. Более предпочтительно AAB. Выбранный серотип может быть основан на тканевом тропизме серотипа. AAB2 обладает широким тканевым тропизмом, AAB1 преимущественно нацелен на нейроны и скелетные мышцы, а AAB5 преимущественно нацелен на нейроны, пигментный эпителий сетчатки и фоторецепторы. AAB6 преимущественно нацелен на скелетные мышцы и легкие. AAB8 преимущественно нацелен на печень, скелетные мышцы, сердце и ткани поджелудочной железы. AAB9 преимущественно нацелен на печень, скелетную и легочную ткань. Согласно одному варианту реализации модифицированный ITR основан на ITR AAB2.

[00241] Более конкретно, способность структурного элемента функционально взаимодействовать с конкретным большим белком Rep может быть изменена путем модификации структурного элемента. Например, нуклеотидная последовательность структурного элемента может быть модифицирована по сравнению с последовательностью ITR дикого типа. Согласно одному варианту реализации структурный элемент (например, плечо А, плечо А', плечо В, плечо В', плечо С, плечо С', плечо D, RBE, RBE' и trs) ITR можно удалить и заменить структурным элементом дикого типа из другого парвовируса. Например, заменяющая структура может происходить из AAB1, AAB2, AAB3, AAB4, AAB5, AAB6, AAB7, AAB8, AAB9, AAB10, AAB11, AAB12, AAB13, змеиногo парвовируса (например, парвовируса королевского питона), бычьего парвовируса, козьего парвовируса, птичьего парвовируса, собачьего парвовируса, лошадиного парвовируса, парвовируса креветок, свиного парвовируса или AAB насекомых. Например, ITR может представлять собой ITR AAB2, а плечо А или А' или RBE могут быть заменены структурным элементом из AAB5. В другом примере ITR может представлять собой ITR AAB5, а плечи С или С', RBE и trs могут быть заменены структурным элементом из AAB2. В другом примере ITR AAB может представлять собой ITR AAB5, в котором плечи В и В' заменены В и В' ITR AAB2.

[00242] Только в качестве примера, в Таблице 4 указаны примерные модификации по меньшей мере одного нуклеотида (например, делеция, вставка и/или замена) в областях модифицированного ITR, где X указывает на модификацию по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты (например, делецию, вставку и/или замену) в этом участке относительно соответствующего ITR дикого типа. Согласно некоторым вариантам реализации любая модификация по меньшей мере одного нуклеотида (например, делеция, вставка и/или замена) в любой из областей С и/или С', и/или В, и/или В' сохраняет три последовательных нуклеотида Т (т. е. ТТТ) по меньшей мере в одной концевой петле. Например, если модификация приводит к получению любого из: одноплечевого ITR (например, одно плечо С-С' или одно плечо В-В'), или модифицированного плеча С-В' или плеча С'-В, или двухплечевого ITR по меньшей мере с одним усеченным плечом (например, усеченным плечом С-С' и/или усеченным плечом В-В'), по меньшей мере одно плечо или по меньшей мере одно из двух плеч ITR (где одно плечо может быть усечено) сохраняет три последовательных нуклеотида Т (т. е. ТТТ) по меньшей мере в одной концевой петле. Согласно некоторым вариантам реализации усеченное плечо С-С' и/или усеченное плечо В-В' имеет три последовательных Т-нуклеотида (т. е. ТТТ) в концевой петле.

[00243] Таблица 4: Примерные комбинации модификаций по меньшей мере одного нуклеотида (например, делеция, вставка и/или замена) в различных областях или плечах В-В' и С-С' ITR (X указывает модификацию нуклеотида, например, добавление, делецию или замену по меньшей мере одного нуклеотида в области).

Область В	Область В'	Область С	Область С'
X			
	X		
X	X		
		X	
			X
		X	X
X		X	
X			X
	X	X	
	X		X

X	X	X	
X	X		X
X		X	X
	X	X	X
X	X	X	X

5

[00244] Согласно некоторым вариантам реализации mod-ITR для применения в зкДНК-векторе для экспрессии белка РАН содержит пару асимметричных ITR или пару симметричных mod-ITR, как раскрыто в данном документе, может содержать любую из комбинаций модификаций, показанных в Таблице 4, а также модификацию по меньшей мере одного нуклеотида в любой одной или более областях, выбранных из: между A' и C, между C и C', между C' и B, между B и B' и между B' и A. Согласно некоторым вариантам реализации любая модификация по меньшей мере одного нуклеотида (например, делеция, вставка и/или замена) в областях C или C', B или B' по-прежнему сохраняет концевую петлю структуры стебель-петля. Согласно некоторым вариантам реализации любая модификация по меньшей мере одного нуклеотида (например, делеция, вставка и/или замена) между C и C' и/или B и B' сохраняет три последовательных нуклеотида T (т. е. TTT) по меньшей мере в одной концевой петле. Согласно альтернативным вариантам реализации любая модификация по меньшей мере одного нуклеотида (например, делеция, вставка и/или замена) между C и C' и/или B и B' сохраняет три последовательных нуклеотида A (т. е. AAA) по меньшей мере в одной концевой петле. Согласно некоторым вариантам реализации модифицированный ITR для применения в настоящем изобретении может содержать любую из комбинаций модификаций, показанных в Таблице 4, а также модификацию по меньшей мере одного нуклеотида (например, делецию, вставку и/или замену) в любой одной или более из областей, выбранных из: A', A и/или D. Например, в некоторых вариантах реализации, модифицированный ITR для применения в настоящем изобретении может содержать любую из комбинаций модификаций, показанных в Таблице 4, а также модификацию по меньшей мере одного нуклеотида (например, делецию, вставку и/или замену) в области A. Согласно некоторым вариантам реализации модифицированный ITR для применения в настоящем изобретении может содержать любую из комбинаций модификаций, показанных в Таблице 4, а также модификацию по меньшей мере одного нуклеотида (например, делецию, вставку и/или замену) в области A'. Согласно некоторым вариантам реализации модифицированный ITR для применения в настоящем изобретении может содержать любую из комбинаций модификаций, показанных в Таблице 4, а также модификацию по меньшей мере одного нуклеотида (например, делецию, вставку и/или замену) в области A и/или A'. Согласно некоторым вариантам реализации модифицированный ITR для применения в настоящем изобретении может содержать любую из комбинаций модификаций, показанных в Таблице 4, а также модификацию по меньшей мере одного нуклеотида (например, делецию, вставку и/или замену) в области D.

40

[00245] Согласно одному варианту реализации нуклеотидная последовательность структурного элемента может быть модифицирована (например, путем модификации 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 или более нуклеотидов или любого их диапазона) для получения модифицированного структурного элемента. Согласно одному варианту реализации конкретные модификации ITR приведены в данном документе в качестве примеров (например, SEQ ID NO: 3, 4, 15-47, 101-116 или 165-187, или показанные на ФИГ. 7A-7B из PCT/US2018/064242, поданной 6 декабря 2018 г. (например, SEQ ID NO 97-98, 101-103, 105-108, 111-112, 117-134, 545-54 в PCT/US2018/064242). Согласно некоторым вариантам реализации ITR может быть

45

модифицирован (например, путем модификации 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 или более нуклеотидов или любого их диапазона). Согласно другим вариантам реализации ITR может иметь по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности последовательности с одним из модифицированных ITR, имеющих SEQ ID NO: 3, 4, 15-47, 101-116 или 165-187, или с участком, содержащий RBE, плеча A-A' и плеч C-C' и B-B', имеющих SEQ ID NO: 3, 4, 15-47, 101-116 или 165-187, или показанных в Таблицах 2-9 (т. е. SEQ ID NO: 110-112, 115-190, 200-468) международной заявки PCT/US18/49996, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[00246] Согласно некоторым вариантам реализации модифицированный ITR может, например, содержать удаление или делецию всего конкретного плеча, например, всего или части плеча A-A', или всего или части плеча B-B', или всего или части плеча C-C', или, альтернативно, удаление 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более пар оснований, образующих стебель петли, при условии, что конечная петля, кэпирующая стебель (например, одно плечо), все еще присутствует (например, см. ITR-21 на ФИГ. 7A из PCT/US2018/064242, поданной 6 декабря 2018 г., полностью включенной в данный документ посредством ссылки). Согласно некоторым вариантам реализации модифицированный ITR может содержать удаление 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более пар оснований из плеча B-B'. Согласно некоторым вариантам реализации модифицированный ITR может содержать удаление 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более пар оснований из плеча C-C' (см., например, ITR-1 на ФИГ. 3B или ITR-45 на ФИГ. 7A из PCT/US2018/064242, поданной 6 декабря 2018 г., полностью включенной в данный документ посредством ссылки). Согласно некоторым вариантам реализации модифицированный ITR может содержать удаление 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более пар оснований из плеча C-C' и удаление 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более пар оснований из плеча B-B'. Предусмотрена любая комбинация удаления пар оснований, например, могут быть удалены 6 пар оснований в плече C-C' и 2 пары оснований в плече B-B'. В качестве иллюстративного примера, ФИГ. 3B показывает примерный модифицированный ITR по меньшей мере с 7 парами оснований, удаленными из каждой из части C и части C', заменой нуклеотида в петле между областями C и C' и делецией по меньшей мере одной пары оснований из каждой из области B и областей B' так, что модифицированный ITR содержит два плеча, из которых по меньшей мере одно плечо (например, C-C') усечено. Согласно некоторым вариантам реализации модифицированный ITR также содержит делецию по меньшей мере одной пары оснований из каждой из области B и областей B' так, что плечо B-B' также усечено относительно WT-ITR.

[00247] Согласно некоторым вариантам реализации модифицированный ITR может иметь от 1 до 50 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50) делеций нуклеотидов относительно полноразмерной последовательности ITR дикого типа. Согласно некоторым вариантам реализации модифицированный ITR может иметь от 1 до 30 делеций нуклеотидов относительно полноразмерной последовательности WT-ITR. Согласно некоторым вариантам реализации модифицированный ITR имеет от 2 до 20 делеций нуклеотидов относительно полноразмерной последовательности ITR дикого типа.

[00248] Согласно некоторым вариантам реализации модифицированный ITR не содержит никаких делеций нуклеотидов в RBE-содержащей части областей A или A', чтобы не препятствовать репликации ДНК (например, связывание RBE белком Rep

или образование одноцепочечного разрыва в сайте концевой разрешения). Согласно некоторым вариантам реализации модифицированный ITR, предусмотренный для применения в данном документе, имеет одну или более делеций в области В, В', С и/или С, как описано в данном документе.

5 [00249] Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, содержащий пару симметричных ITR или пару асимметричных ITR, содержит регуляторный переключатель, как раскрыто в данном документе, и по меньшей мере один выбранный модифицированный ITR, имеющий нуклеотидную последовательность, выбранную из любой из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 3, 4, 15-47, 101-116 или 165-
10 187.

[00250] Согласно другому варианту реализации структура структурного элемента может быть модифицирована. Например, структурный элемент имеет изменение высоты стебля и/или количества нуклеотидов в петле. Например, высота стебля может составлять примерно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 нуклеотидов или более или любое значение
15 в пределах указанного диапазона. Согласно одному варианту реализации высота стебля может составлять от примерно 5 нуклеотидов до примерно 9 нуклеотидов и он функционально взаимодействует с Rep. Согласно другому варианту реализации высота стебля может составлять примерно 7 нуклеотидов и он функционально взаимодействует с Rep. В другом примере петля может иметь 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов или
20 более или любое значение в пределах указанного диапазона.

[00251] Согласно другому варианту реализации количество сайтов связывания GAGY или родственных GAGY сайтов связывания в RBE или продленном RBE может быть увеличено или уменьшено. В одном примере RBE или продленный RBE может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или 6 или более сайтов связывания GAGY или любое значение в пределах
25 указанного диапазона. Каждый сайт связывания GAGY может независимо представлять собой точную последовательность GAGY или последовательность, сходную с GAGY, при условии, что последовательность достаточна для связывания белка Rep.

[00252] Согласно другому варианту реализации расстояние между двумя элементами (такими как, но не ограничиваясь перечисленными, RBE и шпилька) может быть
30 изменено (например, увеличено или уменьшено) для изменения функционального взаимодействия с большим белком Rep. Например, расстояние может составлять примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 нуклеотид или более или любое значение в пределах указанного диапазона.

[00253] зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, описанный в данном документе,
35 может включать структуру ITR, которая модифицирована относительно структуры ITR дикого типа ААВ2, раскрытой в данном документе, но все еще сохраняет функциональную часть RBE, trs и RBE'. ФИГ. 2А и ФИГ. 2В показывают один возможный механизм функционирования сайта trs внутри части структуры ITR дикого типа зкДНК-вектора для экспрессии белка РАН. Согласно некоторым вариантам
40 реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН содержит одну или более функциональных полинуклеотидных последовательностей ITR, которые содержат сайт связывания Rep (RBS; 5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3' (SEQ ID NO: 60) для ААВ2) и сайт концевой разрешения (TRS; 5'-AGTT (SEQ ID NO: 62)). Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере один ITR (wt или модифицированный ITR) является
45 функциональным. Согласно альтернативным вариантам реализации, когда зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН содержит два модифицированных ITR, которые отличаются или асимметричны по отношению друг к другу, по меньшей мере один модифицированный ITR является функциональным и по меньшей мере один

модифицированный ITR является нефункциональным.

[00254] Согласно некоторым вариантам реализации модифицированный ITR (например, левый или правый ITR) зкДНК-вектора для экспрессии белка РАН, как описано в данном документе, имеет модификации в плече петли, усеченном плече или спейсере. Примерные последовательности ITR, имеющие модификации в плече петли, усеченном плече или спейсере, перечислены в Таблице 2 (т. е. SEQ ID NO: 135-190, 200-233); Таблице 3 (например, SEQ ID NO: 234-263); Таблице 4 (например, SEQ ID NO: 264-293); Таблице 5 (например, SEQ ID NO: 294-318 в данном документе); Таблице 6 (например, SEQ ID NO: 319-468); и Таблице 7-9 (например, SEQ ID NO: 101-110, 111-112, 115-134) или в Таблице 10А или 10В (например, SEQ ID NO: 9, 100, 469-483, 484-499) международной заявки РСТ/US18/49996, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[00255] Согласно некоторым вариантам реализации модифицированный ITR для применения в зкДНК-векторе для экспрессии белка РАН, содержащем пару асимметричных ITR или пару симметричных mod-ITR, выбирают из любых или из комбинации ITR, приведенных в Таблицах 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10А-10В международной заявки РСТ/US18/49996, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[00256] Дополнительные примерные модифицированные ITR для применения в зкДНК-векторе для экспрессии белка РАН, содержащем пару асимметричных ITR или пару симметричных mod-ITR в каждом из указанных выше классов, представлены в Таблицах 5А и 5В. Прогнозируемая вторичная структура правых модифицированных ITR в Таблице 5А показана на ФИГ. 7А международной заявки РСТ/US2018/064242, поданной 6 декабря 2018 г., и прогнозируемая вторичная структура левых модифицированных ITR в Таблице 5В показана на ФИГ. 7В международной заявки РСТ/US2018/064242, поданной 6 декабря 2018 г., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[00257] В Таблице 5А и Таблице 5В показаны примерные правые и левые модифицированные ITR.

[00258] Таблица 5А: Примерные модифицированные правые ITR. Эти примерные модифицированные правые ITR могут содержать RBE GCGCGCTCGCTCGCTC-3' (SEQ ID NO: 60), спейсер ACTGAGGC (SEQ ID NO: 69), комплементарную последовательность спейсера GCCTCAGT (SEQ ID NO: 70) и RBE' (т. е. комплементарную последовательность RBE) GAGCGAGCGAGCGCGC (SEQ ID NO: 71).

Таблица 5А: Примерные правые модифицированные ITR		
Конструкция ITR	Последовательность	SEQ ID NO:
ITR-18 Правый	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAG GCGCACGCCCGGGTTTCCCGGGCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGC AGG	15
ITR-19 Правый	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAG GCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCT GCAGG	16
ITR-20 Правый	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAG GCCGGGCGACCAAAGTTCGCCCGACGCCCGGGCGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA GCTGCCTGCAGG	17
ITR-21 Правый	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAG GCTTTGCCCTCAGTGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	18
ITR-22 Правый	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAG GCCGGGCGACAAAGTTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	19
ITR-23 Правый	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAG GCCGGGCGAAAATCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	20

5	ITR-24 Правый	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGTCACTGAG GCCGGGGCAAACGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAG CGCGCAGCTGCCTGCAGG	21
	ITR-25 Правый	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGTCACTGAG GCCGGGGCAAAGGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCG CGCAGTGCCTGCAGG	22
	ITR-26 Правый	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGTCACTGAG GCCGGGGGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGTTTCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	23
	ITR-27 Правый	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGTCACTGAG GCCGGGGGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGTTTCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	24
10	ITR-28 Правый	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGTCACTGAG GCCGGGGGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGTTTCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAG CGCGCAGCTGCCTGCAGG	25
	ITR-29 Правый	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGTCACTGAG GCCGGGGGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCTTTGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCG CGCAGTGCCTGCAGG	26
	ITR-30 Правый	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGTCACTGAG GCCGGGGGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCTTTGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCG CAGTGCCTGCAGG	27
15	ITR-31 Правый	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGTCACTGAG GCCGGGGGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCTTTGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA GCTGCCTGCAGG	28
	ITR-32 Правый	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGTCACTGAG GCCGGGGGACCAAAGGTCGCCCGACGTTTCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGC TGCTGCAGG	29
20	ITR-49 Правый	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGTCACTGAG GCCGGGGGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCTTTGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGTGCCT GCAGG	30
	ITR-50 Правый	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGTCACTGAG GCCGGGGGACCAAAGGTCGCCCGACGCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC AGTGCCTGCAGG	31

[00259] Таблица 5В: Примерные модифицированные левые ITR. Эти примерные модифицированные левые ITR могут содержать RBE GCGCGCTCGTCTCGTCTC-3' (SEQ ID NO: 60), спейсер ACTGAGGC (SEQ ID NO: 69), комплементарную последовательность спейсера GCCTCAGT (SEQ ID NO: 70) и комплементарную последовательность RBE (т. е. RBE') GAGCGAGCGAGCGCGC (SEQ ID NO: 71).

Таблица 5В: Примерные модифицированные левые ITR			
30	ITR-33 Левый	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGTCTCGTCACTGAGGCCGCCGGGAAACCCGGGCGTGCGCCT CAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTCT	32
	ITR-34 Левый	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGTCTCGTCACTGAGGCCGTCGGGCGACCTTTGGTTCGCCCGGCC TCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTCT	33
	ITR-35 Левый	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGTCTCGTCACTGAGGCCGCCGGGAAAGCCCGGGCGTTCGGC CTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTCT	34
35	ITR-36 Левый	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGTCTCGTCACTGAGGCCGCCGGGCGTTCGGGCGACCTTTGGTTCG CCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCT CT	35
	ITR-37 Левый	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGTCTCGTCACTGAGGCCAAAGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCG CAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTCT	36
	ITR-38 Левый	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGTCTCGTCACTGAGGCCGCCGGGAAAGCCCGGGCGTTCGGG CGACTTTGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATC ACTAGGGGTTCTCT	37
40	ITR-39 Левый	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGTCTCGTCACTGAGGCCGCCGGGAAAGCCCGGGCGTTCGGG CGATTTTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCAC TAGGGGTTCTCT	38
	ITR-40 Левый	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGTCTCGTCACTGAGGCCGCCGGGAAAGCCCGGGCGTTCGGG CGTTTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTA GGGGTTCTCT	39
45	ITR-41 Левый	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGTCTCGTCACTGAGGCCGCCGGGAAAGCCCGGGCGTTCGGG CTTTGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGG GGTTCTCT	40
	ITR-42 Левый	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGTCTCGTCACTGAGGCCGCCGGGAAACCCGGGCGTTCGGGCG ACCTTTGGTTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATC ACTAGGGGTTCTCT	41
	ITR-43 Левый	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGTCTCGTCACTGAGGCCGCCGGGAAACCCGGGCGTTCGGGCGAC CTTTGGTTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCAC	42

	TAGGGGTTCT	
5	ITR-44 Левый	43
	ITR-45 Левый	44
	ITR-46 Левый	45
	ITR-47 Левый	46
10	ITR-48 Левый	47

[00260] Согласно одному варианту реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН содержит, в направлении от 5' к 3': первый инвертированный концевой повтор (ITR) аденоассоциированного вируса (ААВ), нуклеотидную последовательность, представляющую интерес (например, экспрессионную кассету, описанную в данном документе), и второй ITR ААВ, причем указанный первый ITR (5'-ITR) и второй ITR (3'-ITR) являются асимметричными по отношению друг к другу, т. е. они имеют разную трехмерную пространственную конфигурацию по отношению друг к другу. В качестве примерного варианта реализации первый ITR может представлять собой ITR дикого типа, а второй ITR может представлять собой мутированный или модифицированный ITR или наоборот первый ITR может представлять собой мутированный или модифицированный ITR, а второй ITR может представлять собой ITR дикого типа. Согласно некоторым вариантам реализации первый ITR и второй ITR оба представляют собой mod-ITR, но имеют разные последовательности или разные модификации и, таким образом, не являются одинаковыми модифицированными ITR и имеют разные трехмерные пространственные конфигурации. Другими словами, зкДНК-вектор с асимметричными ITR содержит ITR, в которых любые изменения в одном ITR относительно WT-ITR не отражаются в другом ITR; или, альтернативно, если асимметричные ITR имеют пару модифицированных асимметричных ITR, они могут иметь различную последовательность и различную трехмерную форму по отношению друг к другу. Примерные асимметричные ITR в зкДНК-векторе для экспрессии белка РАН и для применения в получении зкДНК-плазмиды показаны в Таблицах 5А и 5В.

[00261] Согласно альтернативному варианту реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН содержит два симметричных mod-ITR, то есть оба ITR имеют одинаковую последовательность, но обратно комплементарны (инвертированы) друг другу. Согласно некоторым вариантам реализации пара симметричных mod-ITR содержит по меньшей мере одну или любую комбинацию делеции, вставки или замены относительно последовательности ITR дикого типа из того же серотипа ААВ. Добавления, делеции или замены в симметричных ITR одинаковы, но обратно комплементарны друг другу. Например, вставка 3 нуклеотидов в области С 5'-ITR будет отражаться во вставке 3 обратно комплементарных нуклеотидов в соответствующем участке в области С' 3'-ITR. Исключительно для целей иллюстрации, если добавление представляет собой AACG в 5'-ITR, добавление представляет собой CGTT в 3'-ITR в соответствующем сайте. Например, если смысловая цепь 5'-ITR представляет собой ATCGATCG с добавлением AACG между G и A, это дает последовательность ATCGAACGATCG (SEQ ID NO: 51). Соответствующая смысловая цепь 3'-ITR представляет собой CGATCGAT (обратно комплементарная последовательность ATCGATCG) с добавлением CGTT (т. е. обратно комплементарная

последовательность AACG) между T и C, что дает последовательность CGATCGTTTCGAT (SEQ ID NO: 49) (обратно комплементарная последовательность ATCGAACGATCG) (SEQ ID NO: 51).

[00262] Согласно альтернативным вариантам реализации пара модифицированных ITR по существу симметрична, как определено в данном документе, то есть пара модифицированных ITR может иметь разную последовательность, но иметь соответствующую или одинаковую симметричную трехмерную форму. Например, один модифицированный ITR может происходить из одного серотипа, а другой модифицированный ITR может происходить из другого серотипа, но они имеют одинаковую мутацию (например, вставку, делецию или замену нуклеотидов) в одной и той же области. Другими словами, только для иллюстративных целей, 5' mod-ITR может происходить из AAB2 и иметь делецию в области C, а 3' mod-ITR может происходить из AAB5 и иметь соответствующую делецию в области C', и при условии, что 5' mod-ITR и 3' mod-ITR имеют одинаковую или симметричную трехмерную пространственную организацию, они предусмотрены для применения в настоящем изобретении в качестве пары модифицированных ITR.

[00263] Согласно некоторым вариантам реализации пара по существу симметричных mod-ITR имеет одинаковые петли A, C-C' и B-B' в трехмерном пространстве, например, если модифицированный ITR в паре по существу симметричных mod-ITR имеет делецию плеча C-C', то когнатный mod-ITR имеет соответствующую делецию петли C-C', а также имеет сходную трехмерную структуру остальных петель A и B-B' одинаковой формы в геометрическом пространстве со своим когнатным mod-ITR. Только в качестве примера, по существу симметричные ITR могут иметь симметричную пространственную организацию так, что их структура имеет одинаковую форму в геометрическом пространстве. Это может происходить, например, когда пара G-C модифицирована, например, в пару C-G или наоборот, или когда пара A-T модифицирована в пару T-A, или наоборот. Следовательно, используя приведенный выше иллюстративный пример модифицированного 5'-ITR как ATCGAACGATCG (SEQ ID NO: 51) и модифицированного 3'-ITR как CGATCGTTTCGAT (SEQ ID NO: 49) (т. е. обратно комплементарной последовательности для ATCGAACGATCG (SEQ ID NO: 51)), эти модифицированные ITR все равно были бы симметричными, если бы, например, 5'-ITR имел последовательность ATCGAACCATCG (SEQ ID NO: 50), где G в добавлении модифицирован на C, и по существу симметричный 3'-ITR имеет последовательность CGATCGTTTCGAT (SEQ ID NO: 49), без соответствующей модификации T в дополнение к а. Согласно некоторым вариантам реализации такая пара модифицированных ITR является по существу симметричной, поскольку пара модифицированных ITR имеет симметричную стереохимию.

[00264] Таблица 6 показывает примерные пары симметричных модифицированных ITR (т. е. левого модифицированного ITR и симметричного правого модифицированного ITR) для применения в зкДНК-векторе для экспрессии белка РАН. Выделенный жирным шрифтом (красным) участок последовательностей идентифицирует часть последовательностей ITR (т. е. последовательности петель A-A', C-C' и B-B'). Эти примерные модифицированные ITR могут содержать RBE GCGCGCTCGCTCGCTC-3' (SEQ ID NO: 60), спейсер ACTGAGGC (SEQ ID NO: 69), комплементарную последовательность спейсера GCCTCAGT (SEQ ID NO: 70) и RBE' (т. е. комплементарную последовательность RBE) GAGCGAGCGAGCGCGC (SEQ ID NO: 71).

Таблица 6. Примерные пары симметричных модифицированных ITR в зкДНК-векторе для экспрессии белка РАН
--

ЛЕВЫЙ модифицированный ITR (модифицированный 5'-ITR)		Симметричный ПРАВЫЙ модифицированный ITR (модифицированный 3'-ITR)	
5	SEQ ID NO: 32 (ITR-33 левый) CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC TGAGGCCGCCCCGGGAAACCCGGGCGTGCGCC TCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGA GTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTCT	SEQ ID NO: 15 (ITR-18, правый)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGC CACTCCCTCTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCGCAGCAGCCCCGGTTTCC CGGGCGCCTCAGTGAGCGAGCGAG CGCGCAGCTGCCTGCAGG
	SEQ ID NO: 33 (ITR-34 левый) CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC TGAGGCCGTCGGGCGACCTTTGGTCCGCCGG CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGG GAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTCT	SEQ ID NO: 48 (ITR-51, правый)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGC CACTCCCTCTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCGGGCGACCAAAGGT CGCCCCAGCGCCTCAGTGAGCGAGC GAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG
10	SEQ ID NO: 34 (ITR-35 левый) CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC TGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCCG CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGG GAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTCT	SEQ ID NO: 16 (ITR-19, правый)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGC CACTCCCTCTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCGGACGCCCCGGGCTTTG CCCCGGGCGCCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGCAGCTGCCTGCAGG
15	SEQ ID NO: 35 (ITR-36 левый) CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC TGAGGCCGCCCCGGGCGTGGGCGACCTTTGGT CGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA GAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGG TTCTCT	SEQ ID NO: 17 (ITR-20, правый)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGC CACTCCCTCTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCGGGCGACCAAAGGT CGCCCCAGCGCCCCGGGCGCCTCAGTG AGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGC AGG
	SEQ ID NO: 36 (ITR-37 левый) CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC TGAGGCCAAAGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCG CGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTA GGGGTTCTCT	SEQ ID NO: 18 (ITR-21, правый)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGC CACTCCCTCTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCTTTGCCTCAGTGAGCG AGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG
20	SEQ ID NO: 37 (ITR-38 левый) CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC TGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCCG GCGACTTTGTCCCGCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCC ATCACTAGGGGTTCTCT	SEQ ID NO: 19 (ITR-22 правый)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGC CACTCCCTCTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCGGGCGACAAAGTGC CCCCAGCCCCGGGCTTTGCCCGGGC GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC AGCTGCCTGCAGG
25	SEQ ID NO: 38 (ITR-39 левый) CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC TGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCCG GCGATTTTCGCCCGCCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCAT CACTAGGGGTTCTCT	SEQ ID NO: 20 (ITR-23, правый)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGC CACTCCCTCTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCGGGCGAAAATCGCC CGAGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGG CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG CTGCCTGCAGG
	SEQ ID NO: 39 (ITR-40 левый) CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC TGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCCG GCGTTTCGCCCGCCTCAGTGAGCGAGCGAG CGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCAC TAGGGGTTCTCT	SEQ ID NO: 21 (ITR-24, правый)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGC CACTCCCTCTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCGGGCGAAAACGCCCG ACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCC TCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCT GCCTGCAGG
30	SEQ ID NO: 40 (ITR-41 левый) CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC TGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCCG GCTTTGCCCGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCG CGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTA GGGGTTCTCT	SEQ ID NO: 22 (ITR-25 правый)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGC CACTCCCTCTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCGGGCAAAGCCCCGAC GCCCCGGCTTTGCCCGGGCGCCTCA GTGAGCGAGCGAGCGAGCGAGCTGCC TGCAGG
35	SEQ ID NO: 41 (ITR-42 левый) CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC TGAGGCCGCCCCGGGAAACCCGGGCGTCCGG CGACCTTTGGTCCCGGCTCAGTGAGCGAG GCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTC CATCACTAGGGGTTCTCT	SEQ ID NO: 23 (ITR-26 правый)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGC CACTCCCTCTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCGGGCGACCAAAGGT CGCCCCAGCCCCGGTTCGCCGGGC GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC AGCTGCCTGCAGG
40	SEQ ID NO: 42 (ITR-43 левый) CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC TGAGGCCGCCCCGGAAACCCGGGCGTCCGGCG ACCTTTGGTCCCGGCTCAGTGAGCGAGC GAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCA TCACTAGGGGTTCTCT	SEQ ID NO: 24 (ITR-27 правый)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGC CACTCCCTCTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCGGGCGACCAAAGGT CGCCCCAGCCCCGGTTCCGGGGCGG CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG CTGCCTGCAGG
	SEQ ID NO: 43 (ITR-44 левый) CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC TGAGGCCGCCCCGAAACGGGCGTCCGGGCGAC CTTTGGTCCCGGCTCAGTGAGCGAGCGA GCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCA CTAGGGGTTCTCT	SEQ ID NO: 25 (ITR-28 правый)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGC CACTCCCTCTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCGGGCGACCAAAGGT CGCCCCAGCCCCGGTTCCGGGGCCT CAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTG CCTGCAGG
45	SEQ ID NO: 44 (ITR-45 левый) CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC TGAGGCCGCCAAAGGGCGTCCGGGCGACCTT TGGTCCCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCG CGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTA GGGGTTCTCT	SEQ ID NO: 26 (ITR-29, правый)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGC CACTCCCTCTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCGGGCGACCAAAGGT CGCCCCAGCCCCCTTTGGGCGGCTCA GTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCC TGCAGG
	SEQ ID NO: 45 (ITR-46 левый) CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC TGAGGCCGCCAAAGGCGTCCGGGCGACCTTTG	SEQ ID NO: 27 (ITR-30, правый)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGC CACTCCCTCTGCGCGCTCGCTCGC

	GTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCG CAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGG GGTTCCT		TCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAGGT CGCCCGACGCCTTTGGCGGCCTCAGT GAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTG CAGG
5	SEQ ID NO: 46 (ITR-47, левый)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC TGAGGCCGCAAAGCGTCGGGGCAGCTTTGGT CGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA GAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGG TTCCT	SEQ ID NO: 28 (ITR-31, правый)
10	SEQ ID NO: 47 (ITR-48, левый)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC TGAGGCCGAAACGTCGGGGCAGCTTTGGTTCG CCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGA GAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTT CCT	SEQ ID NO: 29 (ITR-32 правый)

[00265] Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, содержащий пару асимметричных ITR, может содержать ITR с модификацией, соответствующей любой из модификаций в последовательностях ITR или неполных последовательностях ITR, показанных в любой одной или более из Таблиц 5А-5В в данном документе, или последовательностях, показанных на ФИГ. 7А-7В

15 международной заявки РСТ/US2018/064242, поданной 6 декабря 2018 г., которая полностью включена в данный документ, или раскрытых в Таблицах 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10А-10В международной заявки РСТ/US18/49996, поданной 7 сентября 2018 г., полностью включенной в данный документ посредством ссылки.

20 I. Примерные зкДНК-векторы

[00266] Как описано выше, настоящее раскрытие относится к рекомбинантным экспрессионным зкДНК-векторам и зкДНК-векторам, которые кодируют белок РАН, содержащим любой из: пары асимметричных ITR, пары симметричных ITR или пары по существу симметричных ITR, как описано выше. Согласно определенным вариантам

25 реализации настоящее раскрытие относится к рекомбинантным зкДНК-векторам для экспрессии белка РАН, имеющим фланкирующие последовательности ITR и трансген, причем указанные последовательности ITR являются асимметричными, симметричными или по существу симметричными по отношению друг к другу, как определено в данном документе, и зкДНК дополнительно содержит нуклеотидную последовательность,

30 представляющую интерес (например, экспрессионную кассету, содержащую нуклеиновую кислоту трансгена), расположенную между фланкирующими ITR, при этом указанная молекула нуклеиновой кислоты лишена последовательностей, кодирующих вирусный капсидный белок.

[00267] Экспрессионный зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН может представлять собой любой зкДНК-вектор, который можно удобно подвергнуть методикам

35 рекомбинантной ДНК, включая нуклеотидную последовательность (и), описанную в данном документе, при условии, что по меньшей мере один ITR изменен. ЗкДНК-векторы для экспрессии белка РАН согласно настоящему изобретению совместимы с клеткой-хозяином, в которую должен быть введен зкДНК-вектор. Согласно определенным

40 вариантам реализации зкДНК-векторы могут быть линейными. Согласно определенным вариантам реализации зкДНК-векторы могут существовать как внехромосомные объекты. Согласно определенным вариантам реализации зкДНК-векторы согласно настоящему раскрытию могут содержать элемент (ы), который позволяет интегрировать донорную последовательность в геном клетки-хозяина. В данном документе «трансген»

45 и «гетерологичная нуклеотидная последовательность» являются синонимами и кодируют белок РАН, как описано в данном документе.

[00268] На ФИГ. 1А-1G показаны схемы функциональных компонентов двух неограничивающих плазмид, которые можно применять для получения зкДНК-вектора

для экспрессии белка РАН. ФИГ. 1А, 1В, 1D, 1F показывают конструкцию зкДНК-векторов или соответствующих последовательностей зкДНК-плазмид для экспрессии белка РАН. ЗкДНК-векторы не имеют капсидов и могут быть получены из плазмиды, кодирующей, в указанном порядке: первый ITR, кассету экспрессируемого трансгена и второй ITR, причем последовательности первого и второго ITR асимметричны, симметричны или по существу симметричны по отношению друг к другу, как определено в данном документе. ЗкДНК-векторы для экспрессии белка РАН не имеют капсидов и могут быть получены из плазмиды, кодирующей, в указанном порядке: первый ITR, экспрессируемый трансген (белок или нуклеиновую кислоту) и второй ITR, причем последовательности первого и второго ITR асимметричны, симметричны или по существу симметричны по отношению друг к другу, как определено в данном документе. Согласно некоторым вариантам реализации кассета экспрессируемого трансгена включает, при необходимости: энхансер/промотор, одно или более плеч гомологии, донорную последовательность, посттранскрипционный регуляторный элемент (например, WPRE, например, SEQ ID NO: 67)), а также сигнал полиаденилирования и терминации (например, BGH поли(А), например, SEQ ID NO: 68).

[00269] ФИГ. 5 изображает гель, подтверждающий продуцирование зкДНК из нескольких плазмидных конструкций с использованием способа, описанного в Примерах. ЗкДНК-вектор подтверждается характерным профилем полос в геле, как обсуждается в отношении ФИГ. 4А выше и в Примерах.

А. Регуляторные элементы.

[00270] зкДНК-векторы для экспрессии белка РАН, описанные в данном документе, содержащие пару асимметричных ITR или пару симметричных ITR, как определено в данном документе, могут дополнительно содержать конкретную комбинацию цис-регуляторных элементов. Цис-регуляторные элементы включают, но не ограничиваются перечисленными, промотор, рибопереключател, инсультатор, miR-регулируемый элемент, посттранскрипционный регуляторный элемент, промотор, специфический для ткани и типа клеток, и энхансер. Примерные промоторы перечислены в международной заявке № PCT/US2020/021328, например, в Таблице 7, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. Примерные энхансеры перечислены в международной заявке № PCT/US2020/021328, например, в Таблице 8, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам реализации ITR может действовать как промотор трансгена, например, белка РАН. Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, описанный в данном документе, содержит дополнительные компоненты для регуляции экспрессии трансгена, например, регуляторные переключатели, описанные в данном документе, для регуляции экспрессии трансгена или аварийный выключатель, который может уничтожить клетку, содержащую зкДНК-вектор, кодирующий белок РАН. Регуляторные элементы, включая регуляторные переключатели, которые можно применять в настоящем изобретении, более подробно обсуждаются в международной заявке PCT/US18/49996, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[00271] В вариантах реализации вторая нуклеотидная последовательность включает регуляторную последовательность и нуклеотидную последовательность, кодирующую нуклеазу. Согласно определенным вариантам реализации регуляторная последовательность гена функционально связана с нуклеотидной последовательностью, кодирующей нуклеазу. Согласно определенным вариантам реализации регуляторная последовательность пригодна для контроля экспрессии нуклеазы в клетке-хозяине. Согласно определенным вариантам реализации регуляторная последовательность

включает подходящую промоторную последовательность, способную направлять транскрипцию гена, функционально связанного с промоторной последовательностью, такого как нуклеотидная последовательность, кодирующая нуклеазу (нуклеазы) согласно настоящему раскрытию. Согласно определенным вариантам реализации вторая нуклеотидная последовательность включает интронную последовательность, связанную с 5'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей нуклеазу. Согласно определенным вариантам реализации последовательность энхансера обеспечена в 5'-направлении относительно промотора для повышения эффективности промотора. Согласно определенным вариантам реализации регуляторная последовательность включает энхансер и промотор, причем вторая нуклеотидная последовательность включает интронную последовательность в 5'-направлении от нуклеотидной последовательности, кодирующей нуклеазу, при этом интрон включает один или более сайтов расщепления нуклеазой, и при этом промотор функционально связан с нуклеотидной последовательностью, кодирующей нуклеазу.

[00272] зкДНК-векторы для экспрессии белка РАН, полученные синтетическим путем или с использованием метода продуцирования на основе клеток, как описано в данном документе в Примерах, могут дополнительно содержать конкретную комбинацию цис-регуляторных элементов, таких как посттранскрипционный регуляторный элемент WHP (WPRE) (например, SEQ ID NO: 67) и BGH поли(A) (SEQ ID NO: 68). Подходящие экспрессионные кассеты для применения в экспрессионных конструкциях не имеют налагаемого вирусным капсидом ограничения по упаковке.

(i) Промоторы:

[00273] Обычный специалист в данной области техники поймет, что промоторы, используемые в зкДНК-векторах для экспрессии белка РАН, как описано в данном документе, должны быть адаптированы в соответствии с конкретными последовательностями, на которые они оказывают промоторное действие.

[00274] Экспрессионные кассеты зкДНК-вектора для экспрессии белка РАН могут включать промотор, который может влиять на общие уровни экспрессии, а также на клеточную специфичность. В случае экспрессии трансгена, например, экспрессии белка РАН, они могут включать высокоактивный немедленный ранний промотор вирусного происхождения. Экспрессионные кассеты могут содержать тканеспецифические эукариотические промоторы для ограничения экспрессии трансгена конкретными типами клеток и снижения токсических эффектов и иммунных ответов, обусловленных нерегулируемой эктопической экспрессией. Согласно некоторым вариантам реализации экспрессионная кассета может содержать промотор или синтетический регуляторный элемент, такой как промотор CAG (SEQ ID NO: 72). Промотор CAG содержит (i) ранний энхансерный элемент цитомегаловируса (CMV), (ii) промотор, первый экзон и первый интрон гена бета-актина курицы, и (iii) акцептор сплайсинга гена бета-глобина кролика. В качестве альтернативы, экспрессионная кассета может содержать промотор альфа-1-антитрипсина (AAT) (SEQ ID NO: 73 или SEQ ID NO: 74), специфический для печени (LP1) промотор (SEQ ID NO: 75 или SEQ ID NO: 76) или промотор фактора удлинения-1-альфа (EF1a) человека (например, SEQ ID NO: 77 или SEQ ID NO: 78). Согласно некоторым вариантам реализации экспрессионная кассета включает один или более конститутивных промоторов, например, ретровирусный LTR-промотор вируса саркомы Рауса (RSV) (необязательно с энхансером RSV) или немедленный ранний промотор цитомегаловируса (CMV) (необязательно с энхансером CMV, например, SEQ ID NO: 79). В качестве альтернативы, можно применять индуцируемый промотор, нативный для трансгена промотор, тканеспецифический промотор или различные промоторы,

известные в данной области техники. В соответствии с некоторыми вариантами реализации промотор представляет собой любой промотор или промоторную последовательность, изложенную в международной заявке № PCT/US2020/021328, поданной 6 марта 2020 г., которая полностью включена в данный документ посредством

5

ссылки.
[00275] В соответствии с некоторыми вариантами реализации промотор представляет собой промотор VandenDriessche (VD). В соответствии с некоторыми вариантами реализации промотор VD содержит SEQ ID NO: 191, показанную ниже:

CCGTCTGTCTGCACATTTTCGTAGAGCGAGTGTTCGATACTCTAATCTCCCTAGGC
10 AAGGTTTCATATTTGTGTAGGTTACTTATTCTCCTTTTGTGACTAAGTCAATAATCAG
AATCAGCAGGTTTGGAGTCAGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAAGGAGG
GGGTATAAAAGCCCTTCACCAGGAGAAGCCGTCACACAGATCCACAAGCTCCTG
(SEQ ID NO: 191).

В соответствии с некоторыми вариантами реализации промотор содержит
15 последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере примерно на 85% идентична SEQ ID NO: 191. В соответствии с некоторыми вариантами реализации промотор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере примерно на 90% идентична SEQ ID NO: 191. В соответствии с некоторыми вариантами реализации промотор содержит последовательность нуклеиновой кислоты,
20 которая по меньшей мере примерно на 95% идентична SEQ ID NO: 191. В соответствии с некоторыми вариантами реализации промотор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере примерно на 96% идентична SEQ ID NO: 191. В соответствии с некоторыми вариантами реализации промотор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере примерно на 97%
25 идентична SEQ ID NO: 191. В соответствии с некоторыми вариантами реализации промотор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере примерно на 98% идентична SEQ ID NO: 191. В соответствии с некоторыми вариантами реализации промотор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере примерно на 99% идентична SEQ ID NO: 191. В соответствии
30 с некоторыми вариантами реализации промотор состоит из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 191.

[00276] Подходящие промоторы могут происходить из вирусов и, соответственно, могут называться вирусными промоторами, или они могут происходить из любого организма, в том числе прокариотических или эукариотических организмов. Для
35 управления экспрессией с помощью любой РНК-полимеразы (например, pol I, pol II, pol III) могут применяться подходящие промоторы. Примерные промоторы включают, но не ограничиваются перечисленными, ранний промотор SV40, промотор длинного концевой повтора (LTR) вируса опухоли молочной железы мыши; большой поздний промотор аденовируса (Ad MLP); промотор вируса простого герпеса (HSV), промотор цитомегаловируса (CMV), такой как область немедленного раннего промотора CMV (CMVIE), промотор вируса саркомы Рауса (RSV), промотор U6 малой ядерной РНК человека (U6, например, SEQ ID NO: 80) (Miyagishi et al., Nature Biotechnology 20, 497-500 (2002)), улучшенный промотор U6 (e.g., Xia et al., Nucleic Acids Res. 2003 Sep. 1; 31(17)), промотор H1 человека (H1) (например, SEQ ID NO: 81 или SEQ ID NO: 155), промотор
45 CAG, промотор альфа-1-антитрипсина человека (HAAT) (например, SEQ ID NO: 82) и т.п. Согласно определенным вариантам реализации указанные промоторы изменяют на их содержащем интрон 3'-конце так, чтобы они включали один или более сайтов расщепления нуклеазами. Согласно определенным вариантам реализации ДНК,

содержащая сайт(ы) расщепления нуклеазой, является чужеродной для ДНК промотора.

[00277] Согласно одному варианту реализации используемый промотор представляет собой нативный промотор гена, кодирующего терапевтический белок. Промоторы и другие регуляторные последовательности соответствующих генов, кодирующих терапевтические белки, известны и были охарактеризованы. Используемая промоторная область может дополнительно включать одну или более дополнительных регуляторных последовательностей (например, нативных), например, энхансеров (например, SEQ ID NO: 79 и SEQ ID NO: 83), включая энхансер SV40 (SEQ ID NO: 126).

[00278] Согласно некоторым вариантам реализации промотор также может представлять собой промотор из гена человека, такого как убиквитин С человека (hUbC), актин человека, миозин человека, гемоглобин человека, мышечный креатин человека или металлотионеин человека. Промотор также может представлять собой тканеспецифический промотор, такой как специфический для печени промотор, например, альфа-1-антитрипсина человека (НААТ), природный или синтетический. Согласно одному варианту реализации доставку в печень можно обеспечить с использованием специфичного нацеливания на эндогенный ApoE композиции, содержащей зкДНК-вектор, которую направляют в гепатоциты за счет рецептора липопротеина низкой плотности (ЛНП), присутствующего на поверхности гепатоцита.

[00279] еограничивающие примеры промоторов, подходящих для применения в соответствии с настоящим изобретением, включают любой из следующих: промотор CAG, например, (SEQ ID NO: 72), промотор НААТ (SEQ ID NO: 82), промотор EF1- α человека (SEQ ID NO: 77) или фрагмент промотора EF1a (SEQ ID NO: 78), промотор IE2 (например, SEQ ID NO: 84) и промотор EF1- α крысы (SEQ ID NO: 85), промотор mEF1 (SEQ ID NO: 59) или фрагмент промотора 1E1 (SEQ ID NO: 125).

(ii) Энхансеры

[00280] Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК, экспрессирующая РАН, содержит один или более энхансеров. Согласно некоторым вариантам реализации последовательность энхансера расположена в 5'-направлении от последовательности промотора. Согласно некоторым вариантам реализации последовательность энхансера расположена в 3'-направлении от последовательности промотора. В соответствии с некоторыми вариантами реализации энхансер представляет собой любой энхансер или энхансерную последовательность, изложенную в международной заявке № PCT/US2020/021328, поданной 6 марта 2020 г., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

(iii) Последовательности 5'-UTR и интронные последовательности

[00281] Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор содержит последовательность 5'-UTR и/или интронную последовательность, которая расположена в 3'-направлении от последовательности 5'-ITR. Согласно некоторым вариантам реализации 5'-UTR расположена в 5'-направлении от трансгена, например, последовательности, кодирующей белок РАН. Примерные последовательности 5'-UTR перечислены в международной заявке № PCT/US2020/021328, например, в Таблице 9А, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

(iv) Последовательности 3'-UTR

[00282] Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор содержит последовательность 3'-UTR, которая расположена в 5'-направлении от последовательности 3'-ITR. Согласно некоторым вариантам реализации 3'-UTR расположена в 3'-направлении от трансгена, например, последовательности, кодирующей белок РАН. Примерные последовательности 3'-UTR перечислены в

международной заявке № PCT/US2020/021328, например, в Таблице 9В, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

(v) Последовательности полиаденилирования

[00283] Последовательность, кодирующая последовательность полиаденилирования, может быть включена в зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН для стабилизации мРНК, экспрессируемой с указанного зкДНК-вектора, и для содействия ядерному экспорту и трансляции. Согласно одному варианту реализации зкДНК-вектор не включает последовательность полиаденилирования. Согласно другим вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН включает по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45, по меньшей мере 50 или более адениновых динуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации последовательность полиаденилирования содержит примерно 43 нуклеотида, примерно 40-50 нуклеотидов, примерно 40-55 нуклеотидов, примерно 45-50 нуклеотидов, примерно 35-50 нуклеотидов или любой диапазон между указанными значениями.

[00284] Экспрессионные кассеты могут включать любую последовательность полиаденилирования, известную в данной области техники, или ее вариант. Согласно некоторым вариантам реализации последовательность полиаденилирования (поли(А)) выбрана из любой из последовательностей, перечисленных в международной заявке № PCT/US2020/021328, например, в Таблице 10, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. Также можно использовать другие последовательности поли(А), широко известные в данной области техники, например, включая, но не ограничиваясь перечисленными, природную последовательность, выделенную из бычьего BGNpA (например, SEQ ID NO: 68) или SV40pA вируса (например, SEQ ID NO: 86) или синтетическую последовательность (SEQ ID NO: 87). Некоторые экспрессионные кассеты также могут включать последовательность 5'-энхансера позднего поли(А)-сигнала (USE) SV40. Согласно некоторым вариантам реализации последовательность USE можно применять в комбинации с SV40pA или гетерологичным сигналом поли(А). Последовательности поли(А) расположены в 3'-направлении от трансгена, кодирующего белок РАН.

[00285] Экспрессионные кассеты также могут включать посттранскрипционный элемент для повышения экспрессии трансгена. Согласно некоторым вариантам реализации для повышения экспрессии трансгена применяют посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита североамериканского сурка (WPRE) (например, SEQ ID NO: 67). Можно применять другие элементы посттранскрипционного процессинга, такие как посттранскрипционный элемент из гена тимидинкиназы вируса простого герпеса или вируса гепатита В (HBV). С трансгенами могут быть связаны секреторные последовательности, например, последовательности VH-02 и VK-A26, например, SEQ ID NO: 88 и SEQ ID NO: 89.

(vi) Последовательности ядерной локализации

[00286] Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН содержит одну или более последовательностей ядерной локализации (NLS), например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более NLS. Согласно некоторым вариантам реализации одна или более NLS расположены на амино-конце или рядом с ним, на карбокси-конце или рядом с ним, или в их комбинации (например, одна или более NLS на амино-конце и/или одна или более NLS на карбокси-конце). В случае присутствия более чем одной NLS, каждая из них может быть выбрана независимо от других так,

что одна NLS будет присутствовать более чем в одной копии и/или в комбинации с одной или более другими NLS, присутствующими в одной или более копиях. Неограничивающие примеры NLS приведены в Таблице 7.

Таблица 7: Сигналы ядерной локализации

5

ИСТОЧНИК	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO.
Большой Т-антиген вируса SV40	PKKKRKV (кодируемый CCAAGAAGAAGGAAGGTG; SEQ ID NO: 91)	90
Нуклеоплазмин	KRPAATKKAGQAKKKK	92
С-мус	PAAKRVKLD	93
	RQRRNELKRSP	94
hRNPA1 M9	NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPGYGGGGQYFAKPRNQGGY	95
Домен IBV импортин-альфа	RMRIZFKNGKDTAELRRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV	96
Белок Т миомы	VSRKRPRP	97
	PPKKARED	98
P53 человека	PQPKKKPL	99
С-abl IV мыши	SALIKKKKKMAP	100
NS1 вируса гриппа	DRLRR	117
	PKQKKRK	118
Антиген вируса гепатита дельта	RKLKKKIKKL	119
Белок Мх1 мыши	REKKKFLKRR	120
Полимераза поли(АДФ-рибозы) человека	KRKGDEVDGVDEVAKKKSCK	121
Глюкокортикоид рецепторов стероидных гормонов (человека)	RKCLQAGMNLEARKTKK	122

10

15

20

В. Дополнительные компоненты зкДНК-векторов

25

[00287] зкДНК-векторы для экспрессии белка РАН согласно настоящему раскрытию могут содержать нуклеотиды, которые кодируют другие компоненты для экспрессии гена. Например, для выбора событий нацеливания на конкретные гены защитная кшРНК может быть встроена в микроРНК и вставлена в рекомбинантный зкДНК-вектор, предназначенный для сайт-специфической интеграции в высокоактивный локус, такой как локус альбумина. Такие варианты реализации могут обеспечивать систему для отбора и размножения генетически модифицированных гепатоцитов *in vivo* в любом генетическом окружении, например, как описано в Nygaard et al., A universal system to select gene-modified hepatocytes *in vivo*, Gene Therapy, June 8, 2016. ЗкДНК-векторы согласно настоящему раскрытию могут содержать один или более селективных маркеров, которые позволяют проводить селекцию трансформированных, трансфицированных, трансдуцированных или подобных клеток. Селективный маркер представляет собой ген, продукт которого обеспечивает биоцидную или вирусную устойчивость, устойчивость к тяжелым металлам, прототрофию ауксотрофам, NeoR и т.п. Согласно определенным вариантам реализации в донорные последовательности включены маркеры для положительной селекции, такие как NeoR. Маркеры для отрицательной селекции могут быть включены после донорных последовательностей, например, последовательность нуклеиновой кислоты HSV-tk, кодирующая маркер для отрицательной селекции, может быть включена в конструкцию нуклеиновой кислоты после донорной последовательности.

30

35

40

45

С. Регуляторные переключатели

[00288] Молекулярный регуляторный переключатель представляет собой переключатель, который генерирует измеряемое изменение состояния в ответ на сигнал. Такие регуляторные переключатели можно подходящим образом комбинировать с

зкДНК-векторами для экспрессии белка РАН, описанными в данном документе, чтобы контролировать выход экспрессии белка РАН с зкДНК-вектора. Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН содержит регуляторный переключатель, который служит для тонкой настройки экспрессии белка РАН. Например, он может выполнять функцию биосдерживания зкДНК-вектора. Согласно некоторым вариантам реализации переключатель представляет собой двухпозиционный («ON/OFF») переключатель, который предназначен для запуска или остановки (т. е. прекращения) экспрессии белка РАН в зкДНК-векторе контролируемым и регулируемым образом. Согласно некоторым вариантам реализации указанный переключатель может включать «аварийный выключатель», который может давать клетке, содержащей указанный зкДНК-вектор, команду для запуска механизма запрограммированной клеточной смерти после активации переключателя. Примерные регуляторные переключатели, предусмотренные для применения в зкДНК-векторе для экспрессии белка РАН, могут применяться для регуляции экспрессии трансгена и более подробно обсуждаются в международной заявке РСТ/US18/49996, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки

(i) Бинарные регуляторные переключатели

[00289] Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН содержит регуляторный переключатель, который может служить для контролируемой модуляции экспрессии белка РАН. Например, экспрессионная кассета, расположенная между ITR зкДНК-вектора, может дополнительно содержать регуляторную область, например, промотор, цис-элемент, репрессор, энхансер и т. д., которая функционально связана с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок РАН, причем указанная регуляторная область регулируется одним или более кофакторами или экзогенными агентами. В качестве неограничивающего примера, регуляторные области могут модулироваться низкомолекулярными переключателями или индуцируемыми или репрессируемыми промоторами. Неограничивающие примеры индуцируемых промоторов представляют собой индуцируемые гормонами или индуцируемые металлами промоторы. Другие примерные индуцируемые промоторные/энхансерные элементы включают, но не ограничиваются перечисленными, индуцируемый RU486 промотор, индуцируемый экидином промотор, индуцируемый рапамицином промотор и промотор металлотионеина.

(ii) Низкомолекулярные регуляторные переключатели

[00290] Различные известные из уровня техники регуляторные переключатели на основе малых молекул известны в данной области техники и могут быть скомбинированы с зкДНК-векторами для экспрессии белка РАН, раскрытыми в данном документе, с получением контролируемого регуляторным переключателем зкДНК-вектора. Согласно некоторым вариантам реализации регуляторный переключатель может быть выбран из чего-либо одного или комбинации следующего: пара ортогональный лиганд/ядерный рецептор, например, вариант ретиноидного рецептора/LG335 и GRQСIMFI, вместе с искусственным промотором, контролирующим экспрессию функционально связанного трансгена, как раскрыто в Taylor et al. BMC Biotechnology 10 (2010): 15; сконструированные рецепторы стероидов, например, модифицированный рецептор прогестерона с усеченным С-концом, который не может связывать прогестерон, но связывает RU486 (мифепристон) (патент США № 5364791); рецептор экидизона дрозофилы (*Drosophila*) и его экидистероидные лиганды (Saez, et al., PNAS, 97 (26)(2000), 14512-14517); или переключатель, контролируемый антибиотиком триметопримом (TMP), как раскрыто в Sando R 3rd, Nat Methods. 2013, 10(11):1085-8.

Согласно некоторым вариантам реализации регуляторный переключатель для контроля трансгена или экспрессируемый зкДНК-вектором представляет собой переключатель для активации пролекарств, такой как раскрытые в патентах США 8771679 и 6339070, которые полностью включены в данный документ посредством ссылки.

5 (iii) Регуляторные переключатели «с кодом доступа»

[00291] Согласно некоторым вариантам реализации регуляторный переключатель может представлять собой «переключатель с кодом доступа» или «контур с кодом доступа». Переключатели с кодом доступа позволяют точно настроить контроль экспрессии трансгена с зкДНК-вектора при возникновении конкретных условий, т. е. для осуществления экспрессии и/или репрессии трансгена должна иметься комбинация 10 условий. Например, для осуществления экспрессии трансгена должны возникнуть по меньшей мере условия А и В. Регуляторный переключатель с кодом доступа может представлять собой любое число условий, например, по меньшей мере 2 или по меньшей мере 3, или по меньшей мере 4, или по меньшей мере 5, или по меньшей мере 6, или по 15 меньшей мере 7 или более условий, наличие которых необходимо для осуществления экспрессии трансгена. Согласно некоторым вариантам реализации должны возникнуть по меньшей мере 2 условия (например, условия А, В), а в некоторых вариантах реализации должны возникнуть по меньшей мере 3 условия (например, А, В и С или А, В и D). Только в качестве примера, для осуществления экспрессии гена с зкДНК, 20 содержащей регуляторный переключатель с кодом доступа «АВС», требуется наличие условий А, В и С. Условия А, В и С могут быть следующими; условие А представляет собой наличие состояния или заболевания, условие В представляет собой гормональный ответ, и условие С представляет собой ответ на экспрессию трансгена. Например, если трансген редактирует дефектный ген ЕРО, то условием А является наличие хронической 25 болезни почек (ХБП), условие В осуществляется при наличии гипоксических условий в почках субъекта, условие С заключается в нарушении привлечения эритропоэтин-продуцирующих клеток (ЭПК) в почках; или, альтернативно, в нарушении активации HIF-2. При повышении уровней кислорода или достижении целевого уровня ЕРО трансген снова отключается до момента возникновения 3 условий, которые его опять 30 включают.

[00292] Согласно некоторым вариантам реализации регуляторный переключатель с кодом доступа или «контур с кодом доступа», предусмотренный для применения в зкДНК-векторе, содержит гибридные транскрипционные факторы (ТФ) для расширения 35 диапазона и уровня сложности сигналов окружающей среды, используемых для определения условий биосдерживания. В отличие от блокирующего (deadman) выключателя, который запускает гибель клетки при наличии заранее определенного условия, «контур с кодом доступа» позволяет обеспечить выживание клеток или экспрессию трансгена при наличии конкретного «кода доступа», и может быть легко 40 перепрограммирован, что позволяет обеспечить экспрессию трансгена и/или выживание клеток только при наличии заранее заданного условия окружающей среды или кода доступа.

[00293] Любые и все комбинации регуляторных переключателей, раскрытых в данном документе, например, низкомолекулярные переключатели, переключатели на основе нуклеиновых кислот, гибридные переключатели на основе малых молекул и нуклеиновых 45 кислот, посттранскрипционные регуляторные переключатели трансгенов, посттрансляционная регуляция, контролируемые излучением переключатели, опосредуемые гипоксией переключатели и другие регуляторные переключатели, известные специалистам в данной области техники, раскрытые в данном документе,

могут применяться в регуляторном переключателе с кодом доступа, как раскрыто в данном документе. Регуляторные переключатели, предусмотренные для применения, также обсуждаются в обзорной статье Kis et al., *JR Soc Interface*. 12: 20141000 (2015) и обобщены в Таблице 1 статьи Kis. Согласно некоторым вариантам реализации регуляторный переключатель для применения в системе с кодом доступа может быть выбран из любых переключателей или их комбинаций, раскрытых в Таблице 11 международной заявки на патент PCT/US18/49996, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

(iv) Регуляторные переключатели на основе нуклеиновых кислот для контроля экспрессии трансгена

[00294] Согласно некоторым вариантам реализации регуляторный переключатель для контроля белка РАН, экспрессируемого зкДНК, основан на механизме контроля на основе нуклеиновых кислот. Примерные механизмы контроля на основе нуклеиновых кислот известны в данной области техники и предусмотрены для применения. Например, такие механизмы включают рибопереключатели, такие как раскрытые, например, в US2009/0305253, US2008/0269258, US2017/0204477, WO2018026762A1, патенте США 9222093 и заявке на европейский патент EP288071, а также раскрытые в обзорной статье Villa JK et al. *Microbiol Spectr*. 2018 May;6(3). Также включены чувствительные к метаболитам транскрипционные биосенсоры, такие как раскрытые в WO2018/075486 и WO2017/147585. Другие известные в данной области техники механизмы, предусмотренные для применения, включают подавление трансгена с применением кРНК или молекулы РНКи (например, miR, кшРНК). Например, зкДНК-вектор может содержать регуляторный переключатель, кодирующий молекулу РНКи, которая комплементарна части трансгена, экспрессируемого зкДНК-вектором. При экспрессии такой РНКи, даже если трансген (например, белок РАН) экспрессируется зкДНК-вектором, будет происходить его подавление под действием комплементарной молекулы РНКи, а если РНКи не экспрессируется, при экспрессии трансгена (например, белка РАН) зкДНК-вектором, подавление трансгена под действием РНКи не происходит.

[00295] Согласно некоторым вариантам реализации регуляторный переключатель представляет собой тканеспецифический самоинактивирующийся регуляторный переключатель, например, раскрытый в US2002/0022018, благодаря чему регуляторный переключатель преднамеренно выключает трансген (например, белок РАН) в сайте, где в противном случае экспрессия трансгена могла бы быть неблагоприятной. Согласно некоторым вариантам реализации регуляторный переключатель представляет собой обратимую с помощью рекомбиназы систему экспрессии гена, например, раскрытую в US2014/0127162 и патенте США 8324436.

(v) Посттранскрипционные и посттрансляционные регуляторные переключатели.

[00296] Согласно некоторым вариантам реализации регуляторный переключатель для контроля экспрессии белка РАН зкДНК-вектором представляет собой систему посттранскрипционной модификации. Например, такой регуляторный переключатель может представлять собой рибопереключатель-аптазим, чувствительный к тетрациклину или теофиллину, раскрытый в US2018/0119156, GB201107768, WO2001/064956A3, патенте EP 2707487 и Beilstein et al., *ACS Synth. Biol.*, 2015, 4 (5), pp 526-534; Zhong et al., *Elife*. 2016 Nov 2;5. pii: e18858. Согласно некоторым вариантам реализации предусмотрено, что обычный специалист в данной области техники может закодировать как трансген, так и ингибиторную кРНК, которая содержит чувствительный к лиганду аптамер (отрицательный переключатель), в результате чего будет получен положительный переключатель, чувствительный к лиганду.

(vi) Другие примерные регуляторные переключатели

[00297] Любой известный регуляторный переключатель может быть использован в зкДНК-векторе для контроля экспрессии белка РАН зкДНК-вектором, включая переключатели, запускаемые изменениями окружающей среды. Дополнительные
 5 примеры включают, но не ограничиваются перечисленными; метод ВОС согласно Suzuki et al., Scientific Reports 8; 10051 (2018); расширение генетического кода и нефизиологическую аминокислоту; контролируемые излучением или контролируемые
 10 ультразвуком положительные/отрицательные (on/off) переключатели (см., например, Scott S. et al., Gene Ther. 2000 Jul;7(13):1121-5; патенты США 5612318; 5571797; 5770581; 5817636; и WO1999/025385A1. Согласно некоторым вариантам реализации регуляторный переключатель контролируется имплантируемой системой, например, раскрытой в патенте США 7840263; US2007/0190028A1, в которой экспрессия гена контролируется одной или более формами энергии, включая электромагнитную энергию, что активирует промоторы, функционально связанные с трансгеном в зкДНК-векторе.

[00298] Согласно некоторым вариантам реализации регуляторный переключатель, предусмотренный для применения в зкДНК-векторе, представляет собой опосредуемый гипоксией или активируемый стрессом переключатель, например, такой как те, которые раскрыты в WO1999060142A2, патентах США 5834306; 6218179; 6709858; US2015/0322410; Greco et al., (2004) Targeted Cancer Therapies 9, S368, полностью включенных в
 20 данный документ посредством ссылки, а также элементы FROG, TOAD и NRSE и условно индуцируемые подавляющие элементы, включая элементы ответа на гипоксию (HRE), элементы ответа на воспаление (IRE) и активируемые сдвиговым напряжением элементы (SSAE), например, как раскрыто в патенте США 9394526, полностью включенном в
 25 данный документ посредством ссылки. Такой вариант реализации можно применять для «включения» экспрессии трансгена с зкДНК-вектора после ишемии или в ишемических тканях и/или в опухолях.

(vii) «Аварийные выключатели»

[00299] Другие варианты реализации, описанные в данном документе, относятся к зкДНК-вектору для экспрессии белка РАН, описанному в данном документе,
 30 содержащему аварийный выключатель. «Аварийный выключатель», раскрытый в данном документе, позволяет уничтожить клетку, содержащую указанный зкДНК-вектор, или подвергнуть ее программируемой клеточной гибели в качестве способа окончательного удаления введенного зкДНК-вектора из системы субъекта. Обычный специалист в данной области техники поймет, что применение «аварийных
 35 выключателей» в зкДНК-векторах для экспрессии белка РАН, как правило, будет сопряжено с нацеливанием зкДНК-вектора на ограниченное число клеток, потеря которого является приемлемой для субъекта, или на тип клеток, апоптоз которых желателен (например, на раковые клетки). Во всех аспектах «аварийный выключатель», раскрытый в данном документе, разработан таким образом, чтобы обеспечить быстрое
 40 и надежное уничтожение клетки, содержащей зкДНК-вектор, в отсутствие входного сигнала выживания или другого заданного условия. Другими словами, «аварийный выключатель», кодируемый зкДНК-вектором для экспрессии белка РАН, описанным в данном документе, может ограничивать выживание клетки, содержащей зкДНК-вектор, окружающей средой, задаваемой специфическими входными сигналами. Такие
 45 «аварийные выключатели» служат для обеспечения функции биологического сдерживания, если потребуется удалить зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН у субъекта или обеспечить отсутствие экспрессии с него кодируемого белка РАН.

[00300] Другие «аварийные выключатели», известные обычному специалисту в данной

области техники, предусмотрены для применения в зкДНК-векторе для экспрессии белка РАН, раскрытом в данном документе, например, как раскрыто в US2010/0175141; US2013/0009799; US2011/0172826; US2013/0109568, а также «аварийные выключатели», раскрытые в Jusiak et al, *Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine*; 2014; 1-56; Kobayashi et al., *PNAS*, 2004; 101; 8419-9; Marchisio et al., *Int. Journal of Biochem and Cell Biol.*, 2011; 43; 310-319; и в Reinshagen et al., *Science Translational Medicine*, 2018, 11, содержание которых полностью включено в данный документ посредством ссылки.

5 [00301] Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН может содержать конструкцию нуклеиновой кислоты «аварийного выключателя», которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую эффекторный токсин или репортерный белок, причем экспрессия эффекторного токсина (например, белка смерти) или репортерного белка контролируется с помощью заранее заданного условия. Например, предварительно заданным условием может быть наличие агента окружающей среды, такого как, например, экзогенный агент, без которого 15 клетка по умолчанию будет экспрессировать эффекторный токсин (например, белок смерти) и будет уничтожена. Согласно альтернативным вариантам реализации предварительно заданным условием является наличие двух или более агентов окружающей среды, например, клетка будет выживать только при подаче двух или более необходимых экзогенных агентов, и без какого-либо из них клетка, содержащая 20 зкДНК-вектор, уничтожается.

[00302] Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН модифицируют для включения «аварийного выключателя» для разрушения клеток, содержащих указанный зкДНК-вектор, для эффективной остановки экспрессии транскрипта, экспрессируемого указанным зкДНК-вектором (например, экспрессии белка 25 РАН) *in vivo*. В частности, зкДНК-вектор дополнительно генетически сконструирован для экспрессии белка-переключателя, который не функционирует в клетках млекопитающих в нормальных физиологических условиях. Клетки, экспрессирующие белок-переключатель, будут разрушены только после введения лекарственного средства или воздействия условия окружающей среды, специфически нацеленных на указанный 30 белок-переключатель, что остановит экспрессию терапевтического белка или пептида. Например, сообщалось, что клетки, экспрессирующие тимидинкиназу HSV, могут быть уничтожены при введении таких лекарственных средств как ганцикловир и цитозиндезаминаза. См., например, Dey and Evans, *Suicide Gene Therapy by Herpes Simplex Virus-1 Thymidine Kinase (HSV-TK)*, в *Targets in Gene Therapy*, под редакцией You (2011); 35 и Beltinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(15):8699-8704 (1999). Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор может содержать «аварийный выключатель» на основе кДНК, называемый DISE (гибель, индуцируемая устранением гена выживания, «Death Induced by Survival gene Elimination») (Murmans et al., *Oncotarget*. 2017; 8:84643-84658. *Induction of DISE in ovarian cancer cells in vivo*).

40 VI. Подробное описание способа получения зкДНК-вектора

A. Получение в целом

[00303] Определенные способы получения зкДНК-вектора для экспрессии белка РАН, содержащего пару асимметричных ITR или пару симметричных ITR, как определено в данном документе, описаны в разделе IV международной заявки PCT/ 45 US18/49996, поданной 7 сентября 2018 г., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, может быть получен с использованием клеток насекомых, как описано в данном документе. Согласно

альтернативным вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, может быть получен синтетическим способом и, в некоторых вариантах реализации, бесклеточным способом, как раскрыто в международной заявке РСТ/US19/14122, поданной 18 января 2019 г., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[00304] Как описано в данном документе, согласно одному варианту реализации, зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН может быть получен, например, с помощью способа, включающего этапы: а) инкубации популяции клеток-хозяев (например, клеток насекомых), несущих полинуклеотидную матрицу экспрессионной конструкции (например, зкДНК-плазмиду, зкДНК-бакмиду и/или зкДНК-бакуловирус), лишенную последовательностей, кодирующих вирусный капсид, в присутствии белка Рер в условиях, эффективных для индукции продуцирования указанного зкДНК-вектора в клетках-хозяевах и в течение периода времени, достаточного для этого, при этом указанные клетки-хозяева не содержат последовательностей, кодирующих вирусный капсид; и б) сбора и выделения зкДНК-вектора из клеток-хозяев. Присутствие белка Рер индуцирует репликацию векторного полинуклеотида с модифицированным ИТР для продуцирования зкДНК-вектора в клетке-хозяине. Однако вирусные частицы (например, вирионы ААВ) не экспрессируются. Таким образом, отсутствует ограничение по размеру, такое как присутствующее в естественных условиях в ААВ-векторах или других вирусных векторах.

[00305] Присутствие зкДНК-вектора, выделенного из клеток-хозяев, может быть подтверждено путем расщепления ДНК, выделенной из клетки-хозяина, рестрикционным ферментом, имеющим один сайт распознавания на зкДНК-векторе, и анализа расщепленного ДНК-материала на неденатурирующем геле для подтверждения присутствия характерных полос линейной и непрерывной ДНК по сравнению с линейной и прерывистой ДНК.

[00306] Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложено применение линий клеток-хозяев, имеющих стабильно интегрированную в собственный геном полинуклеотидную матрицу для экспрессии ДНК-вектора (зкДНК-матрицу), в получении невирусного ДНК-вектора, например, как описано в Lee, L. et al. (2013) Plos One 8(8): e69879. Предпочтительно Рер добавляют к клеткам-хозяевам при МОИ равной примерно 3. Когда линия клеток-хозяев представляет собой линию клеток млекопитающего, например, клетки НЕК293, линии клеток могут иметь стабильно интегрированную полинуклеотидную матрицу вектора, и второй вектор, такой как вирус герпеса, может использоваться для введения в клетки белка Рер, что позволяет вырезать и амплифицировать зкДНК в присутствии Рер и вспомогательного вируса.

[00307] Согласно одному варианту реализации клетки-хозяева, используемые для получения зкДНК-векторов для экспрессии белка РАН, описанных в данном документе, представляют собой клетки насекомых, и для доставки как полинуклеотида, который кодирует белок Рер, так и полинуклеотидной матрицы экспрессионной конструкции невирусного ДНК-вектора для зкДНК используют бакуловирус, например, согласно описанию на ФИГ. 4А-4С и в Примере 1. Согласно некоторым вариантам реализации клетку-хозяина конструируют так, чтобы она экспрессировала белок Рер.

[00308] Затем зкДНК-вектор собирают и выделяют из клеток-хозяев. Время сбора и извлечения зкДНК-векторов, описанных в данном документе, из клеток может быть выбрано и оптимизировано так, чтобы достичь продуцирования указанных зкДНК-векторов с высоким выходом. Например, время сбора может быть выбрано с учетом жизнеспособности клеток, морфологии клеток, размножения клеток и т. д. Согласно

одному варианту реализации клетки культивируют в достаточных условиях и собирают через достаточное время после инфекции бакуловирусом, чтобы получить зкДНК-векторы, но до начала гибели большинства клеток из-за токсичности бакуловируса.

5 ДНК-векторы могут быть выделены с применением наборов для очистки плазмид, таких как не содержащие эндотоксинов наборы для выделения плазмид (Endo-Free Plasmid Kits) от Qiagen. Другие способы, разработанные для выделения плазмид, также могут быть адаптированы для ДНК-векторов. Обычно могут быть использованы любые способы очистки нуклеиновых кислот.

10 [00309] ДНК-векторы могут быть очищены с помощью любых способов очистки ДНК, известных специалистам в данной области техники. Согласно одному варианту реализации зкДНК-векторы очищают в виде молекул ДНК. Согласно другому варианту реализации зкДНК-векторы очищают в виде экзосом или микрочастиц.

15 [00310] Наличие зкДНК-вектора для экспрессии белка РАН может быть подтверждено путем расщепления векторной ДНК, выделенной из клеток, рестрикционным ферментом, имеющим один сайт распознавания на ДНК-векторе, и анализа как расщепленного, так и нерасщепленного ДНК-материала с использованием гель-электрофореза, чтобы подтвердить наличие характерных полос линейной и непрерывной ДНК по сравнению с линейной и прерывистой ДНК. ФИГ. 4С и ФИГ. 4D иллюстрируют один вариант реализации для идентификации наличия зкДНК-векторов с замкнутыми концами, продуцируемых с помощью способов, описанных в данном документе.

В. зкДНК-плазида

25 [00311] зкДНК-плазида представляет собой плазмиду, используемую для последующего получения зкДНК-вектора для экспрессии белка РАН. Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-плазида может быть сконструирована с использованием известных методик, чтобы обеспечить по меньшей мере элементы, перечисленные далее, в виде функционально связанных компонентов в направлении транскрипции: (1) модифицированную последовательность 5'-ITR; (2) экспрессионную кассету, содержащую цис-регуляторный элемент, например, промотор, индуцируемый промотор, регуляторный переключатель, энхансеры и т.п.; и (3) модифицированную последовательность 3'-ITR, причем указанная последовательность 3'-ITR симметрична относительно последовательности 5'-ITR. Согласно некоторым вариантам реализации экспрессионная кассета, фланкированная ITR, содержит сайт клонирования для введения экзогенной последовательности. Экспрессионная кассета заменяет области, кодирующие гер и сар, геномов ААВ.

35 [00312] Согласно одному аспекту зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН получают из плазмиды, называемой в данном документе «зкДНК-плазмидой», кодирующей, в указанном порядке: первый инвертированный концевой повтор (ITR) аденоассоциированного вируса (ААВ), экспрессионную кассету, содержащую трансген, и мутированный или модифицированный ITR ААВ, причем указанная зкДНК-плазида лишена последовательностей, кодирующих капсидный белок ААВ. Согласно альтернативным вариантам реализации зкДНК-плазида кодирует, в указанном порядке: первый (или 5') модифицированный или мутированный ITR ААВ, экспрессионную кассету, содержащую трансген, и второй (или 3') модифицированный ITR ААВ, причем указанная зкДНК-плазида лишена последовательностей, кодирующих капсидный белок ААВ, и при этом указанные 5'- и 3'-ITR являются симметричными по отношению друг к другу. Согласно альтернативным вариантам реализации зкДНК-плазида кодирует, в указанном порядке: первый (или 5') модифицированный или мутированный ITR ААВ, экспрессионную кассету, содержащую

трансен, и второй (или 3') мутированный или модифицированный ITR ААВ, причем указанная зкДНК-плазмида лишена последовательностей, кодирующих капсидный белок ААВ, и при этом указанные модифицированные 5'- и 3'-ITR имеют одинаковые модификации (т. е. они являются обратно комплементарными или симметричными по отношению друг к другу).

[00313] Согласно дополнительному варианту реализации система зкДНК-плазмиды лишена последовательностей, кодирующих вирусный капсидный белок (т. е. лишена генов капсида ААВ, а также генов капсидов других вирусов). Кроме того, согласно конкретному варианту реализации зкДНК-плазмиды также лишена последовательностей, кодирующих белок Rep ААВ. Соответственно, в предпочтительном варианте реализации зкДНК-плазмиды лишена функциональных генов сар ААВ и гер ААВ, GG-3' для ААВ2, а также варибельной палиндромной последовательности, обеспечивающей образование шпильки.

[00314] ЗкДНК-плазмида согласно настоящему изобретению может быть получена с использованием природных нуклеотидных последовательностей из геномов любых серотипов ААВ, хорошо известных в данной области техники. Согласно одному варианту реализации остов зкДНК-плазмиды происходит из генома ААВ1, ААВ2, ААВ3, ААВ4, ААВ5, ААВ5, ААВ7, ААВ8, ААВ9, ААВ10, ААВ11, ААВ12, ААВrh8, ААВrh10, ААВ-DJ и ААВ-DJ8. Например, NCBI: NC 002077; NC 001401; NC001729; NC001829; NC006152; NC 006260; NC 006261; из указателя вирусов Kotin and Smith («The Springer Index of Viruses»), доступного по ссылке, поддерживаемой Springer (веб-адрес: oesys.springer.de/viruses/database/mkchapter.asp?virID=42.04.) (примечание: ссылки на указатель URL или базу данных подразумевают содержание доступного по ссылке ресурса URL или базы данных на фактическую дату подачи данной заявки). В конкретном варианте реализации остов зкДНК-плазмиды происходит из генома ААВ2. В другом конкретном варианте реализации остов зкДНК-плазмиды представляет собой синтетический остов, генетически сконструированный для включения на его 5'- и 3'-концах ITR, происходящих из одного из указанных геномов ААВ.

[00315] ЗкДНК-плазмида необязательно может включать селективируемый или селективный маркер для использования при создании линии клеток, продуцирующей зкДНК-вектор. Согласно одному варианту реализации селективный маркер может быть вставлен после (т. е. в 3'-направлении) последовательности 3'-ITR. Согласно другому варианту реализации селективный маркер может быть вставлен перед (т. е. в 5'-направлении) последовательностью 5'-ITR. Подходящие селективные маркеры включают, например, маркеры, придающие устойчивость к лекарственному средству. Селективные маркеры могут представлять собой, например, гены устойчивости к бластицидину S, канамицину, генетицину и т.п. Согласно предпочтительному варианту реализации селективный маркер для отбора по чувствительности к лекарственному средству представляет собой ген устойчивости к бластицидину S.

[00316] Примерный зкДНК-вектор (например, рААВ0) для экспрессии белка РАН получают из плазмиды рААВ. Способ получения рААВ-вектора может включать: (а) доставку в клетку-хозяина плазмиды рААВ, как описано выше, при этом как клетка-хозяин, так и плазмида лишены генов, кодирующих капсидный белок, (b) культивирование клетки-хозяина в условиях, обеспечивающих продуцирование генома зкДНК; и (с) сбор клеток и выделение генома ААВ, продуцированного из указанных клеток.

С. Примерный способ получения зкДНК-векторов из зкДНК-плазмид

[00317] В данном документе также предложены способы получения бескапсидных

зкДНК-векторов для экспрессии белка РАН, в частности, способ с достаточно высоким выходом для обеспечения достаточного количества вектора для экспериментов *in vivo*.

[00318] Согласно некоторым вариантам реализации способ получения зкДНК-вектора для экспрессии белка РАН включает следующие этапы: (1) введение конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей экспрессионную кассету и последовательности двух симметричных ITR, в клетку-хозяина (например, клетки Sf9), (2) необязательно создание клональной линии клеток, например, с применением селективного маркера, присутствующего на плазмиде, (3) введение кодирующего Rep гена (либо путем трансфекции, либо инфекции бакуловирусом, несущим указанный ген) в указанную клетку насекомого; и (4) сбор клеток и очистку зкДНК-вектора. Конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая экспрессионную кассету и последовательности двух ITR, описанная выше для получения зкДНК-вектора, может иметь форму зкДНК-плазмиды или бакмиды, или бакуловируса, полученных с использованием зкДНК-плазмиды, как описано ниже. Конструкция нуклеиновой кислоты может быть введена в клетку-хозяина путем трансфекции, вирусной трансдукции, стабильной интеграции или других способов, известных в данной области техники.

D. Линии клеток

[00319] Линии клеток-хозяев, используемые в получении зкДНК-вектора для экспрессии белка РАН, могут включать линии клеток насекомых, происходящие из *Spodoptera frugiperda*, такие как клетки Sf9, Sf21, или клетки *Trichoplusia ni*, или линии клеток других беспозвоночных животных, позвоночных животных или других эукариотов, включая клетки млекопитающих. Также могут быть использованы другие линии клеток, известные обычному специалисту в данной области техники, такие как HEK293, Huh-7, HeLa, HepG2, Hep1A, 911, CHO, COS, MeWo, NIH3T3, A549, HT1 180, моноциты, а также зрелые и незрелые дендритные клетки. Линии клеток-хозяев могут быть трансфицированы для стабильной экспрессии зкДНК-плазмиды для получения зкДНК-вектора с высоким выходом.

[00320] ЗкДНК-плазмиды могут быть введены в клетки Sf9 путем кратковременной трансфекции с использованием реагентов (например, липосомальных, фосфата кальция) или физических средств (например, электропорации), известных в данной области техники. В качестве альтернативы, могут быть созданы стабильные линии клеток Sf9 с зкДНК-плазмидой, стабильно интегрированной в их геномы. Такие стабильные линии клеток могут быть созданы путем включения селективного маркера в зкДНК-плазмиду, как описано выше. Если зкДНК-плазида, используемая для трансфекции линии клеток, включает селективный маркер, например, для антибиотика, клетки, которые были трансфицированы зкДНК-плазмидой и интегрировали ДНК зкДНК-плазмиды в их геном, могут быть отобраны путем добавления антибиотика в среды для культивирования клеток. Затем устойчивые клоны клеток могут быть выделены с помощью методик разведения до получения отдельных клеток или переноса колоний и размножены.

E. Выделение и очистка зкДНК-векторов:

[00321] Примеры способа получения и выделения зкДНК-векторов описаны на ФИГ. 4А-4Е и в конкретных примерах ниже. ЗкДНК-векторы для экспрессии белка РАН, раскрытые в данном документе, могут быть получены из клеток-продуцентов, экспрессирующих белок (белки) Rep ААВ, дополнительно трансформированных зкДНК-плазмидой, зкДНК-бакмидой или зкДНК-бакуловирусом. Плазмиды, которые можно применять для получения зкДНК-векторов, включают плазмиды, которые кодируют белок РАН, или плазмиды, кодирующие один или более белков REP.

[00322] Согласно одному аспекту полинуклеотид кодирует белок Rep AAB (Rep 78 или 68), доставляемый в клетку-продуцент в плазмиде (Rep-плазмиде), бакмиде (Rep-бакмиде) или бакуловирусе (Rep-бакуловирусе). Rep-плаزمиды, Rep-бакмиды и Rep-бакуловирусы могут быть получены с помощью способов, описанных выше.

5 [00323] В данном документе описаны способы получения зкДНК-вектора для экспрессии белка РАН. Экспрессионные конструкции, используемые для получения зкДНК-вектора для экспрессии белка РАН, описанного в данном документе, могут представлять собой плазмиду (например, зкДНК-плазмиду), бакмиду (например, зкДНК-бакмиду) и/или бакуловирус (например, зкДНК-бакуловирус). В качестве
10 неограничивающего примера, зкДНК-вектор может быть получен из клеток, коинфицированных зкДНК-бакуловирусом и Rep-бакуловирусом. Белки Rep продуцированные с Rep-бакуловируса, могут реплицировать зкДНК-бакуловирус с получением зкДНК-векторов. В качестве варианта, зкДНК-векторы для экспрессии
15 белка РАН могут быть получены из клеток, стабильно трансфицированных конструкцией, содержащей последовательность, кодирующую белок Rep AAV (Rep78/52), доставленной в Rep-плазмиды, Rep-бакмиды или Rep-бакуловирусы. ЗкДНК-бакуловирус может быть кратковременно трансфицирован в клетки, реплицирован с помощью белка Rep и может продуцировать зкДНК-векторы.

[00324] Бакмида (например, зкДНК-бакмида) может быть трансфицирована в
20 перmissive клетки насекомых, такие как клетка Sf9, Sf21, Tni (Trichoplusia ni), клетка High Five, и генерировать зкДНК-бакуловирус, который представляет собой рекомбинантный бакуловирус, включающий последовательности, содержащие симметричные ITR и экспрессионную кассету. Клетки насекомых могут быть снова
25 инфицированы зкДНК-бакуловирусом для получения следующего поколения рекомбинантного бакуловируса. Необязательно этап может быть повторен один или более раз для получения большего количества рекомбинантного бакуловируса.

[00325] Время сбора и извлечения зкДНК-векторов для экспрессии белка РАН, описанных в данном документе, из клеток может быть выбрано и оптимизировано так, чтобы достичь продуцирования указанных зкДНК-векторов с высоким выходом.
30 Например, время сбора может быть выбрано с учетом жизнеспособности клеток, морфологии клеток, размножения клеток и т. д. Обычно клетки могут быть собраны через период времени после инфекции бакуловирусом, достаточный для получения зкДНК-векторов (например, зкДНК-векторов), но до начала гибели большинства
35 клеток из-за вирусной токсичности. ЗкДНК-векторы могут быть выделены из клеток Sf9 с использованием наборов для очистки плазмид, таких как наборы Qiagen ENDO-FREE PLASMID[®]. Другие способы, разработанные для выделения плазмид, также могут быть адаптированы для зкДНК-векторов. Обычно можно использовать любые известные в данной области техники способы очистки нуклеиновых кислот, а также коммерчески доступные наборы для экстракции ДНК.

40 [00326] В качестве альтернативы, очистку можно осуществлять путем щелочного лизиса клеточного осадка, центрифугирования полученного лизата и выполнения хроматографического разделения. В качестве одного неограничивающего примера, указанный способ можно выполнять путем загрузки супернатанта на ионообменную
45 колонку (например, SARTOBIND Q[®]), которая удерживает нуклеиновые кислоты, с последующим элюированием (например, 1,2 М раствором NaCl) и выполнением дальнейшей хроматографической очистки на колонке для гель-фильтрации (например, на 6 Fast Flow GE). Бескапсидный AAB-вектор затем выделяют, например, путем осаждения.

[00327] Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-векторы для экспрессии белка РАН также могут быть очищены в форме экзосом или микрочастиц. В данной области техники известно, что многие типы клеток высвобождают не только растворимые белки, но и сложные грузы белок/нуклеиновая кислота путем отделения мембранных микровезикул (Cocucci et al, 2009; EP 10306226.1, полностью включенные в данный документ посредством ссылки). Такие везикулы включают микровезикулы (также называемые микрочастицами) и экзосомы (также называемые нановезикулами), и первые, и вторые содержат в качестве груза белки и РНК. Микровезикулы образуются в результате прямого отпочковывания плазматической мембраны, а экзосомы высвобождаются во внеклеточную среду при слиянии мультивезикулярных эндосом с плазматической мембраной. Соответственно, содержащие зкДНК-вектор микровезикулы и/или экзосомы могут быть выделены из клеток, трансдуцированных зкДНК-плазмидой или бакмидой, или бакуловирусом, полученным с использованием зкДНК-плазмиды.

[00328] Микровезикулы могут быть выделены путем фильтрации или ультрацентрифугирования культуральной среды при 20000×g, а экзосомы - при 100000×g. Оптимальная продолжительность ультрацентрифугирования может быть определена экспериментально и зависит от конкретного типа клеток, из которых выделяют везикулы. Предпочтительно культуральную среду сначала очищают с помощью низкоскоростного центрифугирования (например, при 2000×g в течение 5-20 минут) и подвергают центробежному концентрированию с использованием, например, центрифужной колонки AMICON® (Millipore, Уотфорд, Великобритания).

Микровезикулы и экзосомы могут быть дополнительно очищены с помощью FACS или MACS с использованием специфичных антител, распознающих конкретные поверхностные антигены, присутствующие на микровезикулах и экзосомах. Другие способы очистки микровезикул и экзосом включают, но не ограничиваются перечисленными, иммунопреципитацию, аффинную хроматографию, фильтрацию и магнитные гранулы, покрытые специфичными антителами или аптамерами. После очистки везикулы промывают, например, фосфатно-солевым буфером (ФСБ). Одним из преимуществ использования микровезикул или экзосом для доставки содержащих зкДНК везикул является то, что такие везикулы могут быть нацелены на клетки различных типов путем включения в их мембраны белков, распознаваемых специфическими рецепторами на соответствующих типах клеток. (см. также EP 10306226)

[00329] Другой аспект настоящего изобретения относится к способам очистки зкДНК-векторов из линий клеток-хозяев, которые стабильно интегрировали конструкцию зкДНК в их собственный геном. Согласно одному варианту реализации зкДНК-векторы очищают в виде молекул ДНК. Согласно другому варианту реализации зкДНК-векторы очищают в виде экзосом или микрочастиц.

[00330] ФИГ. 5 международной заявки PCT/US18/49996 показывает гель, подтверждающий продуцирование зкДНК из нескольких конструкций зкДНК-плазмид с использованием способа, описанного в Примерах. ЗкДНК-вектор подтверждается характерным профилем полос в геле, как обсуждается в отношении ФИГ. 4D в Примерах.

VII. Фармацевтические композиции

[00331] Согласно другому аспекту предложены фармацевтические композиции. Фармацевтическая композиция содержит зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, описанный в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

[00332] зкДНК-векторы для экспрессии белка РАН, описанные в данном документе,

могут быть включены в фармацевтические композиции, пригодные для введения субъекту для *in vivo* доставки в клетки, ткани или органы субъекта. Как правило, фармацевтическая композиция содержит зкДНК-вектор, раскрытый в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Например, зкДНК-векторы для экспрессии белка РАН, описанные в данном документе, могут быть включены в фармацевтическую композицию, подходящую для целевого пути терапевтического введения (например, парентерального введения). Также предусмотрена пассивная трансдукция ткани путем внутривенной или внутриартериальной инфузии под высоким давлением, а также внутриклеточной инъекции, такой как внутриядерная микроинъекция или внутрицитоплазматическая инъекция. Фармацевтические композиции для терапевтических целей могут быть изготовлены в виде раствора, микроэмульсии, дисперсии, липосом или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации зкДНК-вектора. Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения соединения зкДНК-вектора в необходимом количестве в соответствующем буфере с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизацией путем фильтрации, включая зкДНК-вектор, который может быть изготовлен для доставки трансгена в нуклеиновой кислоте в клетки реципиента, что приводит к терапевтической экспрессии в них трансгена или донорной последовательности. Композиция также может включать фармацевтически приемлемый носитель.

[00333] Фармацевтически активные композиции, содержащие зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, могут быть изготовлены для доставки трансгена для различных целей в клетку, например, в клетки субъекта.

[00334] Фармацевтические композиции для терапевтических целей, как правило, должны быть стерильными и стабильными в условиях изготовления и хранения. Композиция может быть изготовлена в виде раствора, микроэмульсии, дисперсии, липосом или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации зкДНК-вектора. Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения соединения зкДНК-вектора в необходимом количестве в соответствующем буфере с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизацией путем фильтрации.

[00335] зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, может быть включен в фармацевтическую композицию, пригодную для местного, системного, внутриамниотического, интратекального, внутричерепного, внутриартериального, внутривенного, внутрелимфатического, внутрибрюшинного, подкожного, трахеального, внутритканевого (например, внутримышечного, внутрисердечного, внутripеченочного, внутripочечного, интрацеребрального), интратекального, интравезикального, конъюнктивального (например, экстраорбитального, интраорбитального, ретроорбитального, интаретинального, субретинального, хориоидального, субхориоидального, интрастромального, интракамерального и интравитреального), интракохлеарного и мукозального (например, перорального, ректального, назального) введения. Также предусмотрена пассивная трансдукция ткани путем внутривенной или внутриартериальной инфузии под высоким давлением, а также внутриклеточной инъекции, такой как внутриядерная микроинъекция или внутрицитоплазматическая инъекция.

[00336] В некоторых аспектах способы, предложенные в данном документе, включают доставку одного или более зкДНК-векторов для экспрессии белка РАН, раскрытых в данном документе, в клетку-хозяина. В данном документе также предложены клетки,

полученные с помощью таких способов, и организмы (такие как животные, растения или грибы), содержащие или полученные из таких клеток. Способы доставки нуклеиновых кислот могут включать липофекцию, нуклеофекцию, микроинъекцию, биолистику, липосомы, иммунолипосомы, конъюгаты поликатион или липид:
 5 нуклеиновая кислота, «незащищенную» ДНК и усиленное агентом поглощение ДНК. Липофекция описана, например, в патентах США №№ 5049386, 4946787 и 4897355), полностью включенных в данный документ посредством ссылки, и реагенты для липофекции продаются коммерчески (например, трансфектам (Transfectam™) и липофектин (Lipofectin™)). Доставка может осуществляться в клетки (например, введение
 10 *in vitro* или *ex vivo*) или в ткани-мишени (например, введение *in vivo*).

[00337] В данной области техники известны различные методики и способы доставки нуклеиновых кислот в клетки. Например, нуклеиновые кислоты, такие как зкДНК для экспрессии белка РАН, могут быть изготовлены в виде состава липидных наночастиц (ЛНЧ), липидоидов, липосом, липидных наночастиц, липоплексов или наночастиц типа
 15 ядро-оболочка. Как правило, ЛНЧ состоят из молекул нуклеиновой кислоты (например, зкДНК), одного или более ионизируемых или катионных липидов (или их солей), одного или более неионных или нейтральных липидов (например, фосфолипида), молекулы, которая предотвращает агрегацию (например, ПЭГ или конъюгата ПЭГ-липид), и необязательно стерина (например, холестерина).

[00338] Другой способ доставки нуклеиновых кислот, таких как зкДНК для экспрессии белка РАН, в клетку, заключается в конъюгации нуклеиновой кислоты с лигандом, который интернализуется клеткой. Например, лиганд может связывать рецептор на поверхности клетки и интернализироваться за счет эндоцитоза. Лиганд может быть ковалентно связан с нуклеотидом в нуклеиновой кислоте. Примерные конъюгаты для
 25 доставки нуклеиновых кислот в клетку описаны, например, в WO2015/006740, WO2014/025805, WO2012/037254, WO2009/082606, WO2009/073809, WO2009/018332, WO2006/112872, WO2004/090108, WO2004/091515 и WO2017/177326, содержание которых полностью включено в данный документ посредством ссылки.

[00339] Нуклеиновые кислоты, такие как зкДНК-векторы для экспрессии белка РАН, также могут быть доставлены в клетку путем трансфекции. Подходящие способы трансфекции включают, но не ограничиваются перечисленными, опосредуемую липидами трансфекцию, опосредуемую катионным полимером трансфекцию или осаждение фосфатом кальция. Реагенты для трансфекции хорошо известны в данной области техники и включают, но не ограничиваются перечисленными, реагент для
 35 трансфекции TurboFect (Thermo Fisher Scientific), реагент Pro-Ject (Thermo Fisher Scientific), реагент для трансфекции белков TRANSPASS™ P (New England Biolabs), реагент для доставки белков CHARLOT™ (Active Motif), реагент для трансфекции белков PROTEOJUICE™ (EMD Millipore), 293fectin, LIPOFECTAMINE™ 2000, LIPOFECTAMINE™ 3000 (Thermo Fisher Scientific), LIPOFECTAMINE™ (Thermo Fisher Scientific),
 40 LIPOFECTIN™ (Thermo Fisher Scientific), DMRIE-C, CELLFECTIN™ (Thermo Fisher Scientific), OLIGOFECTAMINE™ (Thermo Fisher Scientific), LIPOFECTACE™, FUGENE™ (Roche, Базель, Швейцария), FUGENE™ HD (Roche), TRANSFECTAM™ (трансфектам, Promega, Мэдисон, Висконсин), TFX-10™ (Promega), TFX-20™ (Promega), TFX-50™ (Promega), TRANSFECTIN™ (BioRad, Геркулес, Калифорния), SILENTFECT™ (Bio-Rad),
 45 Effectene™ (Qiagen®, Валенсия, Калифорния), DC-chol (Avanti Polar Lipids), GENEPORTER™ (Gene Therapy Systems, Сан-Диего, Калифорния), DHARMAFECT 1™ (Dharmacon, Лафайет, Колорадо), DHARMAFECT 2™ (Dharmacon), DHARMAFECT 3™ (Dharmacon), DHARMAFECT 4™ (Dharmacon), ESCORT™ III (Sigma, Сент-Луис, Миссури)

и ESCORT™ IV (Sigma Chemical Co.). Нуклеиновые кислоты, такие как зкДНК, также могут быть доставлены в клетку с помощью микроструйных способов, известных специалистам в данной области техники.

5 [00340] зкДНК-векторы для экспрессии белка РАН, описанные в данном документе, также можно вводить непосредственно в организм для трансдукции клеток *in vivo*. Введение осуществляют любым из путей, обычно используемых для приведения молекулы в максимальный контакт с клетками крови или тканей, включая, но не ограничиваясь перечисленными, инъекцию, инфузию, местное нанесение и электропорацию. Подходящие способы введения таких нуклеиновых кислот доступны
10 и хорошо известны специалистам в данной области техники, и хотя для введения конкретной композиции можно использовать более одного пути, конкретный путь часто может обеспечить более быструю и более эффективную реакцию по сравнению с другим путем введения.

15 [00341] Способы введения векторной нуклеиновой кислоты, такой как зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, могут включать доставку в гемопоэтические стволовые клетки, например, с помощью способов, описанных, например, в патенте США № 5928638, который полностью включен в данный документ посредством ссылки.

20 [00342] зкДНК-векторы для экспрессии белка РАН в соответствии с настоящим изобретением могут быть добавлены к липосомам для доставки в клетку или орган-мишень у субъекта. Липосомы представляют собой везикулы, которые имеют по меньшей мере один липидный бислой. Липосомы, как правило, используются в качестве носителей для доставки лекарственных/терапевтических средств в контексте фармацевтической разработки. Они функционируют путем слияния с клеточной
25 мембраной и перегруппировки ее липидной структуры для доставки лекарственного средства или активного фармацевтического ингредиента (АФИ). Липосомальные композиции для такой доставки состоят из фосфолипидов, в частности, соединений, содержащих фосфатидилхолиновую группу, однако указанные композиции также могут включать другие липиды. Примерные липосомы и липосомные составы, включая, но
30 не ограничиваясь перечисленными, соединения, содержащие функциональные группы полиэтиленгликоля (ПЭГ), раскрыты в международной заявке РСТ/US2018/050042, поданной 7 сентября 2018 г., и в международной заявке РСТ/US2018/064242, поданной 6 декабря 2018 г., например, см. раздел, озаглавленный «Фармацевтические композиции», содержание каждой из которых полностью включено в данный документ посредством
35 ссылки.

[00343] Различные способы доставки, известные в данной области техники, или их модификации, могут быть использованы для доставки зкДНК-векторов *in vitro* или *in vivo*. Например, согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-векторы для экспрессии белка РАН доставляют, образуя кратковременное отверстие в клеточной
40 мембране с использованием механической, электрической, ультразвуковой, гидродинамической или лазерной энергии так, чтобы облегчить вход ДНК в целевые клетки. Например, зкДНК-вектор может быть доставлен путем кратковременного разрыва клеточной мембраны путем продавливания клетки через канал ограниченного размера или другими способами, известными в данной области техники. В некоторых
45 случаях зкДНК-вектор по отдельности напрямую вводят в виде незащищенной ДНК путем инъекции в любую из: любую одну или более тканей, выбранных из: печени, почек, желчного пузыря, простаты, надпочечников, сердца, кишечника, легкого и желудка, кожи, тимуса, сердечной мышцы или скелетной мышцы. В некоторых случаях

зкДНК-вектор доставляют с помощью генной пушки. Сферические частицы золота или вольфрама (диаметром 1-3 мкм), покрытые бескапсидными ААВ-векторами, могут быть разогнаны до высокой скорости с помощью сжатого газа для проникновения в клетки целевой ткани.

5 [00344] Композиции, содержащие зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН и фармацевтически приемлемый носитель, конкретно предусмотрены в данном документе. Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор изготовлен с липидной системой доставки, например, липосомами, как описано в данном документе. Согласно некоторым вариантам реализации такие композиции вводят любым путем, желательным
10 для квалифицированного специалиста. Композиции могут быть введены субъекту различными путями, включая пероральный, парентеральный, сублингвальный, трансдермальный, ректальный, трансмукозальный, местный, путем ингаляции, путем буккального введения, внутривенный, внутриартериальный, внутрибрюшинный, подкожный, внутримышечный, интраназальный, интратекальный
15 и внутрисуставной или их комбинации. Для ветеринарного применения композиция может быть введена в виде достаточно приемлемого состава в соответствии с обычной ветеринарной практикой. Ветеринарный врач может легко определить схему дозирования и путь введения, которые наиболее подходят для конкретного животного. Композиции могут быть введены с помощью обычных шприцев, безыгольных
20 инъекционных устройств, «генных пушек с бомбардировкой микрочастицами» или других физических методов, таких как электропорация («ЭП»), гидродинамические методы или применение ультразвука.

[00345] В некоторых случаях зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН доставляют путем гидродинамической инъекции, которая представляет собой простой и
25 высокоэффективный способ прямой внутриклеточной доставки любых водорастворимых соединений и частиц во внутренние органы и скелетные мышцы во всей конечности.

[00346] В некоторых случаях зкДНК-векторы для экспрессии белка РАН доставляют с помощью ультразвука, создавая наноскопические поры в мембране для облегчения
внутриклеточной доставки частиц ДНК в клетки внутренних органов или опухолей,
30 поэтому размер и концентрация плазмидной ДНК имеют большое значение для эффективности системы. В некоторых случаях зкДНК-векторы доставляют путем магнитофекции с использованием магнитных полей для концентрирования частиц, содержащих нуклеиновую кислоту, в клетках-мишенях.

[00347] В некоторых случаях могут быть использованы химические системы доставки,
35 например, с использованием наномерных комплексов, которые включают уплотнение отрицательно заряженной нуклеиновой кислоты поликатионными наномерными частицами, в составе катионной липосомы/мицеллы или катионных полимеров. Катионные липиды, используемые в указанном способе доставки, включают, но не ограничиваются перечисленными, моновалентные катионные липиды, поливалентные
40 катионные липиды, гуанидин-содержащие соединения, соединения производных холестерина, катионные полимеры (например, полиэтиленмин, поли-L-лизин, протамин, другие катионные полимеры) и гибриды липид-полимер.

А. Экзосомы:

[00348] Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии
45 белка РАН, раскрытый в данном документе, доставляют упакованным в экзосоме. Экзосомы представляют собой небольшие мембранные везикулы эндоцитарного происхождения, которые высвобождаются во внеклеточную среду после слияния мультивезикулярных телец с плазматической мембраной. Их поверхность состоит из

липидного бислоя клеточной мембраны донорной клетки, они содержат цитозоль из клетки, которая продуцировала экзосому, и экспонируют на поверхности мембранные белки родительской клетки. Экзосомы продуцируются различными типами клеток, в том числе эпителиальными клетками, В- и Т-лимфоцитами, тучными клетками (МС), а также дендритными клетками (DC). Согласно некоторым вариантам реализации для применения предусмотрены экзосомы с диаметром от 10 нм до 1 мкм, от 20 нм до 500 нм, от 30 нм до 250 нм, от 50 до 100 нм. Экзосомы могут быть выделены для доставки в целевые клетки либо с использованием их донорных клеток, либо путем введения в них конкретных нуклеиновых кислот. Для получения экзосом, содержащих бескапсидные ААВ-векторы согласно настоящему изобретению, могут быть использованы различные подходы, известные в данной области техники.

А. Микрочастица/наночастицы

[00349] Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, доставляют с помощью липидной наночастицы. Обычно липидные наночастицы содержат ионизируемый аминоклипид (например, гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат, DLin-МС3-DMA, фосфатидилхолин(1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин, DSPC), холестерин и липид оболочки (полиэтиленгликоль-димиристоилглицерин, ПЭГ-ДМГ), например, как раскрыто Tam et al. (2013). *Advances in Lipid Nanoparticles for siRNA delivery. Pharmaceuticals* 5(3): 498-507.

[00350] Согласно некоторым вариантам реализации липидная наночастица имеет средний диаметр от примерно 10 до примерно 1000 нм. Согласно некоторым вариантам реализации липидная наночастица имеет диаметр менее 300 нм. Согласно некоторым вариантам реализации липидная наночастица имеет диаметр от примерно 10 до примерно 300 нм. Согласно некоторым вариантам реализации липидная наночастица имеет диаметр менее 200 нм. Согласно некоторым вариантам реализации липидная наночастица имеет диаметр от примерно 25 до примерно 200 нм. Согласно некоторым вариантам реализации препарат липидных наночастиц (например, композиция, содержащая множество липидных наночастиц) имеет распределение по размерам, при котором средний размер (например, диаметр) составляет от примерно 70 нм до примерно 200 нм, и более типично средний размер составляет примерно 100 нм или менее.

[00351] Для доставки ДНК-вектора для экспрессии белка РАН, раскрытого в данном документе, могут быть использованы различные липидные наночастицы, известные в данной области техники. Например, различные способы доставки с применением липидных наночастиц описаны в патентах США №№ 9404127, 9006417 и 9518272.

[00352] Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, доставляют с помощью наночастицы золота. Обычно нуклеиновая кислота может быть ковалентно связана с наночастицей золота или нековалентно связана с наночастицей золота (например, связана заряд-зарядным взаимодействием), например, согласно описанию Ding et al. (2014). *Gold Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery. Mol. Ther.* 22(6); 1075-1083. Согласно некоторым вариантам реализации конъюгаты наночастицы золота с нуклеиновой кислотой получают с использованием способов, описанных, например, в патенте США № 6812334.

В. Конъюгаты

[00353] Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, конъюгирован (например, ковалентно связан) с агентом, который увеличивает клеточное поглощение. «Агент, который увеличивает клеточное поглощение» представляет собой молекулу, которая облегчает

транспорт нуклеиновой кислоты через липидную мембрану. Например, нуклеиновая кислота может быть конъюгирована с липофильным соединением (например, холестерин, токоферол и т. д.), проникающим в клетки пептидом (СРР) (например, пенетратином, ТАТ, Syn1В и т. д.) и полиаминами (например, спермином).

5 Дополнительные примеры агентов, которые увеличивают поглощение клетками, раскрыты, например, в Winkler (2013). *Oligonucleotide conjugates for therapeutic applications*. *Ther. Deliv.* 4(7); 791-809.

[00354] Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, конъюгирован с полимером (например, полимерной молекулой) или молекулой фолата (например, молекулой фолиевой кислоты). В целом, доставка нуклеиновых кислот, конъюгированных с полимерами, известна в данной области техники, например, описана в WO2000/34343 и WO2008/022309. Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, конъюгирован с полиамидным полимером, например, согласно описанию в патенте США № 8987377. Согласно некоторым вариантам реализации нуклеиновая кислота, описанная в настоящем раскрытии, конъюгирована с молекулой фолиевой кислоты согласно описанию в патенте США № 8507455.

[00355] Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, конъюгирован с углеводом, например, как описано в патенте США № 8450467.

С. Нанокapsула

[00356] В качестве альтернативы, могут применяться нанокapsульные составы зкДНК-вектора для экспрессии белка РАН, раскрытого в данном документе. Обычно нанокapsулы могут захватывать вещества стабильным и воспроизводимым образом. Чтобы избежать побочных эффектов, обусловленных внутриклеточной перегрузкой полимерами, такие ультрадисперсные частицы (размером около 0,1 мкм) необходимо конструировать с использованием полимеров, способных разлагаться *in vivo*. Предусмотрено применение биоразлагаемых полиалкил-цианоакрилатных наночастиц, которые удовлетворяют таким требованиям.

Д. Липосомы

[00357] ЗкДНК-векторы для экспрессии белка РАН в соответствии с настоящим изобретением могут быть добавлены к липосомам для доставки в клетку или орган-мишень у субъекта. Липосомы представляют собой везикулы, которые имеют по меньшей мере один липидный бислой. Липосомы, как правило, используются в качестве носителей для доставки лекарственных/терапевтических средств в контексте фармацевтической разработки. Они функционируют путем слияния с клеточной мембраной и перегруппировки ее липидной структуры для доставки лекарственного средства или активного фармацевтического ингредиента (АФИ). Липосомальные композиции для такой доставки состоят из фосфолипидов, в частности, соединений, содержащих фосфатидилхолиновую группу, однако указанные композиции также могут включать другие липиды.

[00358] Изготовление и применение липосом в целом известно специалистам в данной области техники. Были разработаны липосомы с улучшенной стабильностью в сыворотке и временем полужизни в кровотоке (патент США № 5741516). Кроме того, были описаны различные способы получения липосом и липосомоподобных препаратов в качестве потенциальных носителей лекарственных средств (патенты США №№ 5567434; 5552157; 5565213; 5738868 и 5795587, полностью включенные в данный документ

посредством ссылки).

Е. Примерные композиции липосом и липидных наночастиц (ЛНЧ)

[00359] ЗкДНК-векторы для экспрессии белка РАН в соответствии с настоящим изобретением могут быть добавлены к липосомам для доставки в клетку, например, в клетку, нуждающуюся в экспрессии трансгена. Липосомы представляют собой везикулы, которые имеют по меньшей мере один липидный бислой. Липосомы, как правило, используются в качестве носителей для доставки лекарственных/терапевтических средств в контексте фармацевтической разработки. Они работают за счет слияния с клеточной мембраной и перегруппировки ее липидной структуры для доставки лекарственного средства или активного фармацевтического ингредиента (АФИ). Липосомальные композиции для такой доставки состоят из фосфолипидов, в частности, соединений, содержащих фосфатидилхолиновую группу, однако указанные композиции также могут включать другие липиды.

[00360] Липидные наночастицы (ЛНЧ), содержащие зкДНК-векторы, раскрыты в международной заявке РСТ/US2018/050042, поданной 7 сентября 2018 г., и международной заявке РСТ/US2018/064242, поданной 6 декабря 2018 г., которые полностью включены в данный документ, и предусмотрены для применения в способах и композициях зкДНК-векторов для экспрессии белка РАН, раскрытых в данном документе.

[00361] Согласно некоторым аспектам настоящего раскрытия предложен липосомальный состав, который включает одно или более соединений с функциональной группой полиэтиленгликоля (ПЭГ) (так называемых «пегилированных соединений»), которые могут снижать иммуногенность/антигенность, обеспечивать гидрофильность и гидрофобность, а также уменьшать частоту дозирования соединения (соединений). В других случаях, липосомальный состав просто включает полимер полиэтиленгликоль (ПЭГ) в качестве дополнительного компонента. В таких аспектах молекулярная масса ПЭГ или функциональной группы ПЭГ может составлять от 62 Да до примерно 5000 Да.

[00362] Согласно некоторым аспектам настоящего раскрытия предложен липосомальный состав, который доставит АФИ с профилем пролонгированного или контролируемого высвобождения на протяжении периода времени от нескольких часов до недель. Согласно некоторым родственным аспектам липосомальный состав может содержать водные камеры, которые ограничены липидными бислоями. Согласно другим родственным аспектам липосомальный состав инкапсулирует АФИ с компонентами, которые претерпевают физический переход при повышенной температуре, который высвобождает АФИ в течение периода от нескольких часов до недель.

[00363] Согласно некоторым аспектам липосомальный состав содержит сфингомиелин и один или более липидов, раскрытых в данном документе. Согласно некоторым аспектам липосомальный состав содержит оптисомы.

[00364] Согласно некоторым аспектам настоящего раскрытия предложен липосомальный состав, который содержит один или более липидов, выбранных из: натриевой соли N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоль 2000)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина, (дистеароил-sn-глицерофосфоэтаноламина), MPEG (метоксиполиэтиленгликоль)-конъюгированного липида, HSPC (гидрогенизированного соевого фосфатидилхолина); ПЭГ (полиэтиленгликоля); DSPE (дистеароил-sn-глицерофосфоэтаноламина); DSPC (дистеароилфосфатидилхолина); DOPC (диолеоилфосфатидилхолина); DPPG (дипальмитоилфосфатидилглицерина); EPC (яичного фосфатидилхолина); DOPS (диолеоилфосфатидилсерина); POPC

(пальмитоилолеоилфосфатидилхолина); SM (сфингомиелина); MPEG (метоксиполиэтиленгликоля); DMPC (димиристоилфосфатидилхолина); DMPG (димиристоилфосфатидилглицерина); DSPG (дистеароилфосфатидилглицерина); DEPC (диэрукоилфосфатидилхолина); DOPE (диолеоил-sn-глицерофосфоэтаноламина), сульфата холестерина (CS), дипальмитоилфосфатидилглицерина (DPPG), DOPC (диолеоил-sn-глицерофосфатидилхолина) или любой их комбинации.

[00365] Согласно некоторым аспектам настоящего раскрытия предложен липосомальный состав, содержащий фосфолипид, холестерин и пегилированный липид в молярном соотношении 56:38:5. Согласно некоторым аспектам общее содержание липидов в липосомальном составе составляет 2-16 мг/мл. Согласно некоторым аспектам настоящего раскрытия предложен липосомальный состав, содержащий липид, содержащий фосфатидилхолиновую функциональную группу, липид, содержащий этаноламиную функциональную группу, и пегилированный липид. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения предложен липосомальный состав, содержащий липид, содержащий фосфатидилхолиновую функциональную группу, липид, содержащий этаноламиную функциональную группу, и пегилированный липид, в молярном соотношении 3:0,015:2, соответственно. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения предложен липосомальный состав, содержащий липид, содержащий фосфатидилхолиновую функциональную группу, холестерин и пегилированный липид. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения предложен липосомальный состав, содержащий липид, содержащий фосфатидилхолиновую функциональную группу, холестерин и пегилированный липид. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения предложен липосомальный состав, содержащий DPPG, соевый ФХ, липидный конъюгат MPEG-DSPE и холестерин.

[00366] Согласно некоторым аспектам настоящего раскрытия предложен липосомальный состав, содержащий один или более липидов, содержащих фосфатидилхолиновую функциональную группу, и один или более липидов, содержащих этаноламиную функциональную группу. Согласно некоторым аспектам настоящего раскрытия предложен липосомальный состав, содержащий одно или более из: липидов, содержащих фосфатидилхолиновую функциональную группу, липидов, содержащих этаноламиную функциональную группу, и стероидов, например, холестерина. Согласно некоторым аспектам липосомальный состав содержит DOPC/DEPC; и DOPE.

[00367] Согласно некоторым аспектам настоящего раскрытия предложен липосомальный состав, дополнительно содержащий одно или более фармацевтических вспомогательных веществ, например, сахарозу и/или глицин.

[00368] Согласно некоторым аспектам настоящего раскрытия предложен липосомальный состав с униламеллярной или мультламеллярной структурой. Согласно некоторым аспектам настоящего раскрытия предложен липосомальный состав, который содержит мультивезикулярные частицы и/или частицы на основе пены. Согласно некоторым аспектам настоящего раскрытия предложен липосомальный состав, относительный размер которого больше, чем у обычных наночастиц, и составляет примерно от 150 до 250 нм. Согласно некоторым аспектам липосомальный состав представляет собой лиофилизированный порошок.

[00369] Согласно некоторым аспектам настоящего раскрытия предложен липосомальный состав, который получают и нагружают зкДНК-векторами, раскрытыми или описанными в данном документе, путем добавления слабого основания к смеси, содержащей выделенную зкДНК вне липосомы. Такое добавление повышает значение

pH вне липосом до приблизительно 7,3 и стимулирует вход АФИ в липосому. Согласно некоторым аспектам настоящего раскрытия предложен липосомальный состав, имеющий кислый pH внутри липосомы. В таких случаях значение pH внутри липосом может составлять 4-6,9 и более предпочтительно pH 6,5. Согласно другим аспектам настоящего раскрытия предложен липосомальный состав, полученный с применением технологии внутрилипосомальной стабилизации лекарственных средств. В таких случаях используют полимерные или неполимерные высокозаряженные анионы и внутрилипосомальные захватывающие агенты, например, полифосфат или октасульфат сахарозы.

[00370] Согласно некоторым аспектам настоящего раскрытия предложена липидная наночастица, содержащая зкДНК и ионизируемый липид. Например, состав липидных наночастиц, который получают и нагружают зкДНК, полученной с помощью способа, раскрытого в международной заявке РСТ/US2018/050042, поданной 7 сентября 2018 г., которая включена в данный документ. Это можно осуществлять путем интенсивного смешивания этанольных растворов липидов с водным раствором зкДНК при низком pH, при котором происходит протонирование ионизируемого липида и обеспечиваются благоприятные энергетические характеристики для ассоциации зкДНК/липид и нуклеации частиц. Частицы могут быть дополнительно стабилизированы путем разбавления водой и удаления органического растворителя. Частицы могут быть сконцентрированы до целевого уровня.

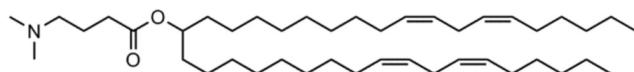
[00371] Обычно липидные частицы получают при соотношении общего количества липида и зкДНК (массовом или весовом) от примерно 10:1 до 30:1. Согласно некоторым вариантам реализации соотношение липида и зкДНК (массовое соотношение; отношение масс./масс.) может находиться в диапазоне значений от примерно 1:1 до примерно 25:1, от примерно 10:1 до примерно 14:1, от примерно 3:1 до примерно 15:1, от примерно 4:1 до примерно 10:1, от примерно 5:1 до примерно 9:1 или от примерно 6:1 до примерно 9:1. Количество липидов и зкДНК могут быть скорректированы, чтобы обеспечить целевое соотношение N/P, например, соотношение N/P, равное 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или выше. Обычно общее содержание липидов в составе липидных частиц может быть в диапазоне от примерно 5 мг/мл до примерно 30 мг/мл.

[00372] Ионизируемый липид, как правило, применяется для конденсации груза нуклеиновой кислоты, например, зкДНК, при низком pH, и для стимуляции ассоциации мембран и их фузогенности. Обычно ионизируемые липиды представляют собой липиды, содержащие по меньшей мере одну аминогруппу, которая положительно заряжена или становится протонированной в кислых условиях, например, при pH 6,5 или ниже. В данном документе ионизируемые липиды также называют катионными липидами.

[00373] Примерные ионизируемые липиды описаны в международных РСТ публикациях патентов WO2015/095340, WO2015/199952, WO2018/011633, WO2017/049245, WO2015/061467, WO2012/040184, WO2012/000104, WO2015/074085, WO2016/081029, WO2017/004143, WO2017/075531, WO2017/117528, WO2011/022460, WO2013/148541, WO2013/116126, WO2011/153120, WO2012/044638, WO2012/054365, WO2011/090965, WO2013/016058, WO2012/162210, WO2008/042973, WO2010/129709, WO2010/144740, WO2012/099755, WO2013/049328, WO2013/086322, WO2013/086373, WO2011/071860, WO2009/132131, WO2010/048536, WO2010/088537, WO2010/054401, WO2010/054406, WO2010/054405, WO2010/054384, WO2012/016184, WO2009/086558, WO2010/042877, WO2011/000106, WO2011/000107, WO2005/120152, WO2011/141705, WO2013/126803, WO2006/007712, WO2011/038160, WO2005/121348, WO2011/066651, WO2009/127060, WO2011/141704, WO2006/069782, WO2012/031043, WO2013/006825, WO2013/033563, WO2013/089151, WO2017/099823, WO2015/095346 и WO2013/086354, и публикациях

патентов США US2016/0311759, US2015/0376115, US2016/0151284, US2017/0210697, US2015/0140070, US2013/0178541, US2013/0303587, US2015/0141678, US2015/0239926, US2016/0376224, US2017/0119904, US2012/0149894, US2015/0057373, US2013/0090372, US2013/0274523, US2013/0274504, US2013/0274504, US2009/0023673, US2012/0128760, 5 US2010/0324120, US2014/0200257, US2015/0203446, US2018/0005363, US2014/0308304, US2013/0338210, US2012/0101148, US2012/0027796, US2012/0058144, US2013/0323269, US2011/0117125, US2011/0256175, US2012/0202871, US2011/0076335, US2006/0083780, US2013/0123338, US2015/0064242, US2006/0051405, US2013/0065939, US2006/0008910, US2003/0022649, US2010/0130588, US2013/0116307, US2010/0062967, US2013/0202684, 10 US2014/0141070, US2014/0255472, US2014/0039032, US2018/0028664, US2016/0317458 и US2013/0195920, содержание которых полностью включено в данный документ посредством ссылки.

[00374] Согласно некоторым вариантам реализации ионизируемый липид представляет собой MC3 (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино) 15 бутаноат (DLin-MC3-DMA или MC3), имеющий следующую структуру:



DLin-M-C3-DMA ("MC3")

[00375] ипид DLin-MC3-DMA описан в Jayaraman et al., Angew. Chem. Int. Ed Engl. (2012), 51(34): 8529-8533, содержание которой полностью включено в данный документ 20 посредством ссылки.

[00376] Согласно некоторым вариантам реализации ионизируемый липид представляет собой липид ATX-002, описанный в WO 2015/074085, содержание которого полностью 25 включено в данный документ посредством ссылки.

[00377] Согласно некоторым вариантам реализации ионизируемый липид представляет собой (13Z,16Z)-N,N-диметил-3-нонилдокоза-13,16-диен-1-амин (Соединение 32), описанный в WO2012/040184, содержание которого полностью включено в данный 30 документ посредством ссылки.

[00378] Согласно некоторым вариантам реализации ионизируемый липид представляет собой Соединение 6 или Соединение 22, описанные в WO2015/199952, содержание 35 которого полностью включено в данный документ посредством ссылки.

[00379] Без ограничений, ионизируемый липид может составлять 20-90% (мол.) от общего количества липидов, присутствующих в липидной наночастице. Например, 35 молярное содержание ионизируемого липида может составлять 20-70% (мол.), 30-60% (мол.) или 40-50% (мол.) от общего количества липидов, присутствующих в липидной наночастице. Согласно некоторым вариантам реализации ионизируемый липид составляет от примерно 50 мол.% до примерно 90 мол.%, от общего количества липидов, присутствующих в липидной наночастице.

[00380] Согласно некоторым аспектам липидная наночастица может дополнительно 40 содержать некатионный липид. Неионогенные липиды включают амфипатические липиды, нейтральные липиды и анионные липиды. Соответственно, некатионный липид может представлять собой нейтральный незаряженный, цвиттерионный или анионный липид. Некатионные липиды, как правило, применяют для усиления фузогенности.

[00381] Примерные некатионные липиды, предусмотренные для применения в 45 способах и композициях, раскрытых в данном документе, описаны в международной заявке PCT/US2018/050042, поданной 7 сентября 2018 г., и PCT/US2018/064242, поданной 6 декабря 2018 г., которые полностью включены в данный документ. Примерные

некатионные липиды описаны в публикации международной заявки WO2017/099823 и публикации патента США US2018/0028664, содержание которых полностью включено в данный документ посредством ссылки.

5 [00382] Некатионный липид может составлять 0-30% (мол.) от общего количества липидов, присутствующих в липидной наночастице. Например, содержание некатионного липида составляет 5-20% (мол.) или 10-15% (мол.) от общего количества липидов, присутствующих в липидной наночастице. Согласно различным вариантам реализации молярное соотношение ионизируемого липида и нейтрального липида колеблется от примерно 2:1 до примерно 8:1.

10 [00383] Согласно некоторым вариантам реализации липидные наночастицы не содержат каких-либо фосфолипидов. Согласно некоторым аспектам липидная наночастица может дополнительно содержать компонент, такой как стерин, для обеспечения целостности мембраны.

15 [00384] Один примерный стерин, который подходит для применения в липидной наночастице, представляет собой холестерин и его производные. Примерные производные холестерина описаны в международной заявке WO2009/127060 и публикации патента США US2010/0130588, содержание которых полностью включено в данный документ посредством ссылки.

20 [00385] Компонент, обеспечивающий целостность мембраны, такой как стерин, может составлять 0-50% (мол.) от общего количества липидов, присутствующих в липидной наночастице. Согласно некоторым вариантам реализации такой компонент составляет 20-50% (мол.) 30-40% (мол.) от общего содержания липидов липидной наночастицы.

25 [00386] Согласно некоторым аспектам липидная наночастица может дополнительно содержать полиэтиленгликоль (ПЭГ) или молекулу конъюгированного липида. Обычно их используют для ингибирования агрегации липидных наночастиц и/или для обеспечения стерической стабилизации. Примерные конъюгированные липиды включают, но не ограничиваются перечисленными, конъюгаты ПЭГ-липид, конъюгаты полиоксазолин (POZ)-липид, конъюгаты полиамид-липид (такие как конъюгаты АТТА-липид), конъюгаты катионная группа-полимер-липид (CPL) и их смеси. Согласно некоторым вариантам реализации молекула конъюгированного липида представляет собой конъюгат ПЭГ-липид, например, метоксиполиэтиленгликоль-конъюгированный липид. Примерные конъюгаты ПЭГ-липид включают, но не ограничиваются перечисленными, ПЭГ-диацилглицерин (ДАГ) (такой как 1-
35 (монометоксиполиэтиленгликоль)-2,3-димиристоилглицерин (ПЭГ-ДМГ)), ПЭГ-диалкилоксипропил (ДАА), ПЭГ-фосфолипид, ПЭГ-церамид (Cer), пегилированный фосфатидилэтаноламин (ПЭГ-ФЭ), ПЭГ-сукцинатдиацилглицерин (PEGS-DAG) (такой как 4-О-(2',3'-ди(тетрадеканоиокси)пропил-1-О)-(ω-метокси(полиэтокси)этил)бутандиоат (PEG-S-DMG)), ПЭГ-диалкоксипропилкарбам, натриевая соль N-
40 (карбонилметоксиполиэтиленгликоль 2000)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина или их смесь. Дополнительные примерные конъюгаты ПЭГ-липид описаны, например, в US5885613, US6287591, US2003/0077829, US2003/0077829, US2005/0175682, US2008/0020058, US2011/0117125, US2010/0130588, US2016/0376224 и US2017/0119904, содержание которых полностью включено в данный документ посредством
45 ссылки.

[00387] Согласно некоторым вариантам реализации ПЭГ-липид представляет собой соединение, раскрытое в US2018/0028664, содержание которого полностью включено в данный документ посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам реализации

ПЭГ-липид раскрыт в US20150376115 или в US2016/0376224, содержание которых полностью включено в данный документ посредством ссылки.

[00388] Конъюгат ПЭГ-ДАА может представлять собой, например, ПЭГ-дилаурилоксипропил, ПЭГ-димиристилоксипропил, ПЭГ-дипальмитилоксипропил или ПЭГ-дистеарилоксипропил. ПЭГ-липид может представлять собой одно или более из ПЭГ-ДМГ, ПЭГ-дилаурилглицерина, ПЭГ-дипальмитоилглицерина, ПЭГ-дистерилглицерина, ПЭГ-дилаурилглицамида, ПЭГ-димиристилглицамида, ПЭГ-дипальмитоилглицамида, ПЭГ-дистерилглицамида, ПЭГ-холестерина (1-[8'-(холест-5-ен-3β-окси)карбоксамидо-3',6'-диооксаоктанил]карбамоил-[омега]-метилполиэтиленгликоль, ПЭГ-DMB (простой эфир 3,4-дитетрадекоксилбензил-[омега]-метилполиэтиленгликоля) и 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метоксиполиэтиленгликоль-2000]. В некоторых примерах ПЭГ-липид может быть выбран из группы, состоящей из ПЭГ-ДМГ, 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метоксиполиэтиленгликоля-2000].

[00389] Липиды, конъюгированные с молекулой, отличной от ПЭГ, также могут быть использованы вместо ПЭГ-липида. Например, конъюгаты полиоксазолин (POZ)-липид, конъюгаты полиамид-липид (такие как конъюгаты АТТА-липид) и конъюгаты катионная группа-полимер-липид (CPL) могут применяться вместо или вместе с ПЭГ-липидом. Примерные конъюгированные липиды, т. е. ПЭГ-липиды, конъюгаты (POZ)-липид, конъюгаты АТТА-липид и катионный полимер-липиды, описаны в публикациях международных заявок на патент WO1996/010392, WO1998/051278, WO2002/087541, WO2005/026372, WO2008/147438, WO2009/086558, WO2012/000104, WO2017/117528, WO2017/099823, WO2015/199952, WO2017/004143, WO2015/095346, WO2012/000104, WO2012/000104 и WO2010/006282, публикациях заявок на патент США US2003/0077829, US2005/0175682, US2008/0020058, US2011/0117125, US2013/0303587, US2018/0028664, US2015/0376115, US2016/0376224, US2016/0317458, US2013/0303587, US2013/0303587 и US20110123453, и патентах США US5885613, US6287591, US6320017 и US6586559, содержание которых полностью включено в данный документ посредством ссылки.

[00390] Согласно некоторым вариантам реализации одно или более дополнительных соединений могут представлять собой терапевтический агент. Терапевтический агент может быть выбран из любого класса, подходящего для применения в терапевтических целях. Другими словами, терапевтический агент может быть выбран из любого класса, подходящего для применения в терапевтических целях. Другими словами, терапевтический агент может быть выбран в соответствии с терапевтической целью и целевым биологическим действием. Например, если зкДНК в ЛНЧ можно применять для лечения ФКУ, дополнительное соединение может представлять собой агент, направленный против ФКУ (например, химиотерапевтический агент или другую терапию ФКУ (включая, но не ограничиваясь перечисленными, малую молекулу или антитело). Согласно другому примеру, если ЛНЧ, содержащую зкДНК, можно применять для лечения инфекции, дополнительное соединение может представлять собой антимикробный агент (например, антибиотик или противовирусное соединение). Согласно еще одному примеру, если ЛНЧ, содержащую зкДНК, можно применять для лечения иммунного заболевания или нарушения, дополнительное соединение может представлять собой соединение, которое модулирует иммунный ответ (например, иммуносупрессор, иммуностимулирующее соединение или соединение, модулирующее один или более конкретных иммунных путей). Согласно некоторым вариантам реализации в композициях и способах согласно настоящему изобретению могут применяться другие смеси различных липидных наночастиц, содержащих другие

соединения, такие как зкДНК, кодирующая другой белок или другое соединение, такое как терапевтическое средство.

5 [00391] Согласно некоторым вариантам реализации дополнительное соединение представляет собой иммуномодулирующий агент. Например, дополнительное соединение представляет собой иммуносупрессор. Согласно некоторым вариантам реализации
дополнительное соединение представляет собой иммуностимулирующий агент. В данном документе также предложена фармацевтическая композиция, содержащая
10 инкапсулированный в липидную наночастицу продуцируемый клеткой насекомого или синтетически продуцируемый зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное
вещество.

[00392] Согласно некоторым аспектам настоящего раскрытия предложен состав
липидных наночастиц, дополнительно содержащий одно или более фармацевтических
15 вспомогательных веществ. Согласно некоторым вариантам реализации состав липидных наночастиц дополнительно содержит сахарозу, tris, трегалозу и/или глицин.

[00393] зкДНК-вектор может образовывать комплексы с липидной частью (portion)
частицы или может быть инкапсулирован в липидной части (position) липидной
наночастицы. Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК может быть
20 полностью инкапсулирована в липидной части липидной наночастицы, что защищает ее от разрушения нуклеазой, например, в водном растворе. Согласно некоторым
вариантам реализации зкДНК в липидной наночастице не разрушается в значительной
степени после воздействия на липидную наночастицу нуклеазы при 37°C в течение по
меньшей мере примерно 20, 30, 45 или 60 минут. Согласно некоторым вариантам
25 реализации зкДНК в липидной наночастице не разрушается в значительной степени
после инкубации частицы в сыворотке при 37°C в течение по меньшей мере примерно
30, 45 или 60 минут, или по меньшей мере примерно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18,
20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 или 36 часов.

[00394] Согласно определенным вариантам реализации липидные наночастицы по
существу нетоксичны для субъекта, например, млекопитающего, такого как человек.
30 Согласно некоторым аспектам состав липидных наночастиц представляет собой
лиофилизированный порошок.

[00395] Согласно некоторым вариантам реализации липидные наночастицы
представляют собой частицы с твердой сердцевиной, которые имеют по меньшей мере
один липидный бислой. Согласно другим вариантам реализации липидные наночастицы
35 имеют небислойную структуру, т. е., имеют неламеллярную (т. е., небислойную)
морфологию. Без ограничений, небислойная морфология может включать, например,
трехмерные трубки, стержни, частицы кубической симметрии и т. д. Например,
морфологию липидных наночастиц (ламеллярных в сравнении с неламеллярными)
можно легко оценить и охарактеризовать с использованием, например, анализа методом
40 «крио-ТЭМ» (криотрансмиссионная электронная микроскопия), как описано в US2010/
0130588, содержание которого полностью включено в данный документ посредством
ссылки.

[00396] Согласно некоторым другим вариантам реализации липидные наночастицы,
имеющие неламеллярную морфологию, являются электронно-плотными. Согласно
45 некоторым аспектам настоящего раскрытия предложена липидная наночастица, которая
является либо однослойной, либо многослойной по структуре. Согласно некоторым
аспектам настоящего раскрытия предложен состав липидных наночастиц, который
содержит мультивезикулярные частицы и/или частицы на основе пены.

[00397] Контролируя композицию и содержание липидных компонентов, можно контролировать скорость, с которой липидный конъюгат высвобождается из липидной частицы, и, в свою очередь, скорость, с которой липидная наночастица становится фузогенной. Кроме того, другие переменные, включая, например, pH, температуру или ионную силу, могут применяться для изменения и/или контроля скорости, с которой липидная наночастица становится фузогенной. Другие способы, которые могут применяться для контроля скорости, с которой указанная липидная наночастица становится фузогенной, будут понятны обычным специалистам в данной области техники после ознакомления с указанным описанием. Также будет понятно, что размер липидных частиц можно контролировать путем контроля композиции и концентрации липидного конъюгата.

[00398] pKa катионных липидов в составах может быть сопоставлена с эффективностью ЛНЧ для доставки нуклеиновых кислот (см. Jayaraman et al, *Angewandte Chemie, International Edition* (2012), 51(34), 8529-8533; Semple et al, *Nature Biotechnology* 28, 172-176 (2010), обе работы полностью включены в данный документ посредством ссылки). Предпочтительный диапазон pKa составляет от ~5 до ~7. pKa катионного липида в липидных наночастицах может быть определена с использованием анализа, основанного на флуоресценции 2-(п-толуидино)-6-нафталинсульфоновой кислоты (TNS).

20 VIII. Способы применения

[00399] ЗкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, также можно применять в способе доставки представляющей интерес нуклеотидной последовательности (например, кодирующей белок РАН) в клетку-мишень (например, клетку-хозяина). Способ, в частности, может представлять собой способ доставки белка РАН в клетку субъекта, нуждающегося в этом, и лечения ФКУ. Настоящее изобретение обеспечивает экспрессию *in vivo* белка РАН, закодированного в зкДНК-векторе, в клетке у субъекта так, чтобы возник терапевтический эффект экспрессии белка РАН. Указанные результаты наблюдаются как в *in vivo*, так и в *in vitro* режимах доставки зкДНК-вектора.

30 [00400] Кроме того, согласно настоящему изобретению предложен способ доставки белка РАН в клетку субъекта, нуждающегося в этом, включающий многократные введения зкДНК-вектора согласно настоящему изобретению, кодирующего указанный белок РАН. Поскольку зкДНК-вектор согласно настоящему изобретению не индуцирует иммунный ответ, подобный тому, который, как правило, наблюдается против инкапсидированных вирусных векторов, такая стратегия многократного введения, вероятно, будет иметь больший успех в системе на основе зкДНК. ЗкДНК-вектор вводят в количествах, достаточных для трансфекции клеток целевой ткани и обеспечения достаточных уровней переноса генов и экспрессии белка РАН без неоправданных нежелательных эффектов. Обычные и фармацевтически приемлемые пути введения 40 включают, но не ограничиваются перечисленными, введение в сетчатку (например, субретинальную инъекцию, супрахориоидальную инъекцию или интравитреальную инъекцию), внутривенное введение (например, в липосомальном составе), прямую доставку в выбранный орган (например, в любую одну или более тканей, выбранных из: печени, почек, желчного пузыря, простаты, надпочечников, сердца, кишечника, легкого и желудка), внутримышечный и другие парентеральные пути введения. Пути введения могут быть скомбинированы, при необходимости.

[00401] Доставка зкДНК-вектора для экспрессии белка РАН, описанного в данном документе, не ограничивается доставкой экспрессируемого белка РАН. Например,

зкДНК-векторы, полученные с помощью обычного способа (например, с использованием способа продуцирования на основе клеток (например, способов продуцирования в клетках насекомых)) или синтетического способа, как описано в данном документе, можно применять вместе с другими предложенными системами доставки, чтобы обеспечить часть генной терапии. Один неограничивающий пример системы, которую можно комбинировать с зкДНК-векторами в соответствии с настоящим раскрытием, включает системы, которые доставляют по отдельности один или более кофакторов или иммунных супрессоров для эффективной генной экспрессии зкДНК-вектора, экспрессирующего белок РАН.

[00402] Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения ФКУ у субъекта, включающий введение в нуждающуюся в этом целевую клетку (в частности, в мышечную клетку или ткань) указанного субъекта терапевтически эффективного количества зкДНК-вектора, необязательно с фармацевтически приемлемым носителем. Несмотря на то, что зкДНК-вектор может быть введен в присутствии носителя, такой носитель не является необходимым. Выбранный зкДНК-вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок РАН, который можно применять для лечения ФКУ. В частности, зкДНК-вектор может содержать целевую последовательность белка РАН, функционально связанную с контрольными элементами, способными управлять транскрипцией целевого белка РАН, кодируемого экзогенной последовательностью ДНК, при введении субъекту. ЗкДНК-вектор может быть введен любым подходящим путем, предложенным выше и в других разделах данного документа.

[00403] Композиции и векторы, предложенные в данном документе, можно применять для доставки белка РАН с различными целями. Согласно некоторым вариантам реализации трансген кодирует белок РАН, который предназначен для применения в исследовательских целях, например, для создания соматической трансгенной модели на животных, несущей трансген, например, для исследования функции продукта белка РАН. В другом примере трансген кодирует белок РАН, который предназначен для применения с целью создания модели ФКУ на животных. Согласно некоторым вариантам реализации кодируемый белок РАН можно применять для лечения или предотвращения ФКУ у млекопитающего-субъекта. Белок РАН может быть перенесен в организм пациента (например, экспрессирован у пациента) в количестве, достаточном для лечения ФКУ, ассоциированной с пониженной экспрессией, отсутствием экспрессии или дисфункцией указанного гена.

[00404] В принципе, экспрессионная кассета может включать нуклеиновую кислоту или любой трансген, который кодирует белок РАН, который либо снижен, либо отсутствует из-за мутации, либо который обеспечивает терапевтическую пользу при сверхэкспрессии, и рассматривается, как включенная в объем настоящего изобретения. Предпочтительно не вставленная бактериальная ДНК не присутствует и предпочтительно бактериальная ДНК не присутствует в композициях зкДНК, предложенных в данном документе.

[00405] ЗкДНК-вектор не ограничивается одной молекулой зкДНК-вектора. Таким образом, в другом аспекте несколько зкДНК-векторов, экспрессирующих разные белки или один и тот же белок РАН, но функционально связанный с различными промоторами или цис-регуляторными элементами, могут быть доставлены одновременно или последовательно в целевую клетку, ткань, орган или в организм субъекта. Таким образом, эта стратегия может обеспечить одновременную генную терапию несколькими белками или доставку их генов. Также можно разместить разные части белка РАН в отдельных зкДНК-векторах (например, разные домены и/или кофакторы, необходимые

для функциональности белка РАН), например, которые могут быть введены одновременно или в разные моменты времени, и которые можно регулировать по отдельности, добавляя посредством этого дополнительный уровень контроля экспрессии белка РАН. Доставку также можно выполнять несколько раз и, что важно для генной 5 терапии в клинических условиях, с последующим увеличением или снижением доз, учитывая отсутствие иммунного ответа хозяина против капсида вследствие отсутствия вирусного капсида. Ожидается, что ответ против капсида не возникнет из-за отсутствия капсида.

[00406] Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения у 10 субъекта ФКУ, включающий введение в нуждающуюся в этом целевую клетку (в частности, в мышечную клетку или ткань) указанного субъекта терапевтически эффективного количества зкДНК-вектора, раскрытого в данном документе, необязательно с фармацевтически приемлемым носителем. Несмотря на то, что зкДНК-вектор может быть введен в присутствии носителя, такой носитель не является 15 необходимым. Реализованный зкДНК-вектор содержит представляющую интерес нуклеотидную последовательность, подходящую для лечения ФКУ. В частности, зкДНК-вектор может содержать целевую экзогенную последовательность ДНК, функционально связанную с контрольными элементами, способными управлять транскрипцией целевого полипептида, белка или олигонуклеотида, кодируемого указанной экзогенной 20 последовательностью ДНК, при введении субъекту. ЗкДНК-вектор может быть введен любым подходящим путем, предложенным выше и в других разделах данного документа.

IX. Способы доставки зкДНК-векторов для продукции белка РАН

[00407] Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии 25 белка РАН может быть доставлен в клетку-мишень *in vitro* или *in vivo* различными подходящими способами. ЗкДНК-векторы могут быть применены или инъецированы по отдельности. ДНК-векторы могут быть доставлены в клетку без помощи реагента для трансфекции или других физических средств. В качестве альтернативы, зкДНК-векторы для экспрессии белка РАН могут быть доставлены с использованием любого 30 известного в данной области техники реагента для трансфекции или других известных в данной области техники физических средств, которые облегчают проникновение ДНК в клетку, например, липосом, спиртов, соединений, богатых полилизинном, соединений, богатых аргинином, фосфата кальция, микровезикул, микроинъекции, электропорации и т.п.

[00408] зкДНК-векторы для экспрессии белка РАН, раскрытые в данном документе, 35 могут быть эффективно нацелены на типы клеток и тканей, которые обычно трудно трансдуцировать обычными вирионами ААВ с использованием различных реагентов для доставки.

[00409] Один аспект технологии, описанной в данном документе, относится к способу доставки белка РАН в клетку. Как правило, для способов *in vivo* и *in vitro* зкДНК-вектор 40 для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, может быть введен в клетку с использованием способов, раскрытых в данном документе, а также других способов, известных в данной области техники. ЗкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, предпочтительно вводят в клетку в биологически эффективном количестве. Если зкДНК-вектор вводят в клетку *in vivo* (например, 45 субъекту), биологически эффективное количество зкДНК-вектора представляет собой количество, достаточное для трансдукции и экспрессии белка РАН в клетке-мишени.

[00410] Примерные способы введения зкДНК-вектора для экспрессии белка РАН, раскрытого в данном документе, включают пероральный, ректальный,

трансмукозальный, интраназальный, ингаляционный (например, с помощью аэрозоля), буккальный (например, сублингвальный), вагинальный, интратекальный, внутриглазной, трансдермальный, внутриэндотелиальный, in utero (или in ovo), парентеральный (например, внутривенный, подкожный, внутрикожный, внутричерепной, внутримышечный [включая введение в скелетную, диафрагмальную и/или сердечную мышцу], внутриплевральный, внутримозговой и внутрисуставной). Введение может представлять собой системную или прямую доставку в печень или куда-либо еще (например, в любые почки, желчный пузырь, простату, надпочечники, сердце, кишечник, легкое и желудок).

[00411] Введение может быть местным (например, на поверхность кожи и слизистых оболочек, включая поверхности дыхательных путей и трансдермальное введение), внутрилимфатическим и т.п., а также путем прямой инъекции в ткань или орган (например, но не ограничиваясь этим, в печень, а также в глаз, мышцы, включая скелетную мышцу, сердечную мышцу, диафрагмальную мышцу, или головной мозг).

[00412] ЗкДНК-вектор может быть введен в любое место у субъекта, включая, без ограничения, место, выбранное из группы, состоящей из печени и/или также глаз, головного мозга, скелетной мышцы, гладкой мышцы, сердца, диафрагмы, эпителия дыхательных путей, почки, селезенки, поджелудочной железы, кожи.

[00413] Наиболее подходящий путь в любом конкретном случае будет зависеть от характера и тяжести состояния, подлежащего лечению, облегчению и/или предотвращению, а также от характера конкретного используемого зкДНК-вектора. Кроме того, зкДНК позволяет вводить более одного белка РАН в одном векторе или в нескольких зкДНК-векторах (например, смесь зкДНК).

А. Внутримышечное введение зкДНК-вектора

[00414] Согласно некоторым вариантам реализации способ лечения заболевания у субъекта включает введение в нуждающуюся в этом целевую клетку (в частности, в мышечную клетку или ткань) указанного субъекта терапевтически эффективного количества зкДНК-вектора, кодирующего белок РАН, необязательно с фармацевтически приемлемым носителем. Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН вводят в мышечную ткань субъекта.

[00415] Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор может быть введен в любое место у субъекта, включая, без ограничения, место, выбранное из группы, состоящей из скелетной мышцы, гладкой мышцы, сердца, диафрагмы или мышц глаза.

[00416] Введение зкДНК-вектора для экспрессии белка РАН, раскрытого в данном документе, в скелетную мышцу в соответствии с настоящим изобретением включает, но не ограничивается этим, введение в скелетную мышцу в конечностях (например, верхнюю часть плеча, нижнюю часть плеча, верхнюю части ноги и/или нижнюю часть ноги), спину, шею, голову (например, язык), грудную клетку, живот, таз/промежность и/или пальцы. ЗкДНК-вектор, раскрытый в данном документе, может быть доставлен в скелетную мышцу путем внутривенного введения, внутриартериального введения, внутрибрюшинного введения, перфузии конечности (необязательно изолированной перфузии конечности для ноги и/или руки; см., например, Arruda et al., (2005) Blood 105: 3458-3464), и/или путем прямой внутримышечной инъекции. Согласно конкретным вариантам реализации зкДНК-вектор, раскрытый в данном документе, вводят в печень, глаз, конечность (руку и/или ногу) субъекта (например, субъекта с мышечной дистрофией, такой как МДД) путем перфузии конечности, необязательно изолированной перфузии конечности (например, путем внутривенного или внутрисуставного введения).

В вариантах реализации зкДНК-вектор, раскрытый в данном документе, можно вводить без применения «гидродинамических» методик.

[00417] Например, доставка в ткань (например, сетчатку) обычных вирусных векторов часто усиливается гидродинамическими методиками (например, внутривенным/
5 внутривенным введением в большом объеме), которые увеличивают давление в сосудистой сети и облегчают способность вирусного вектора пересекать барьер из эндотелиальных клеток. Согласно конкретным вариантам реализации зкДНК-векторы, описанные в данном документе, можно вводить без гидродинамических методик, таких как инфузии большого объема и/или повышенное внутрисосудистое давление (например,
10 выше нормального систолического давления, например, повышение внутрисосудистого давления на величину менее или равную 5%, 10%, 15%, 20%, 25% от нормального систолического давления). Такие методы могут уменьшить или позволяют избежать побочных эффектов, ассоциированных с гидродинамическими методиками, таких как отек, повреждение нервов и/или синдром сдавливания.

[00418] Кроме того, композиция, содержащая зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, которую вводят в скелетную мышцу, может быть введена в скелетную мышцу в конечностях (например, в верхнюю часть плеча, нижнюю часть плеча, верхнюю части ноги и/или нижнюю часть ноги), спину, шею, голову (например, язык), грудную клетку, живот, таз/промежность и/или пальцы. Подходящие
20 скелетные мышцы включают, но не ограничиваются перечисленными, *abductor digiti minimi* (в кисти), *abductor digiti minimi* (в стопе), *abductor hallucis*, *abductor ossis metatarsi quinti*, *abductor pollicis brevis*, *abductor pollicis longus*, *adductor brevis*, *adductor hallucis*, *adductor longus*, *adductor magnus*, *adductor pollicis*, *anconeus*, *anterior scalene*, *articularis genus*, *biceps brachii*, *biceps femoris*, *brachialis*, *brachioradialis*, *buccinator*, *coracobrachialis*, *corrugator supercilii*, *deltoid*, *depressor anguli oris*, *depressor labii inferioris*, *digastric*, *dorsal interossei* (в кисти), *dorsal interossei* (в стопе), *extensor carpi radialis brevis*, *extensor carpi radialis longus*, *extensor carpi ulnaris*, *extensor digiti minimi*, *extensor digitorum*, *extensor digitorum brevis*, *extensor digitorum longus*, *extensor hallucis brevis*, *extensor hallucis longus*, *extensor indicis*, *extensor pollicis brevis*, *extensor pollicis longus*, *flexor carpi radialis*, *flexor carpi ulnaris*, *flexor digiti minimi brevis* (в кисти), *flexor digiti minimi brevis* (в стопе), *flexor digitorum brevis*, *flexor digitorum longus*, *flexor digitorum profundus*, *flexor digitorum superficialis*, *flexor hallucis brevis*, *flexor hallucis longus*, *flexor pollicis brevis*, *flexor pollicis longus*, *frontalis*, *gastrocnemius*, *geniohyoid*, *gluteus maximus*, *gluteus medius*, *gluteus minimus*, *gracilis*, *iliocostalis cervicis*, *iliocostalis lumborum*, *iliocostalis thoracis*, *iliacus*, *inferior gemellus*, *inferior oblique*, *inferior rectus*, *infraspinatus*, *interspinalis*, *intertransversi*, *lateral pterygoid*, *lateral rectus*, *latissimus dorsi*, *levator anguli oris*, *levator labii superioris*, *levator labii superioris alaeque nasi*, *levator palpebrae superioris*, *levator scapulae*, *long rotators*, *longissimus capitis*, *longissimus cervicis*, *longissimus thoracis*, *longus capitis*, *longus colli*, *lumbricals* (в кисти), *lumbricals* (в стопе), *masseter*, *medial pterygoid*, *medial rectus*, *middle scalene*, *multifidus*, *mylohyoid*, *obliquus capitis inferior*, *obliquus capitis superior*, *obturator externus*, *obturator internus*, *occipitalis*, *omohyoid*, *opponens digiti minimi*, *opponens pollicis*, *orbicularis oculi*, *orbicularis oris*, *palmar interossei*, *palmaris brevis*, *palmaris longus*, *pectineus*, *pectoralis major*, *pectoralis minor*, *peroneus brevis*, *peroneus longus*, *peroneus tertius*, *piriformis*, *plantar interossei*, *plantaris*, *platysma*, *popliteus*, *posterior scalene*, *pronator quadratus*, *pronator teres*, *psoas major*, *quadratus femoris*, *quadratus plantae*, *rectus capitis anterior*, *rectus capitis lateralis*, *rectus capitis posterior major*, *rectus capitis posterior minor*, *rectus femoris*, *rhomboideus major*, *rhomboideus minor*, *risorius*, *sartorius*, *scalenus minimus*, *semimembranosus*, *semispinalis capitis*, *semispinalis cervicis*, *semispinalis thoracis*, *semitendinosus*, *serratus anterior*, *short rotators*, *soleus*, *spinalis capitis*, *spinalis cervicis*, *spinalis thoracis*, *splenius*

capitis, splenius cervicis, sternocleidomastoid, sternohyoid, sternothyroid, stylohyoid, subclavius, subscapularis, superior gemellus, superior oblique, superior rectus, supinator, supraspinatus, temporalis, tensor fascia lata, teres major, teres minor, thoracis, thyrohyoid, tibialis anterior, tibialis posterior, trapezius, triceps brachii, vastus intermedius, vastus lateralis, vastus medialis, zygomaticus major и zygomaticus minor, а также любую другую подходящую скелетную мышцу, известную в данной области техники.

[00419] Введение зкДНК-вектора для экспрессии белка РАН, раскрытого в данном документе, в диафрагмальную мышцу можно осуществлять любым подходящим способом, включая внутривенное введение, внутриартериальное введение и/или внутрибрюшинное введение. Согласно некоторым вариантам реализации доставка экспрессированного с зкДНК-вектора трансгена в ткань-мишень также может быть достигнута путем доставки синтетического депо, содержащего зкДНК-вектор, причем депо, содержащее зкДНК-вектор, имплантируют в скелетную, гладкомышечную, сердечную и/или диафрагмальную мышечную ткань или мышечная ткань может быть приведена в контакт с пленкой или другим матриксом, содержащим зкДНК-вектор, как описано в данном документе. Такие имплантируемые матриксы или субстраты описаны в патенте США № 7201898, полностью включенном в данный документ посредством ссылки.

[00420] Введение зкДНК-вектора для экспрессии белка РАН, раскрытого в данном документе, в сердечную мышцу включает введение в левое предсердие, правое предсердие, левый желудочек, правый желудочек и/или перегородку. ЗкДНК-вектор, описанный в данном документе, может быть доставлен в сердечную мышцу путем внутривенного введения, внутриартериального введения, такого как внутриаортальное введение, прямой сердечной инъекции (например, в левое предсердие, правое предсердие, левый желудочек, правый желудочек), и/или перфузии коронарной артерии.

[00421] Введение зкДНК-вектора для экспрессии белка РАН, раскрытого в данном документе, в гладкую мышцу можно осуществлять любым подходящим способом, включая внутривенное введение, внутриартериальное введение и/или внутрибрюшинное введение. Согласно одному варианту реализации введение можно осуществлять в эндотелиальные клетки, присутствующие в гладких мышцах, рядом с ними и/или на них. Неограничивающие примеры гладких мышц включают радужную оболочку глаза, бронхиолы легкого, мышцы гортани (голосовые связки), мышечные слои желудка, пищевода, тонкого и толстого кишечника желудочно-кишечного тракта, мочеочника, детрузора мочевого пузыря, миометрия матки, полового члена или простаты.

[00422] Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, вводят в скелетную мышцу, диафрагмальную мышцу и/или сердечную мышцу. В типичных вариантах реализации зкДНК-вектор в соответствии с настоящим изобретением применяют для лечения и/или предотвращения нарушений скелетной, сердечной и/или диафрагмальной мышцы.

[00423] В частности, предусмотрено, что композиция, содержащая зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, может быть доставлена в одну или более мышц глаза (например, Lateral rectus, Medial rectus, Superior rectus, Inferior rectus, Superior oblique, Inferior oblique), мимические мышцы (такие мышцы как Occipitofrontalis, Temporoparietalis, Procerus, Nasalis, Depressor septi nasi, Orbicularis oculi, Corrugator supercilii, Depressor supercilii, Auriculars, Orbicularis oris, Depressor anguli oris, Risorius, Zygomaticus major, Zygomaticus minor, Levator labii superioris, Levator labii superioris alaeque nasi, Depressor labii inferioris, Levator anguli oris, Buccinator, Mentalis) или мышцы языка (например, подбородочно-язычную мышцу, подъязычно-язычную мышцу,

хрящезычную мышцу, шилоязычную мышцу, небно-язычную мышцу, верхнюю продольную мышцу, нижнюю продольную мышцу, вертикальную мышцу и поперечную мышцу).

(i) Внутримышечная инъекция:

5 [00424] Согласно некоторым вариантам реализации композиция, содержащая зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, может быть введена путем инъекции в одно или более мест конкретной мышцы, например, скелетной мышцы (например, дельтовидной, латеральной широкой мышцы бедра, вентро-ягодичной 10 мышцы тыльной ягодичной мышцы или переднебоковой мышцы бедра для младенцев), субъекта с помощью иглы. Композиция, содержащая зкДНК, может быть введена в другие подтипы мышечных клеток. Неограничивающие примеры подтипов мышечных клеток включают клетки скелетных мышц, клетки сердечной мышцы, клетки гладких мышц и/или клетки диафрагмальной мышцы.

15 [00425] Способы внутримышечной инъекции известны специалистам в данной области техники и поэтому в данном документе подробно не описываются. Однако при выполнении внутримышечной инъекции соответствующий размер иглы следует определять на основании возраста и комплекции пациента, вязкости композиции, а также места инъекции. В Таблице 8 приведены рекомендации по примерным местам 20 инъекции и соответствующему размеру иглы:

Таблица 8: Рекомендации по внутримышечной инъекции пациентам-людям

Место инъекции	Калибр иглы	Размер иглы	Максимальный объем композиции
25 Вентро-ягодичный участок (gluteus medius и gluteus minimus)	Водные растворы: 20-25 калибр Вязкий раствор или раствор на масляной основе: 18-21 калибр	Худой взрослый: 15-25 мм Обычный взрослый: 25 мм Крупный взрослый (более 150 фунтов): 25-38 мм Дети и младенцы: потребуется игла меньшего размера	3 мл
30 Латеральная широкая мышца бедра	Водные растворы: 20-25 калибр Вязкий раствор или раствор на масляной основе: 18-21 калибр Дети/младенцы: 22-25 калибр	Взрослый: 25мм-38 мм	3 мл
Дельтовидная мышца	22-25 калибр	Мужчины: 130-260 фунтов: 25 мм Женщины: <130 фунтов: 16 мм 130-200 фунтов: 25 мм >200 фунтов: 38 мм	1 мл

35 [00426] Согласно определенным вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, изготавливают в небольшом объеме, например, примерном объеме, изложенном в Таблице 8, для конкретного субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации перед инъекцией субъекту может быть 40 введен общий или местный анестетик, при необходимости. Это особенно желательно, если требуется несколько инъекций или если инъекцию вводят в более глубокую мышцу, а не в обычные места инъекций, указанные выше.

[00427] Согласно некоторым вариантам реализации внутримышечную инъекцию можно комбинировать с электропорацией, давлением доставки или использованием 45 реагентов для трансфекции для усиления клеточного поглощения зкДНК-вектора.

(ii) Реагенты для трансфекции

[00428] Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, изготавливают в виде композиций, содержащих один или более реагентов для трансфекции, чтобы облегчить поглощение

векторов в мышечные трубочки или мышечную ткань. Таким образом, в одном варианте реализации, нуклеиновые кислоты, описанные в данном документе, вводят в мышечную клетку, мышечную трубочку или мышечную ткань путем трансфекции с использованием способов, описанных в другом месте в данном документе.

5 (iii) Электропорация

[00429] Согласно определенным вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, вводят без носителя для облегчения проникновения зкДНК в клетки или в физиологически инертном фармацевтически приемлемом носителе (т. е. в любом носителе, который не улучшает или не усиливает
10 поглощение бескапсидных невирусных векторов в мышечные трубочки). Согласно таким вариантам реализации поглощение бескапсидного невирусного вектора может быть облегчено путем электропорации клетки или ткани.

[00430] Клеточные мембраны естественным образом устойчивы к проникновению
15 внеклеточных объектов в цитоплазму клетки. Одним из методов временного уменьшения этой устойчивости является «электропорация», когда электрические поля используют для создания пор в клетках, не вызывая необратимого повреждения клеток. Эти поры достаточно велики, чтобы позволить ДНК-векторам, фармацевтическим препаратам, ДНК и другим полярным соединениям проникать внутрь клетки. Со временем поры в клеточной мембране закрываются, и клетка снова становится непроницаемой.

[00431] Электропорацию можно использовать в приложениях как *in vitro*, так и *in vivo* для введения, например, экзогенной ДНК в живые клетки. Для приложений *in vitro*, как правило, смешивают образец живых клеток с композицией, содержащей, например, ДНК. Затем клетки помещают между электродами, такими как параллельные пластины, и к смеси клетка/композиция прикладывают электрическое поле.

[00432] Существует ряд методов электропорации *in vivo*; электроды могут быть
25 обеспечены в различных конфигурациях, таких как, например, штангенциркуль, который захватывает эпидермис, лежащий над областью клеток, подлежащих обработке. В качестве альтернативы, в ткань могут быть введены игольчатые электроды для доступа к клеткам, расположенным глубже. В любом случае, после инъекционного введения
30 композиции, содержащей, например, нуклеиновые кислоты, в область обработки, электроды прикладывают к области электрическое поле. В некоторых приложениях электропорации электрическое поле представляет собой одиночный прямоугольный импульс порядка 100-500 В/см с длительностью от 10 до 60 мс. Такой импульс может генерироваться, например, в известных приложениях Electro Square Porator T820,
35 производимых ВТХ Division Genetronics, Inc.

[00433] Как правило, успешное поглощение, например, нуклеиновых кислот, происходит только в том случае, если мышцу электрически стимулировать сразу или вскоре после введения композиции, например, путем инъекции в мышцу.

[00434] Согласно определенным вариантам реализации электропорация достигается
40 с использованием импульсов электрических полей или с использованием схем обработки с низким напряжением/длинными импульсами (например, с использованием системы электропорации с прямоугольными импульсами). Примерные генераторы импульсов, способные генерировать импульсное электрическое поле, включают, например, ЕСМ600, который может генерировать экспоненциальную форму волны, и ElectroSquarePorator
45 (T820), который может генерировать прямоугольную форму волны, оба из которых доступны от ВТХ, подразделения Genetronics, Inc. (Сан-Диего, Калифорния). Системы электропорации с прямоугольной волной доставляют контролируемые электрические импульсы, которые быстро повышаются до заданного напряжения, остаются на этом

уровне в течение заданного периода времени (длительность импульса), а затем быстро падают до нуля.

[00435] Согласно некоторым вариантам реализации местный анестетик вводят, например, путем инъекции в место обработки, чтобы уменьшить боль, которая может быть ассоциирована с электропорацией ткани в присутствии композиции, содержащей бескапсидный невирусный вектор, как описано в данном документе. Кроме того, специалист в данной области техники поймет, что следует выбирать дозу композиции, которая сводит к минимуму и/или предотвращает чрезмерное повреждение ткани, приводящее к фиброзу, некрозу или воспалению мышцы.

(iv) Давление доставки

[00436] Согласно некоторым вариантам реализации доставку зкДНК-вектора для экспрессии белка РАН, раскрытого в данном документе, в мышечную ткань облегчают с помощью давления доставки, при котором используется комбинация больших объемов и быстрой инъекции в артерию, снабжающую конечность (например, подвздошную артерию). Этот способ введения может быть достигнут с помощью множества способов, которые включают вливание в сосудистую сеть конечности композиции, содержащей зкДНК-вектор, как правило, при изоляции мышцы от большого круга кровообращения с помощью жгута сосудистого зажима. В одном методе композиция циркулирует через сосудистую сеть конечности, чтобы обеспечить возможность экстравазации в клетки. В другом методе внутрисосудистое гидродинамическое давление увеличивается для расширения сосудистых лож и увеличения поглощения зкДНК-вектора в мышечные клетки или ткань. Согласно одному варианту реализации композицию зкДНК вводят в артерию.

(v) Композиции липидных наночастиц

[00437] Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, для внутримышечной доставки изготавливают в виде композиции, содержащей липосому, как описано в другом месте в данном документе.

(vi) Системное введение зкДНК-вектора, нацеленного на мышечную ткань

[00438] Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, изготавливают для нацеливания на мышцу за счет введения путем непрямого доставки, при котором зкДНК транспортируется в мышцу, а не в печень. Соответственно, технология, описанная в данном документе, включает не прямое введение композиций, содержащих зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, в мышечную ткань, например, путем системного введения. Такие композиции можно вводить местно, внутривенно (с помощью болюсной или непрерывной инфузии), с помощью внутриклеточной инъекции, внутритканевой инъекции, перорально, путем ингаляции, внутрибрюшинно, подкожно, внутрь полости, а также их можно доставлять с помощью перистальтических средств, при необходимости, или с помощью других средств, известных специалистам в данной области техники. При необходимости, агент может быть введен системно, например, путем внутривенной инфузии.

[00439] Согласно некоторым вариантам реализации поглощение зкДНК-вектора для экспрессии белка РАН, раскрытого в данном документе, в мышечные клетки/ткань увеличивается за счет использования нацеливающего агента или фрагмента, который преимущественно направляет вектор в мышечную ткань. Таким образом, в некоторых вариантах реализации бескапсидный зкДНК-вектор может быть сконцентрирован в мышечной ткани по сравнению с количеством бескапсидных зкДНК-векторов,

присутствующих в других клетках или тканях организма.

[00440] Согласно некоторым вариантам реализации композиция, содержащая зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, дополнительно содержит фрагмент, нацеливающий на мышечные клетки. Согласно другим вариантам реализации экспрессированный генный продукт содержит нацеливающий фрагмент, специфический для ткани, в котором его действие является желательным. Нацеливающий фрагмент может включать любую молекулу или комплекс молекул, которые способны нацеливаться, взаимодействовать, соединяться и/или связываться с внутриклеточным, поверхностным или внеклеточным биомаркером клетки или ткани. Биомаркер может включать, например, клеточную протеазу, киназу, белок, рецептор клеточной поверхности, липид и/или алифатическую кислоту. Другие примеры биомаркеров, на которые могут быть нацелены, с которыми могут взаимодействовать, соединяться и/или связываться нацеливающие фрагменты, включают молекулы, ассоциированные с конкретным заболеванием. Например, биомаркеры могут включать рецепторы клеточной поверхности, участвующие в развитии рака, такие как рецептор эпидермального фактора роста и рецептор трансферрина. Нацеливающие фрагменты могут включать, но не ограничиваются перечисленными, синтетические соединения, природные соединения или продукты, макромолекулярные объекты, биосконструированные молекулы (например, полипептиды, липиды, полинуклеотиды, антитела, фрагменты антител) и малые объекты (например, малые молекулы, нейротрансмиттеры, субстраты, лиганды, гормоны и соединения элементов), которые связываются с молекулами, экспрессируемыми в целевой мышечной ткани.

[00441] Согласно определенным вариантам реализации нацеливающий фрагмент может дополнительно содержать рецепторную молекулу, включая, например, рецепторы, которые естественным образом распознают конкретную целевую молекулу клетки-мишени. Такие рецепторные молекулы включают рецепторы, которые были модифицированы для повышения их специфичности взаимодействия с молекулой-мишенью, рецепторы, которые были модифицированы для взаимодействия с целевой молекулой-мишенью, не распознаваемой рецептором в естественных условиях, и фрагменты таких рецепторов (см., например, Skerra, 2000, *J. Molecular Recognition*, 13: 167-187). Предпочтительный рецептор представляет собой рецептор хемокина. Примерные рецепторы хемокинов описаны, например, в Lapidot et al, 2002, *Exp Hematol*, 30:973-81 и Onuffer et al, 2002, *Trends Pharmacol Sci*, 23:459-67.

[00442] Согласно другим вариантам реализации дополнительный нацеливающий фрагмент может содержать молекулу лиганда, включая, например, лиганды, которые естественным образом распознают конкретный целевой рецептор клетки-мишени, такой как лиганд трансферрина (Tf). Такие молекулы лигандов включают лиганды, которые были модифицированы для повышения их специфичности взаимодействия с рецептором-мишенью, лиганды, которые были модифицированы для взаимодействия с целевым рецептором, который не распознается лигандом в естественных условиях, и фрагменты таких лигандов.

[00443] Согласно другим вариантам реализации нацеливающий фрагмент может содержать аптамер. Аптамеры представляют собой олигонуклеотиды, выбранные для специфичного связывания с целевой молекулярной структурой клетки-мишени. Аптамеры, как правило, представляют собой продукты способа селекции по аффинности, сходного с селекцией по аффинности при фаговом дисплее (также известной как молекулярная эволюция *in vitro*). Способ включает выполнение нескольких тандемных итераций разделения по аффинности, например, с использованием твердой подложки,

с которой связан патологический иммуноген, с последующей полимеразной цепной реакцией (ПЦР) для амплификации нуклеиновых кислот, которые связались с иммуногенами. Таким образом, каждый раунд аффинного разделения обогащает популяцию нуклеиновых кислот молекулами, которые успешно связывают целевой иммуноген. Таким путем случайный пул нуклеиновых кислот может быть «обучен» с получением аптамеров, которые специфично связывают молекулы-мишени. Аптамеры, как правило, представляют собой РНК, но могут представлять собой ДНК или ее аналоги или производные, такие как, без ограничения, пептидные нуклеиновые кислоты (ПНК) и фосфотиоатные нуклеиновые кислоты.

[00444] Согласно некоторым вариантам реализации нацеливающий фрагмент может содержать фоторазлагаемый лиганд (т. е. «запертый» лиганд), который высвобождается, например, под действием сфокусированного луча света так, что бескапсидные невирусные векторы или генный продукт нацеливаются на конкретную ткань.

[00445] В данном документе также предусмотрено, что композиции доставляют в несколько мест в одной или более мышцах субъекта. Таким образом, инъекции могут быть сделаны в по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45, по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 100 местах инъекций. Такие места могут быть распределены по площади одной мышцы или могут быть распределены между несколькими мышцами.

В. Введение зкДНК-вектора для экспрессии белка РАН в немышечные места

[00446] Согласно другому варианту реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН вводят в печень. ЗкДНК-вектор также можно вводить в различные области глаза, такие как роговица и/или зрительный нерв. ЗкДНК-вектор также можно вводить в спинной мозг, ствол мозга (продолговатый мозг, мост), средний мозг (гипоталамус, таламус, эпифиз, гипофиз, черную субстанцию, эпифиз), мозжечок, конечный мозг (полосатое тело, полушария головного мозга, включая затылочную, височную, теменную и лобную доли, кору, базальные ганглии, гиппокамп и амигдалу), лимбическую систему, неокортекс, полосатое тело, полушария головного мозга и нижний холмик четверохолмия. ЗкДНК-вектор может быть доставлен в спинномозговую жидкость (например, с помощью люмбальной пункции). ЗкДНК-вектор для экспрессии белка РАН можно дополнительно вводить внутрисосудисто в ЦНС в ситуациях, когда нарушен гематоэнцефалический барьер (например, опухоль головного мозга или церебральный инфаркт).

[00447] Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН можно вводить в целевую область (области) глаза любым путем, известным в данной области техники, включая, но не ограничиваясь перечисленными, интратекальную, внутриглазную, интрацеребральную, внутрижелудочковую, внутривенную (например, в присутствии сахара, такого как маннит), интраназальную, внутриушную, внутриглазную (например, интравитреальную, субретинальную, в переднюю камеру) и периокулярную (например, в субтенонову область) доставку, а также внутримышечную доставку с ретроградной доставкой к двигательным нейронам.

[00448] Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН вводят в жидком составе путем прямой инъекции (например,

стереотаксической инъекции) в целевую область или компартмент в ЦНС. Согласно другим вариантам реализации зкДНК-вектор может быть обеспечен путем местного нанесения на целевую область или путем интраназального введения аэрозольного состава. Введение в глаз можно осуществлять путем местного нанесения жидких капель.

5 В качестве дополнительной альтернативы зкДНК-вектор можно вводить в виде твердого состава с медленным высвобождением (см., например, патент США № 7201898). Согласно другим дополнительным вариантам реализации зкДНК-вектор можно применять для ретроградного транспорта для лечения, облегчения и/или предотвращения заболеваний и нарушений, затрагивающих двигательные нейроны
10 (например, бокового амиотрофического склероза (БАС); спинальной мышечной атрофии (СМА) и т. д.). Например, зкДНК-вектор может быть доставлен в мышечную ткань, из которой он может мигрировать в нейроны.

С. Лечение *ex vivo*

[00449] Согласно некоторым вариантам реализации клетки извлекают из организма субъекта, вводят в них зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, и затем клетки возвращают в организм субъекта. Способы извлечения
15 клеток из организма субъекта для лечения *ex vivo* с последующим введением обратно в организм субъекта известны в данной области техники (см., например, патент США № 5399346; содержание которого полностью включено в данный документ). В качестве
20 альтернативы, зкДНК-вектор вводят в клетки, полученные от другого субъекта, в культивируемые клетки или в клетки из любого другого подходящего источника, и указанные клетки вводят нуждающемуся в этом субъекту.

[00450] Клетки, трансдуцированные зкДНК-вектором для экспрессии белка РАН, раскрытым в данном документе, предпочтительно вводят субъекту в «терапевтически
25 эффективном количестве» в комбинации с фармацевтическим носителем. Специалисты в данной области техники поймут, что терапевтические эффекты не обязательно должны быть полными или обеспечивать исцеление, при условии, что для субъекта они в какой-то мере благоприятны.

[00451] Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии
30 белка РАН, раскрытый в данном документе, может кодировать белок РАН, описанный в данном документе (иногда называемый трансгеном или гетерологичной нуклеотидной последовательностью), который должен продуцироваться в клетке *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. Например, в отличие от применения зкДНК-векторов, описанных в данном документе, в способе лечения, который обсуждается в данном документе, в некоторых
35 вариантах реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН может быть введен в культивируемые клетки, и экспрессированный белок РАН может быть выделен из клеток, например, для получения антител и слитых белков. Согласно некоторым вариантам реализации культивируемые клетки, содержащие зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, можно применять для
40 коммерческого получения антител или слитых белков, например, в качестве источника клеток для мелкомасштабного или крупномасштабного биоизготовления антител или слитых белков. В альтернативных вариантах реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, вводят в клетки у субъекта-хозяина, не являющегося человеком, для продуцирования антител или слитых белков *in vivo*,
45 включая мелкомасштабное получение, а также коммерческое крупномасштабное получение белка РАН.

[00452] ЗкДНК-векторы для экспрессии белка РАН, раскрытые в данном документе, можно применять как в ветеринарных, так и в медицинских приложениях. Подходящие

субъекты для способов доставки генов *ex vivo*, описанных выше, включают как птиц (например, кур, уток, гусей, перепелов, индеек и фазанов), так и млекопитающих (например, человека, бычьих, овечьих, козьих, лошадиных, кошачьих, собачьих и зайцеобразных), при этом предпочтительными являются млекопитающие. Субъекты-люди являются наиболее предпочтительными. Субъекты-люди включают новорожденных, младенцев, детей и подростков, и взрослых людей.

D. Диапазоны доз

[00453] В данном документе предложены способы лечения, включающие введение субъекту эффективного количества композиции, содержащей зкДНК-вектор, кодирующий белок РАН, как описано в данном документе. Как будет понятно квалифицированному практикующему врачу, термин «эффективное количество» относится к количеству введенной композиции зкДНК, которое приводит к экспрессии белка РАН в «терапевтически эффективном количестве» для лечения ФКУ.

[00454] Анализы *in vivo* и/или *in vitro* необязательно можно использовать, чтобы облегчить определение оптимальных диапазонов дозировок для применения. Точная доза, которая должна быть использована в составе, также будет зависеть от пути введения и серьезности состояния и должна определяться в соответствии с суждением обычного специалиста в данной области техники и обстоятельствами каждого субъекта. Эффективные дозы можно экстраполировать из кривых доза-ответ, полученных из тест-систем *in vitro* или в моделях на животных, например.

[00455] ЗкДНК-векторы для экспрессии белка РАН, раскрытые в данном документе, вводят в количествах, достаточных для трансфекции клеток целевой ткани и обеспечения достаточных уровней переноса и экспрессии генов без неоправданных нежелательных эффектов. Обычные и фармацевтически приемлемые пути введения включают, но не ограничиваются ими, те, которые описаны выше в разделе «Введение», такие как прямая доставка в выбранный орган (например, внутрипортальная доставка в печень), пероральный, ингаляционный (включая интраназальную и внутритрахеальную доставку), внутриглазной, внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутрикожный, внутриопухолевый и другие исходные пути введения. Пути введения могут быть скомбинированы, если требуется.

[00456] Доза количества зкДНК-векторов для экспрессии белка РАН, раскрытых в данном документе, необходимая для достижения определенного «терапевтического эффекта», будет варьироваться в зависимости от нескольких факторов, включая, но не ограничиваясь перечисленными: путь введения нуклеиновой кислоты, уровень экспрессии гена или РНК, необходимый для достижения терапевтического эффекта, конкретное заболевание или нарушение, подлежащее лечению, и стабильность гена (ов), продукта (ов) РНК или полученного экспрессированного белка (ов). Специалист в данной области техники может легко определить диапазон доз зкДНК-вектора для лечения пациента, страдающего конкретным заболеванием или нарушением, на основании вышеупомянутых факторов, а также других факторов, которые хорошо известны в данной области техники.

[00457] Схему дозирования можно корректировать для обеспечения оптимального терапевтического ответа. Например, олигонуклеотид может быть введен повторно, например, несколько доз могут быть введены ежедневно или дозу можно пропорционально уменьшать в соответствии с требованиями терапевтической ситуации. Обычный специалист в данной области техники легко сможет определить подходящие дозы и схемы введения рассматриваемых олигонуклеотидов, независимо от того, должны быть введены олигонуклеотиды в клетки или субъектам.

[00458] «Терапевтически эффективная доза» будет находиться в относительно широком диапазоне, который может быть определен посредством клинических исследований, и будет зависеть от конкретного применения (нервным клеткам потребуются очень небольшие количества, в то время как системная инъекция потребует больших количеств). Например, для прямой инъекции *in vivo* в скелетную или сердечную мышцу субъекта-человека терапевтически эффективная доза будет порядка от примерно 1 мкг до 100 г зкДНК-вектора. Если для доставки зкДНК-вектора используются экзосомы или микрочастицы, то терапевтически эффективная доза может быть определена экспериментально, но ожидается, что она доставит от 1 мкг до примерно 100 г вектора. Более того, терапевтически эффективная доза представляет собой количество зкДНК-вектора, которое экспрессирует достаточное количество транскгена, чтобы оказывать влияние на субъекта, которое приводит к уменьшению одного или более симптомов заболевания, но не приводит к значительным нецелевым эффектам или значительным нежелательным побочным эффектам. Согласно одному варианту реализации «терапевтически эффективное количество» представляет собой количество экспрессированного белка РАН, которое достаточно для получения статистически значимого, измеримого изменения экспрессии биомаркера ФКУ или уменьшения симптома конкретного заболевания. Такие эффективные количества можно откалибровать в клинических исследованиях, а также в исследованиях на животных для конкретной композиции зкДНК-вектора.

[00459] Изготовление фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ и растворов носителей хорошо известно специалистам в данной области техники, как и разработка подходящих схем дозирования и лечения для использования конкретных композиций, описанных в данном документе, в различных схемах лечения.

[00460] Для трансфекции *in vitro* эффективное количество зкДНК-векторов для экспрессии белка РАН, раскрытых в данном документе, для доставки в клетки (1×10^6 клеток) будет порядка от 0,1 до 100 мкг зкДНК-вектора, предпочтительно от 1 до 20 мкг и более предпочтительно от 1 до 15 мкг или от 8 до 10 мкг. Для более крупных зкДНК-векторов потребуются более высокие дозы. При использовании экзосом или микрочастиц, эффективная доза *in vitro* может быть определена экспериментально, но она будет предназначена для доставки в целом того же количества зкДНК-вектора.

[00461] Для лечения ФКУ подходящая дозировка зкДНК-вектора, который экспрессирует белок РАН, раскрытого в данном документе, будет зависеть от конкретного типа заболевания, подлежащего лечению, типа белка РАН, степени тяжести и течения заболевания ФКУ, предыдущей терапии, истории болезни пациента и реакции на антитело, а также от решения лечащего врача. ЗкДНК-вектор, кодирующий белок РАН, подходящим образом вводят пациенту за один раз или в течение ряда обработок. В данном документе предусмотрены различные схемы дозирования, включая, но не ограничиваясь перечисленными, однократное или многократное введение в различные моменты времени, болюсное введение и импульсную инфузию.

[00462] В зависимости от типа и степени тяжести заболевания зкДНК-вектор вводят в количестве, при котором кодируемый белок РАН экспрессируется в диапазоне от примерно 0,3 мг/кг до 100 мг/кг (например, от 15 мг/кг до 100 мг/кг или любой дозировке в пределах этого диапазона), с помощью одного или более отдельных введений или непрерывной инфузии. Одной типичной суточной дозы зкДНК-вектора достаточно, чтобы привести к экспрессии кодируемого белка РАН в диапазоне от примерно 15 мг/кг до 100 мг/кг или более, в зависимости от факторов, упомянутых выше. Одна примерная доза зкДНК-вектора представляет собой количество, достаточное для того

чтобы привести к экспрессии кодируемого белка РАН, как раскрыто в данном документе, в диапазоне от примерно 10 мг/кг до примерно 50 мг/кг. Таким образом, пациенту может быть введена одна или более доз зкДНК-вектора в количестве, достаточном для того чтобы привести к экспрессии кодируемого белка РАН при примерно 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 1,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 3 мг/кг, 4,0 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг, 15 мг/кг, 20 мг/кг, 25 мг/кг, 30 мг/кг, 35 мг/кг, 40 мг/кг, 50 мг/кг, 60 мг/кг, 70 мг/кг, 80 мг/кг, 90 мг/кг или 100 мг/кг (или любой их комбинации). Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор представляет собой количество, достаточное для того чтобы привести к экспрессии кодируемого белка РАН для общей дозы в диапазоне от 50 мг до 2500 мг.

Примерная доза зкДНК-вектора представляет собой количество, достаточное для того чтобы привести к общей экспрессии кодируемого белка РАН примерно 50 мг, примерно 100 мг, 200 мг, 300 мг, 400 мг, примерно 500 мг, примерно 600 мг, примерно 700 мг, примерно 720 мг, примерно 1000 мг, примерно 1050 мг, примерно 1100 мг, примерно 1200 мг, примерно 1300 мг, примерно 1400 мг, примерно 1500 мг, примерно 1600 мг, примерно 1700 мг, примерно 1800 мг, примерно 1900 мг, примерно 2000 мг, примерно 2050 мг, примерно 2100 мг, примерно 2200 мг, примерно 2300 мг, примерно 2400 мг или примерно 2500 мг (или любой их комбинации). Поскольку экспрессию белка РАН с зкДНК-вектора можно тщательно контролировать с помощью регуляторных переключателей в данном документе или, альтернативно, многократной дозы зкДНК-вектора, вводимой субъекту, экспрессию белка РАН с зкДНК-вектора можно контролировать так, что дозы экспрессированного белка РАН можно вводить с перерывами, например, каждую неделю, каждые две недели, каждые три недели, каждые четыре недели, каждый месяц, каждые два месяца, каждые три месяца или каждые шесть месяцев с зкДНК-вектора. Ход этой терапии можно контролировать с помощью обычных методик и анализов.

[00463] Согласно определенным вариантам реализации зкДНК-вектор вводят в количестве, достаточном для того чтобы привести к экспрессии кодируемого белка РАН в дозе 15 мг/кг, 30 мг/кг, 40 мг/кг, 45 мг/кг, 50 мг/кг, 60 мг/кг или в фиксированной дозе, например, 300 мг, 500 мг, 700 мг, 800 мг или выше. Согласно некоторым вариантам реализации экспрессию белка РАН с зкДНК-вектора контролируют так, что белок РАН экспрессируется каждый день, через день, каждую неделю, каждые 2 недели или каждые 4 недели в течение некоторого периода времени. Согласно некоторым вариантам реализации экспрессию белка РАН с зкДНК-вектора контролируют так, что белок РАН экспрессируется каждые 2 недели или каждые 4 недели в течение некоторого периода времени. Согласно определенным вариантам реализации период времени составляет 6 месяцев, один год, восемнадцать месяцев, два года, пять лет, десять лет, 15 лет, 20 лет или продолжительность жизни пациента.

[00464] Лечение может включать введение однократной дозы или многократных доз. Согласно некоторым вариантам реализации субъекту можно вводить более одной дозы; фактически, при необходимости можно вводить многократные дозы, поскольку зкДНК-вектор не вызывает иммунного ответа хозяина против капсида ввиду отсутствия вирусного капсида. Таким образом, специалист в данной области техники может легко определить подходящее количество доз. Количество вводимых доз может составлять, например, порядка 1-100, предпочтительно 2-20 доз.

[00465] Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, отсутствие типичного противовирусного иммунного ответа, вызванного введением зкДНК-вектора, как описано в настоящем раскрытии (т. е. отсутствие компонентов капсида), позволяет вводить хозяину зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН несколько раз. Согласно

некоторым вариантам реализации количество раз доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты субъекту находится в диапазоне от 2 до 10 раз (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз). Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор доставляют субъекту более 10 раз.

5 [00466] Согласно некоторым вариантам реализации дозу зкДНК-вектора для экспрессии белка РАН, раскрытого в данном документе, вводят субъекту не чаще одного раза в календарный день (например, в течение 24-часового периода). Согласно некоторым вариантам реализации дозу зкДНК-вектора вводят субъекту не чаще одного
10 раза в 2, 3, 4, 5, 6 или 7 календарных дней. Согласно некоторым вариантам реализации дозу зкДНК-вектора для экспрессии белка РАН, раскрытого в данном документе, вводят субъекту не чаще одного раза в календарную неделю (например, 7 календарных дней). Согласно некоторым вариантам реализации дозу зкДНК-вектора вводят субъекту не чаще, чем один раз в две недели (например, один раз в период в две календарные недели). Согласно некоторым вариантам реализации дозу зкДНК-вектора вводят
15 субъекту не чаще одного раза в календарный месяц (например, один раз в 30 календарных дней). Согласно некоторым вариантам реализации дозу зкДНК-вектора вводят субъекту не чаще одного раза в шесть календарных месяцев. Согласно некоторым вариантам реализации дозу зкДНК-вектора вводят субъекту не чаще одного раза в календарный год (например, 365 дней или 366 дней в високосный год).

20 [00467] В конкретных вариантах реализации для достижения целевого уровня экспрессии гена на протяжении различных периодов времени, например, ежедневно, еженедельно, ежемесячно, ежегодно и т. д., можно использовать более одного введения (например, два, три, четыре или более введений) зкДНК-вектора для экспрессии белка РАН, раскрытого в данном документе.

25 [00468] Согласно некоторым вариантам реализации терапевтический белок РАН, кодируемый зкДНК-вектором, раскрытым в данном документе, можно регулировать с помощью регуляторного переключателя, индуцируемого или репрессируемого промотора так, что он экспрессируется у субъекта в течение по меньшей мере 1 часа,
30 по меньшей мере 2 часов, по меньшей мере 5 часов, по меньшей мере 10 часов, по меньшей мере 12 часов, по меньшей мере 18 часов, по меньшей мере 24 часов, по меньшей мере 36 часов, по меньшей мере 48 часов, по меньшей мере 72 часов, по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев/одного года, по меньшей мере 2 лет, по меньшей мере 5 лет, по меньшей мере 10 лет, по меньшей
35 мере 15 лет, по меньшей мере 20 лет, по меньшей мере 30 лет, по меньшей мере 40 лет, по меньшей мере 50 лет или более. Согласно одному варианту реализации экспрессия может быть достигнута путем повторного введения зкДНК-векторов, описанных в данном документе, через заранее определенные или желательные интервалы. В качестве альтернативы, зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном
40 документе, может дополнительно содержать компоненты системы редактирования генов (например, CRISPR/Cas, TALEN, эндонуклеазы цинковых пальцев и т. д.), что позволяет вставлять одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих белок РАН, для по существу постоянного лечения или «излечения» заболевания. Такие зкДНК-векторы, содержащие компоненты редактирования генов,
45 раскрыты в международной заявке PCT/US18/64242 и могут включать 5' и 3' плечи гомологии (например, SEQ ID NO: 151-154, или последовательности, имеющие по меньшей мере 40%, 50%, 60%, 70% или 80% гомологии с ними) для вставки нуклеиновой кислоты, кодирующей белок РАН, в области «безопасной гавани», такие как, но не

включая их, ген альбумина или ген CCR5. В качестве примера, зкДНК-вектор, экспрессирующий белок РАН, может содержать по меньшей мере одно плечо гомологии, специфичное в отношении геномной «безопасной гавани» (GSH), для встраивания трансгена РАН в геномную «безопасную гавань», как раскрыто в международной заявке на патент PCT/US2019/020225, поданной 1 марта 2019 г., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[00469] Продолжительность лечения зависит от клинического прогресса и ответа пациента на терапию. Предусмотрено непрерывное введение относительно низких поддерживающих доз после начальной более высокой терапевтической дозы.

10 E. Единичные лекарственные формы

[00470] Согласно некоторым вариантам реализации фармацевтические композиции, содержащие зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, могут быть удобно представлены в виде единичной лекарственной формы. Единичная лекарственная форма, как правило, адаптирована для одного или более конкретных путей введения фармацевтической композиции. Согласно некоторым вариантам реализации единичная лекарственная форма адаптирована для капель, которые будут введены непосредственно в глаз. Согласно некоторым вариантам реализации единичная лекарственная форма адаптирована для введения путем ингаляции. Согласно некоторым вариантам реализации единичная лекарственная форма адаптирована для введения с помощью испарителя. Согласно некоторым вариантам реализации единичная лекарственная форма адаптирована для введения с помощью небулайзера. Согласно некоторым вариантам реализации единичная лекарственная форма адаптирована для введения с помощью генератора аэрозоля. Согласно некоторым вариантам реализации единичная лекарственная форма адаптирована для перорального введения, для буккального введения или для сублингвального введения. Согласно некоторым вариантам реализации единичная лекарственная форма адаптирована для внутривенного, внутримышечного или подкожного введения. Согласно некоторым вариантам реализации единичная лекарственная форма адаптирована для субретинальной инъекции, супрахориоидальной инъекции или интравитреальной инъекции.

[00471] Согласно некоторым вариантам реализации единичная лекарственная форма адаптирована для интратекального или интрацеребровентрикулярного введения. Согласно некоторым вариантам реализации фармацевтическая композиция изготовлена для местного введения. Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалом носителя для получения единичной лекарственной формы, обычно будет представлять собой количество соединения, которое вызывает терапевтический эффект.

X. Способы лечения

[00472] Технология, описанная в данном документе, также демонстрирует способы получения, а также способы применения раскрытых зкДНК-векторов для экспрессии белка РАН различными путями, включая, например, *ex vivo*, *ex situ*, *in vitro* и *in vivo* приложения, методологии, диагностические процедуры и/или схемы генной терапии.

[00473] Согласно одному варианту реализации экспрессированный терапевтический белок РАН, экспрессируемый с зкДНК-вектора, раскрытого в данном документе, является функциональным для лечения заболевания. Согласно предпочтительному варианту реализации терапевтический белок РАН не вызывает реакции иммунной системы, если этого не требуется.

[00474] В данном документе предложен способ лечения ФКУ у субъекта, включающий

введение в клетку-мишень, которая нуждается в этом (например, мышечную клетку или ткань, или другой тип пораженных клеток), указанного субъекта терапевтически эффективного количества зкДНК-вектора для экспрессии белка РАН, раскрытого в данном документе, необязательно с фармацевтически приемлемым носителем. Несмотря на то, что указанный зкДНК-вектор может быть введен в присутствии носителя, такой носитель не является необходимым. Реализованный зкДНК-вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок РАН, как описано в данном документе, которую можно применять для лечения заболевания. В частности, зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН может содержать целевую последовательность ДНК белка РАН, функционально связанную с контрольными элементами, способными управлять транскрипцией целевого белка РАН, кодируемого экзогенной последовательностью ДНК, при введении в организм субъекта. ЗкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, может быть введен любым подходящим путем, предложенным выше и в других разделах данного документа.

[00475] В данном документе раскрыты композиции и составы зкДНК-векторов для экспрессии белка РАН, как раскрыто в данном документе, которые включают один или более зкДНК-векторов согласно настоящему изобретению вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми буферами, разбавителями или вспомогательными веществами. Такие композиции могут быть включены в один или более диагностических или терапевтических наборов для диагностики, предотвращения, лечения или облегчения одного или более симптомов ФКУ. В одном аспекте заболевание, поражение, нарушение, травма или дисфункция представляет собой заболевание, поражение, нарушение, травму или дисфункцию человека.

[00476] Другой аспект технологии, описанной в данном документе, обеспечивает способ обеспечения субъекту, нуждающемуся в этом, диагностически или терапевтически эффективного количества зкДНК-вектора для экспрессии белка РАН, раскрытого в данном документе, причем указанный способ включает обеспечение в клетке, ткани или органе субъекта, нуждающегося в этом, количества зкДНК-вектора, раскрытого в данном документе; и в течение времени, эффективного для обеспечения экспрессии белка РАН с зкДНК-вектора, что обеспечивает субъекту диагностически или терапевтически эффективное количество белка РАН, экспрессируемого зкДНК-вектором. Согласно дополнительному аспекту субъект представляет собой человека.

[00477] Другой аспект технологии, описанной в данном документе, обеспечивает способ диагностики, предотвращения, лечения или облегчения по меньшей мере одного или более симптомов ФКУ, нарушения, дисфункции, поражения, аномального состояния или травмы у субъекта. В целом и в общем смысле, способ включает по меньшей мере этап введения субъекту, нуждающемуся в этом, одного или более из раскрытых зкДНК-векторов для продукции белка РАН в количестве и в течение времени, достаточных для диагностики, предотвращения, лечения или облегчения одного или более симптомов заболевания, нарушения, дисфункции, поражения, аномального состояния или травмы у субъекта. В таком варианте реализации у субъекта может быть оценена эффективность белка РАН или, альтернативно, проведено детектирование белка РАН или тканевого расположения белка РАН (включая клеточное и субклеточное расположение) у субъекта. Таким образом, зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, можно применять в качестве диагностического инструмента *in vivo*, например, для детектирования рака или других показаний. Согласно дополнительному аспекту субъект представляет собой человека.

[00478] Другим аспектом является применение зкДНК-вектора для экспрессии белка

РАН, раскрытого в данном документе, в качестве инструмента для лечения или уменьшения одного или более симптомов ФКУ или патологических состояний. Существует ряд наследственных заболеваний, при которых известны дефектные гены, и, как правило, они делятся на два класса: дефицитные состояния, обычно ферментов, которые обычно наследуются рецессивным образом, и несбалансированные состояния, которые могут включать регуляторные или структурные белки и которые, как правило, но не всегда, наследуются доминантным образом. Для несбалансированных патологических состояний зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, можно применять для создания состояния ФКУ в модельной системе, которую затем можно использовать в мероприятиях по противодействию патологическому состоянию. Таким образом, зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, позволяет лечить генетические заболевания. В данном документе состояние ФКУ лечат путем частичного или полного излечения дефицита или дисбаланса, который вызывает заболевание или делает его более тяжелым.

А. Клетки-хозяева

[00479] Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, доставляет трансген белка РАН в рассматриваемую клетку-хозяина. Согласно некоторым вариантам реализации клетки представляют собой фоторецепторные клетки. Согласно некоторым вариантам реализации клетки представляют собой клетки RPE. Согласно некоторым вариантам реализации рассматриваемая клетка-хозяин представляет собой клетку-хозяина человека, включая, например, клетки крови, стволовые клетки, гемопоэтические клетки, CD34⁺ клетки, клетки печени, раковые клетки, сосудистые клетки, мышечные клетки, клетки поджелудочной железы, нервные клетки, клетки глаза или клетки сетчатки, эпителиальные или эндотелиальные клетки, дендритные клетки, фибробласты или любые другие клетки, происходящие от млекопитающего, включая, без ограничения, клетки печени (т. е. печеночные), клетки легких, сердечные клетки, клетки поджелудочной железы, клетки кишечника, диафрагмальные клетки, почечные клетки (т. е. почки), нервные клетки, клетки крови, клетки костного мозга или любой одной или более выбранных тканей субъекта, для которых предусмотрена генная терапия. В одном аспекте рассматриваемая клетка-хозяин представляет собой клетку-хозяина человека.

[00480] Настоящее раскрытие также относится к рекомбинантным клеткам-хозяевам, как упомянуто выше, включая зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе. Таким образом, можно использовать несколько клеток-хозяев в зависимости от цели, что очевидно для квалифицированного специалиста. Конструкцию или зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытые в данном документе, включая донорную последовательность, вводят в клетку-хозяина так, что донорная последовательность поддерживается в интегрированном в хромосому виде, как описано ранее. Термин «клетка-хозяин» включает любое потомство родительской клетки, которое не идентично родительской клетке из-за мутаций, происходящих во время репликации. Выбор клетки-хозяина будет в значительной степени зависеть от донорной последовательности и ее источника.

[00481] Клетка-хозяин также может представлять собой эукариота, например, клетку млекопитающего, насекомого, растения или гриба. Согласно одному варианту реализации клетка-хозяин представляет собой клетку человека (например, первичную клетку, стволовую клетку или иммортализованную линию клеток). Согласно некоторым вариантам реализации в клетку-хозяина можно вводить зкДНК-вектор для экспрессии

белка РАН, раскрытый в данном документе, ex vivo, а затем доставлять субъекту после события генной терапии. Клетка-хозяин может представлять собой любой тип клеток, например, соматическую клетку или стволовую клетку, индуцированную

5 плюрипотентную стволовую клетку или клетку крови, например, Т-клетку или В-клетку, или клетку костного мозга. Согласно определенным вариантам реализации клетка-хозяин представляет собой аллогенную клетку. Например, конструирование Т-клеточного генома можно применять для разных видов иммунотерапии рака, модуляции заболевания, такой как терапия ВИЧ (например, нокаут рецептора, такого как CXCR4 и CCR5), и разных видов терапии иммунодефицита. Мишенями для иммунотерапии

10 могут быть рецепторы ГКГС на В-клетках. Согласно некоторым вариантам реализации клетки-хозяева с модифицированным геномом, например, стволовые клетки костного мозга, например, CD34⁺ клетки, или индуцированные плюрипотентные стволовые клетки могут быть трансплантированы обратно пациенту для экспрессии терапевтического белка.

15 В. Дополнительные заболевания для генной терапии

[00482] В целом зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, можно применять для доставки любого белка РАН в соответствии с

приведенным выше описанием для лечения, предотвращения или облегчения симптомов, ассоциированных с ФКУ, связанной с нарушенной экспрессией белка или экспрессией

20 гена у субъекта.

[00483] Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, можно применять для доставки белка РАН в скелетную, сердечную или диафрагмальную мышцу, для продукции белка РАН для

секреции и циркуляции в крови или для системной доставки в другие ткани для лечения, облегчения и/или предотвращения ФКУ.

25

[00484] ЗкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, можно вводить в легкие субъекта с помощью любых подходящих средств, необязательно путем введения аэрозольной суспензии пригодных для вдыхания частиц, содержащих

зкДНК-векторы, которые субъект вдыхает. Пригодные для вдыхания частицы могут

30 быть жидкими или твердыми. Аэрозоли жидких частиц, содержащих зкДНК-векторы, могут быть получены с помощью любых подходящих средств, таких как аэрозольный небулайзер под давлением или ультразвуковой небулайзер, как известно специалистам в данной области техники. См., например, патент США № 4501729. Аэрозоли твердых частиц, содержащих зкДНК-векторы, могут быть получены сходным образом с

35 помощью любого генератора аэрозолей лекарственного средства в виде твердых частиц с помощью методик, известных в фармацевтике.

[00485] Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, можно вводить в ткани ЦНС (например,

головной мозг, глаз).

40

[00486] Глазные нарушения, которые можно лечить, облегчать или предотвращать с помощью зкДНК-вектора для экспрессии белка РАН, раскрытого в данном документе, включают офтальмологические расстройства, затрагивающие сетчатку, задний тракт и зрительный нерв (например, пигментный ретинит, диабетическую ретинопатию и

другие дегенеративные заболевания сетчатки, увеит, возрастную дегенерацию макулы,

45 глаукому). Многие офтальмологические заболевания и нарушения ассоциированы с одним или более из трех типов показаний: (1) ангиогенезом, (2) воспалением и (3) дегенерацией. Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор, раскрытый в данном документе, можно применять для доставки антиангиогенных факторов;

противовоспалительных факторов; факторов, которые замедляют дегенерацию клеток, способствуют сохранению клеток или способствуют росту клеток, и комбинаций перечисленных выше. Диабетическая ретинопатия, например, характеризуется ангиогенезом. Диабетическую ретинопатию можно лечить путем доставки одного или

5 более ангиогенных антител или слитых белков интраокулярно (например, в стекловидное тело) или периокулярно (например, в субтеноновую область).

Дополнительные глазные заболевания, которые можно лечить, облегчать или предотвращать с помощью зкДНК-векторов согласно настоящему изобретению, включают географическую атрофию, сосудистую или «влажную» дегенерацию макулы, ФКУ, врожденный амавроз Лебера (LCA), синдром Ушера, эластическую псевдоксантому (PXE), х-связанный пигментный ретинит (XLRP), х-связанное расслоение сетчатки (XLRs), хороидеремию, наследственную оптическую нейропатию Лебера (LHON), архоматопсию, палочко-колбочковую дистрофию, эндотелиальную дистрофию роговицы Фукса, диабетический макулярный отек и глазной рак или опухоли.

15 [00487] Согласно некоторым вариантам реализации воспалительные глазные заболевания или нарушения (например, увеит) можно лечить, облегчать или предупреждать с помощью зкДНК-вектора для экспрессии белка РАН, раскрытого в данном документе. Одно или более противовоспалительных антител или слитых белков могут быть экспрессированы путем внутриглазного (например, стекловидное тело или

20 передняя камера) введения зкДНК-вектора, раскрытого в данном документе.

[00488] Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, может кодировать белок РАН, который ассоциирован с трансгеном, кодирующим репортерный полипептид (например, фермент, такой как зеленый флуоресцентный белок или щелочная фосфатаза). Согласно некоторым вариантам реализации трансген, который кодирует репортерный белок, подходящий для экспериментальных или диагностических целей, выбирают из любого из: β -лактамазы, β -галактозидазы (LacZ), щелочной фосфатазы, тимидинкиназы, зеленого флуоресцентного белка (GFP), хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT), люциферазы и других, хорошо известных в данной области техники. В некоторых аспектах зкДНК-векторы, экспрессирующие белок РАН, связанный с репортерным полипептидом, можно

25 применять для диагностических целей, а также для определения эффективности или в качестве маркеров активности зкДНК-вектора у субъекта, которому их вводят.

С. Тестирование успешной экспрессии гена с использованием зкДНК-вектора

[00489] Для тестирования эффективности доставки гена белка РАН с помощью

35 зкДНК-вектора можно использовать анализы, хорошо известные в данной области техники, которые можно выполнять как на моделях *in vitro*, так и на моделях *in vivo*. Уровни экспрессии белка РАН с помощью зкДНК могут быть оценены специалистом в данной области техники путем измерения уровней мРНК и белка РАН (например, ПЦР с обратной транскрипцией, анализ методом Вестерн-блоттинга и иммуноферментный анализ (ИФА)). Согласно одному варианту реализации зкДНК содержит репортерный белок, который можно использовать для оценки экспрессии белка РАН, например, путем исследования экспрессии репортерного белка с помощью флуоресцентной микроскопии или устройства для считывания люминесценции планшетов. В случае приложений *in vivo* для тестирования функциональности данного

45 белка РАН можно использовать анализы функции белков, чтобы определить успешность экспрессии гена. Специалист сможет определить лучший тест для измерения функциональности белка РАН, экспрессируемого вектором зкДНК, *in vitro* или *in vivo*.

[00490] В данном документе предусмотрено, что эффекты экспрессии гена белка

РАН с зкДНК-вектора в клетке или у субъекта могут длиться по меньшей мере 1 месяц, по меньшей мере 2 месяца, по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере четыре месяца, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере шесть месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев, по меньшей мере 2 года, по 5 меньшей мере 5 лет, по меньшей мере 10 лет, по меньшей мере 20 лет или они могут быть постоянными.

[00491] Согласно некоторым вариантам реализации белок РАН в экспрессионной кассете, экспрессионной конструкции или зкДНК-векторе, описанных в данном документе, может быть оптимизирован по кодонам для клетки-хозяина. В данном 10 документе термин «оптимизированный по кодонам» или «оптимизация кодонов» относится к процессу модификации последовательности нуклеиновой кислоты для усиления экспрессии в клетках позвоночного, представляющего интерес, например, мышцы или человека (например, гуманизация), путем замены по меньшей мере одного или более чем одного или значительного числа кодонов нативной последовательности 15 (например, прокариотической последовательности) кодонами, которые чаще или наиболее часто используются в генах этого позвоночного. Различные виды проявляют определенное предпочтение в отношении некоторых кодонов конкретной аминокислоты. Как правило, оптимизация кодонов не изменяет аминокислотную последовательность исходного транслированного белка. Оптимизированные кодоны могут быть определены 20 с использованием, например, оптимизации кодонов Artagen's Gene Forge[®] и платформы для синтеза генов по заказу (Artagen, Inc.) или другой общедоступной базы данных.

D. Определение эффективности путем оценки экспрессии белка РАН с зкДНК-вектора [00492] По существу любой метод, известный в данной области техники для 25 определения экспрессии белка, может быть использован для анализа экспрессии белка РАН с зкДНК-вектора. Неограничивающие примеры таких методов/анализов включают иммуноферментный анализ (ИФА), аффинный ИФА, ELISPOT, последовательное разведение, проточную цитометрию, анализ методом поверхностного плазмонного резонанса, анализ кинетического исключения, масс-спектрометрию, Вестерн-блоттинг, 30 иммунопреципитацию и ПЦР.

[00493] Для оценки экспрессии белка РАН *in vivo* биологический образец может быть получен от субъекта для анализа. Примеры биологических образцов включают образец 35 биожидкости, образец физиологической жидкости, кровь (включая цельную кровь), сыворотку, плазму, мочу, слюну, биопсию и/или образец ткани и т. д. Биологический образец или образец ткани также может относиться к образцу ткани или жидкости, выделенному у индивидуума, включая, но не ограничиваясь перечисленными, биопсию опухоли, стул, спинномозговую жидкость, плевральную жидкость, аспираты сосков, лимфатическую жидкость, внешние срезы кожи, дыхательного, кишечного и мочеполового путей, слезы, слюну, грудное молоко, клетки (включая, но не 40 ограничиваясь перечисленными, клетки крови), опухоли, органы, а также образцы компонентов культуры клеток *in vitro*. Термин также включает смесь упомянутых выше образцов. Термин «образец» также включает необработанные или предварительно обработанные (или подвергнутые предварительному процессингу) биологические образцы. Согласно некоторым вариантам реализации образец, используемый для 45 анализов и способов, описанных в данном документе, включает образец сыворотки, собранный у субъекта, подлежащего тестированию.

E. Определение эффективности экспрессированного белка РАН по клиническим параметрам

[00494] Эффективность конкретного белка РАН, экспрессированного зкДНК-

вектором, для лечения ФКУ (т. е. функциональная экспрессия), может быть определена квалифицированным клиницистом. Однако лечение считается «эффективным лечением», в соответствии с использованием этого термина в данном документе, если любой или все признаки или симптомы ФКУ изменяются благоприятным образом, или если другие клинически принятые симптомы или маркеры заболевания улучшаются или облегчаются, например, по меньшей мере на 10% после лечения зкДНК-вектором, кодирующим терапевтический белок РАН, как описано в данном документе. Эффективность также может быть измерена по отсутствию у индивидуума ухудшения, которое оценивается по стабилизации ФКУ или по потребности в медицинских вмешательствах (т. е. прогрессирование заболевания прекращается или по меньшей мере замедляется). Способы измерения этих показателей известны специалистам в данной области техники и/или описаны в данном документе. Лечение включает любое лечение заболевания у индивидуума или животного (некоторые неограничивающие примеры включают человека или млекопитающее) и включает: (1) ингибирование ФКУ, например, прекращение или замедление прогрессирования ФКУ; или (2) облегчение ФКУ, например, вызывающее регресс симптомов ФКУ; и (3) предотвращение или снижение вероятности развития заболевания ФКУ, или предотвращение вторичных заболеваний/нарушений, ассоциированных с ФКУ. Эффективное количество для лечения заболевания означает такое количество, которое, при введении нуждающемуся в этом млекопитающему, является достаточным для обеспечения эффективного лечения, в соответствии с определением этого термина в данном документе, этого заболевания. Эффективность агента может быть определена путем оценки физических показателей, которые являются специфическими для заболевания ФКУ. Врач может оценить любой один или более из клинических симптомов ФКУ, которые включают: ** (i) снижение уровня фенилаланина (Phe) в сыворотке при соблюдении обычной диеты. Снижение уровня Phe является ключевым биомаркером при разработке способов лечения ФКУ; (ii) восстановление метаболического соотношения Phe и тирозина при соблюдении нормальной диеты. Этот путь отвечает за продуцирование нейротрансмиттеров; и/или (iii) оценку сниженных уровней Phe в сыворотке.

XI. Различные приложения зкДНК-векторов, экспрессирующих антитела или слитые белки

[00495] Как раскрыто в данном документе, композиции и зкДНК-векторы для экспрессии белка РАН, описанные в данном документе, можно применять для экспрессии белка РАН для ряда целей. Согласно одному варианту реализации зкДНК-вектор, экспрессирующий белок РАН, можно применять для создания соматической трансгенной модели на животных, несущей трансген, например, для исследования функции или прогрессирования заболевания ФКУ. Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-вектор, экспрессирующий белок РАН, можно применять для лечения, предотвращения или облегчения состояний или нарушений ФКУ у субъекта-млекопитающего.

[00496] Согласно некоторым вариантам реализации белок РАН может быть экспрессирован с зкДНК-вектора у субъекта в количестве, достаточном для лечения заболевания, ассоциированного с повышенной экспрессией, повышенной активностью продукта гена или нефизиологической положительной регуляцией гена.

[00497] Согласно некоторым вариантам реализации белок РАН может быть экспрессирован с зкДНК-вектора у субъекта в количестве, достаточном для лечения ФКУ со сниженной экспрессией, отсутствием экспрессии или дисфункцией белка.

[00498] Обычный специалист в данной области техники поймет, что трансген может

не представлять собой открытую рамку считывания гена, который сам транскрибируется; вместо этого он может представлять собой промоторную область или репрессорную область гена-мишени, и зкДНК-вектор может модифицировать такую область, что в результате модулирует экспрессию гена РАН.

5 [00499] Композиции и зкДНК-векторы для экспрессии белка РАН, раскрытые в данном документе, можно применять для доставки белка РАН для различных целей, как описано выше.

[00500] Согласно некоторым вариантам реализации трансген кодирует один или более белков РАН, которые можно применять для лечения, облегчения или
10 предотвращения состояний ФКУ у субъекта-млекопитающего. Белок РАН, экспрессируемый зкДНК-вектором, вводят пациенту в количестве, достаточном для лечения ФКУ, ассоциированной с аномальной последовательностью гена, что может привести к любому одному или более из следующего: повышенной экспрессии белка, сверхактивности белка, сниженной экспрессии, отсутствию экспрессии или дисфункции
15 целевого гена или белка.

[00501] Согласно некоторым вариантам реализации зкДНК-векторы для экспрессии белка РАН, раскрытые в данном документе, предназначены для применения в методах диагностики и скрининга, посредством которых белок РАН временно или стабильно экспрессируется в системе на основе культуры клеток или, альтернативно, в модели на
20 трансгенном животном.

[00502] Другой аспект технологии, описанной в данном документе, обеспечивает способ трансдукции популяции клеток млекопитающего зкДНК-вектором для экспрессии белка РАН, раскрытым в данном документе. В целом и в общем смысле, способ включает по меньшей мере этап введения в одну или более клеток популяции композиции, которая
25 содержит эффективное количество одного или более из зкДНК-векторов для экспрессии белка РАН, раскрытых в данном документе.

[00503] Кроме того, согласно настоящему изобретению предложены композиции, а также терапевтические и/или диагностические наборы, которые включают один или более из раскрытых зкДНК-векторов для экспрессии белка РАН, как раскрыто в данном
30 документе, или композиций зкДНК, изготовленных с одним или более дополнительными ингредиентами или приготовленных в соответствии с одной или более инструкциями по их применению.

[00504] Клетка, в которую должен быть введен зкДНК-вектор для экспрессии белка РАН, раскрытый в данном документе, может быть любого типа, включая, но не
35 ограничиваясь перечисленными, нервные клетки (включая клетки периферической и центральной нервной системы, в частности, клетки головного мозга), клетки легких, клетки сетчатки, эпителиальные клетки (например, кишечные и респираторные эпителиальные клетки), мышечные клетки, дендритные клетки, клетки поджелудочной железы (включая островковые клетки), печеночные клетки, клетки миокарда, костные
40 клетки (например, стволовые клетки костного мозга), гемопоэтические стволовые клетки, клетки селезенки, кератиноциты, фибробласты, эндотелиальные клетки, клетки простаты, половые клетки и т.п. В качестве альтернативы, клетка может представлять собой любую клетку-предшественника. В качестве дополнительной альтернативы, клетка может представлять собой стволовую клетку (например, нервную стволовую
45 клетку, стволовую клетку печени). В качестве еще одной альтернативы, клетка может представлять собой раковую или опухолевую клетку. Более того, клетки могут быть любого видового происхождения, как указано выше.

А. Получение и очистка зкДНК-векторов, экспрессирующих РАН

[00505] ЗкДНК-векторы, раскрытые в данном документе, должны применяться для получения белка РАН как *in vitro*, так и *in vivo*. Белки РАН, полученные таким образом, могут быть выделены, протестированы в отношении целевой функции и очищены для

5 Каждая система получения белка имеет свои преимущества/недостатки. В то время как белки, полученные *in vitro*, можно легко очистить и получить белки за короткое время, белки, полученные *in vivo*, могут иметь посттрансляционные модификации, такие как гликозилирование.

[00506] Терапевтический белок РАН, полученный с использованием зкДНК-векторов, 10 может быть очищен с помощью любого метода, известного специалистам в данной области техники, например, ионообменной хроматографии, аффинной хроматографии, осаждения или электрофореза.

[00507] Терапевтический белок РАН, полученный с помощью способов и композиций, описанных в данном документе, может быть протестирован для оценки связывания с 15 целевым белком-мишенью.

ПРИМЕРЫ

[00508] Примеры ниже представлены в качестве иллюстрации, а не ограничения. Обычные специалисты в данной области техники поймут, что зкДНК-векторы могут быть сконструированы из любых ITR дикого типа или модифицированных ITR, 20 описанных в данном документе, и что примерные методы ниже могут быть использованы для конструирования и оценки активности таких зкДНК-векторов. Несмотря на то, что способы приведены в качестве примера для определенных зкДНК-векторов, они применимы к любому зкДНК-вектору в соответствии с описанием.

ПРИМЕР 1: Конструирование зкДНК-векторов с использованием метода на основе 25 клеток насекомых

[00509] Получение зкДНК-векторов с использованием полинуклеотидной матрицы конструкции описано в Примере 1 заявки РСТ/US18/49996, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. Например, полинуклеотидная матрица конструкции, используемая для получения зкДНК-векторов согласно настоящему 30 изобретению, может представлять собой зкДНК-плазмиду, зкДНК-бакмиду и/или зкДНК-бакуловирус. Не ограничиваясь какой-либо теорией, в пермиссивной клетке-хозяине в присутствии, например, Rep, полинуклеотидная матрица конструкции, содержащая два симметричных ITR и экспрессионную конструкцию, где по меньшей мере один из ITR модифицирован относительно последовательности ITR дикого типа, 35 реплицируется с получением зкДНК-векторов. Получение зкДНК-вектора проходит в два этапа: во-первых, вырезание («извлечение») матрицы из остова матрицы (например, генома зкДНК-плазмиды, зкДНК-бакмиды, зкДНК-бакуловируса и т.д.) с помощью белков Rep, и, во-вторых, Rep-опосредуемая репликация вырезанного зкДНК-вектора.

[00510] Примерный способ получения зкДНК-векторов представляет собой получение 40 из зкДНК-плазмиды, как описано в данном документе. На ФИГ. 1А и 1В полинуклеотидная матрица конструкции каждой из зкДНК-плазмид включает как левый модифицированный ITR, так и правый модифицированный ITR, с расположенными между указанными ITR следующими элементами: (i) энхансер/промотор; (ii) сайт клонирования для трансгена; (iii) посттранскрипционный элемент ответа (например, 45 посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита североамериканского сурка (WPRE)); и (iv) сигнал полиаденилирования (например, из гена бычьего гормона роста (BGHrA)). Уникальные сайты распознавания рестрикционной эндонуклеазой (R1-R6) (показанные на ФИГ. 1А и ФИГ. 1В) также были введены между каждым

компонентом для облегчения введения новых генетических компонентов в конкретные сайты в конструкции. Сайты ферментов R3 (PmeI) GTTТАААС (SEQ ID NO: 123) и R4 (PacI) TТААТТАА (SEQ ID NO: 124) конструировали в сайте клонирования для введения открытой рамки считывания трансгена. Эти последовательности клонировали в плазмиду pFastBac HT В, полученную от ThermoFisher Scientific.

[00511] Получение зкДНК-бакмид:

[00512] Компетентные клетки DH10Bac (MAX EFFICIENCY® DH10Bac™ Competent Cells, Thermo Fisher) трансформировали либо тестируемой, либо контрольной плазмидами, следуя протоколу в соответствии с инструкциями производителя. Чтобы получить рекомбинантные зкДНК-бакмиды, в клетках DH10Bac индуцировали рекомбинацию между плазмидой и бакуловирусным челночным вектором.

Рекомбинантные бакмиды отбирали путем положительного скринингового отбора на основании скрининга по сине-белому окрашиванию E. coli (маркер Ф80dlacZΔM15 обеспечивает α-комплементацию гена β-галактозидазы из бакмидного вектора) на чашке с бактериальным агаром, содержащим X-gal и IPTG с антибиотиками для отбора трансформантов и поддержания бакмиды и плазмид на основе транспозаз. Белые колонии, образующиеся в результате транспозиции, которая разрушает индикаторный ген β-галактозиды, собирали и культивировали в 10 мл сред.

[00513] Рекомбинантные зкДНК-бакмиды выделяли из E.coli и трансфицировали ими клетки насекомых Sf9 или Sf21 с использованием FugeneHD для получения инфекционного бакуловируса. Адгезивные клетки насекомых Sf9 или Sf21 культивировали в 50 мл сред в колбах T25 при 25°C. Через 4 дня культуральную среду (содержащую вирус P0) отделяли от клеток, фильтровали через фильтр с размером пор 0,45 мкм, отделяя инфекционные бакуловирусные частицы от клеток или клеточного дебриса.

[00514] Необязательно первое поколение бакуловируса (P0) амплифицировали путем инфицирования наивных клеток насекомых Sf9 или Sf21 в 50-500 мл сред. Клетки поддерживали в суспензионных культурах в инкубаторе с орбитальным шейкером при 130 об./мин при 25°C, отслеживая диаметр и жизнеспособность клеток до тех пор, пока клетки не достигнут диаметра 18-19 нм (от диаметра наивных клеток, равного 14-15 нм) и плотности ~4,0×10⁶ клеток/мл. Через 3-8 дней после инфицирования бакуловирусные частицы P1 в среде собирали после центрифугирования для удаления клеток и дебриса с последующей фильтрацией через фильтр с размером пор 0,45 мкм.

[00515] ЗкДНК-бакуловирус, содержащий тестируемые конструкции, собирали и определяли инфекционную активность или титр бакуловируса. В частности, четыре ×20 мл культур клеток Sf9 при 2,5×10⁶ клеток/мл обрабатывали бакуловирусом P1 в следующих разведениях: 1/1000, 1/10000, 1/50000, 1/100000 и инкубировали при 25-27°C. Инфективность определяли ежедневно на протяжении 4-5 дней по показателю увеличения диаметра клеток и остановке клеточного цикла, а также изменению жизнеспособности клеток.

[00516] «Rep-плазмиду», раскрытую на ФИГ. 8А из PCT/US18/49996, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки, получали в экспрессионном векторе pFASTBAC™-Dual (ThermoFisher), содержащем как Rep78 (SEQ ID NO: 131 или 133), так и Rep52 (SEQ ID NO: 132) или Rep68 (SEQ ID NO: 130) и Rep40 (SEQ ID NO: 129). Rep-плазмиду трансформировали в компетентные клетки DH10Bac (компетентные клетки MAX EFFICIENCY® DH10Bac™ (Thermo Fisher)), следуя предоставленному производителем протоколу. Для получения рекомбинантных бакмид

(«Rep-бакмид») в клетках DH10Bac индуцировали рекомбинацию между Rep-плазмидой и бакуловирусным челночным вектором. Рекомбинантные бакмиды отбирали путем положительного отбора, который включал скрининг по сине-белому окрашиванию *E. coli* (маркер Ф80dlacZΔM15 обеспечивает α-комплементацию гена β-галактозидазы из бакмидного вектора) на чашке с бактериальным агаром, содержащим X-gal и IPTG. Одиночные белые колонии собирали и инокулировали в 10 мл селективных сред (канамицин, гентамицин, тетрациклин в бульоне LB). Рекомбинантные бакмиды (Rep-бакмиды) выделяли из *E. coli*, и трансфицировали клетки насекомых Sf9 или Sf21 указанными Rep-бакмидами, чтобы получить инфекционный бакуловирус.

[00517] Клетки насекомых Sf9 или Sf21 культивировали в 50 мл сред в течение 4 дней и выделяли из культуры инфекционный рекомбинантный бакуловирус («Rep-бакуловирус»). Необязательно Rep-бакуловирус первого поколения (P0) амплифицировали путем инфицирования наивных клеток насекомых Sf9 или Sf21 и культивировали в 50-500 мл сред. Через 3-8 дней после инфицирования бакуловирусные частицы P1 в среде собирали, отделяя клетки путем центрифугирования или фильтрации, или используя другой способ фракционирования. Собирали Rep-бакуловирус и определяли инфекционную активность бакуловируса. В частности, четыре ×20 мл культур клеток Sf9 при $2,5 \times 10^6$ клеток/мл обрабатывали бакуловирусом P1 в следующих разведениях, 1/1000, 1/10000, 1/50000, 1/100000, и инкубировали. Инфективность определяли ежедневно на протяжении 4-5 дней по показателю увеличения диаметра клеток и остановке клеточного цикла, а также изменению жизнеспособности клеток.

[00518] Получение и характеристика зкДНК-вектора

[00519] На ФИГ. 4В среду для культивирования клеток насекомых Sf9, содержащую (1) образец, содержащий зкДНК-бакмиду или зкДНК-бакуловирус, и (2) Rep-бакуловирус, описанный выше, затем добавляли к свежей культуре клеток Sf9 ($2,5 \times 10^6$ клеток/мл, 20 мл) при соотношении 1:1000 и 1:10000, соответственно. Затем клетки культивировали при 130 об./мин при 25°C. Через 4-5 дней после коинфицирования детектировали диаметр и жизнеспособность клеток. Когда диаметр клеток достигал 18-20 нм при жизнеспособности ~70-80%, клеточные культуры центрифугировали, среду удаляли и собирали клеточные осадки. Клеточные осадки сначала ресуспендировали в достаточном объеме водной среды, либо воды, либо буфера. ЗкДНК-вектор выделяли и очищали из клеток с использованием протокола очистки Qiagen MIDI PLUS™ (Qiagen, 0,2 мг массы осадка клеток, обработанной на колонку).

[00520] Значения выхода зкДНК-векторов, полученных и очищенных из клеток насекомых Sf9, первоначально определяли на основании поглощения в УФ-диапазоне при 260 нм.

[00521] ДНК-векторы можно идентифицировать с помощью электрофореза в агарозном геле в нативных или денатурирующих условиях, как проиллюстрировано на ФИГ. 4D, где (а) наличие характерных полос, мигрирующих при двукратно большем размере на денатурирующих гелях, по сравнению с нативными гелями, после расщепления рестрикционной эндонуклеазой и анализа методом гель-электрофореза, и (b) наличие полос мономера и димера (2x) на денатурирующих гелях для нерасщепленного материала характеризует наличие зкДНК-вектора.

[00522] Структуры выделенных зкДНК-векторов анализировали далее путем расщепления ДНК, полученной из коинфицированных клеток Sf9 (как описано в данном документе), рестрикционными эндонуклеазами, выбранными на основании а) присутствия только одного сайта разрезания в зкДНК-векторах, и b) получения фрагментов достаточно большого размера, чтобы они были отчетливо видны при

фракционировании на 0,8% денатурирующем агарозном геле (>800 п.о.). Как проиллюстрировано на ФИГ. 4D и 4E, линейные ДНК-векторы с прерывистой структурой и зкДНК-вектор с линейной и непрерывной структурой можно различить по размеру их продуктов реакции - например, ожидается, что ДНК-вектор с прерывистой структурой даст фрагменты размером 1 тыс. п. о. и 2 тыс. п. о., в то время как бескапсидный вектор с непрерывной структурой, как ожидается, даст фрагменты размером 2 тыс. п. о. и 4 тыс. п. о.

[00523] Таким образом, чтобы качественно продемонстрировать, что выделенные зкДНК-векторы имеют ковалентно замкнутые концы, как требует их определение, образцы расщепляли рестрикционной эндонуклеазой, идентифицированной на основании конкретной последовательности ДНК-вектора как эндонуклеаза с одним сайтом рестрикции, что предпочтительно приводит к получению двух продуктов расщепления неравного размера (например, 1000 п. о. и 2000 п. о.). После расщепления и электрофореза на денатурирующем геле (который разделяет две комплементарные цепи ДНК), линейная, не замкнутая ковалентно ДНК будет разделяться на фрагменты размером 1000 п.о. и 2000 п.о., в то время как ковалентно замкнутая ДНК (т. е. зкДНК-вектор) будет разделяться на фрагменты в 2 раза большего размера (2000 п.о. и 4000 п.о.), так как две цепи ДНК связаны, уже развернуты и имеют вдвое большую длину (но одноцепочечные). Кроме того, при расщеплении мономерных, димерных и n-мерных форм ДНК-векторов все они будут разделяться на фрагменты одинаковых размеров из-за связанных между собой концов мультимерных ДНК-векторов (см. ФИГ. 4D).

[00524] В данном документе выражение «анализ для идентификации ДНК-векторов с помощью электрофореза на агарозном геле на нативном геле и в денатурирующих условиях» относится к анализу для оценки наличия замкнутых концов зкДНК путем выполнения расщепления рестрикционной эндонуклеазой с последующей электрофоретической оценкой продуктов расщепления. Ниже приведен один такой примерный анализ, хотя обычный специалист в данной области техники поймет, что возможны многие известные в данной области техники вариации этого примера. Рестрикционную эндонуклеазу выбирают таким образом, чтобы это был фермент, выполняющий один разрез представляющего интерес зкДНК-вектора с образованием продуктов, длина которых составляет приблизительно 1/3х и 2/3х от длины ДНК-вектора. Это обеспечивает разделение полос как на нативном, так и на денатурирующем гелях. Перед денатурацией важно удалить буфер из образца. Набор для очистки продуктов ПЦР от Qiagen или «центрифужные колонки» для обессоливания, например, колонки GE HEALTHCARE ILLUSTRATM MICROSPIN™ G-25, представляют собой некоторые из известных в данной области техники средств для расщепления эндонуклеазами. Анализ включает, например, i) расщепление ДНК соответствующей рестрикционной эндонуклеазой (ами), 2) внесение, например, в набор для очистки продуктов ПЦР от Qiagen, элюирование дистиллированной водой, iii) добавление 10-кратного денатурирующего раствора (10х = 0,5 М NaOH, 10 мМ ЭДТА), добавление 10-кратного красителя, не забуференного, и проведение анализа с использованием маркеров молекулярной массы ДНК, приготовленных путем добавления 10-кратного денатурирующего раствора к 4-кратному, на 0,8-1,0% геле, предварительно инкубированном с 1 мМ ЭДТА и 200 мМ NaOH, чтобы обеспечить одинаковую концентрацию NaOH в геле и в боксе для геля, и анализ геля в присутствии 1х денатурирующего раствора (50 мМ NaOH, 1 мМ ЭДТА). Обычный специалист в данной области техники поймет, какое напряжение использовать для проведения электрофореза на основании размера и желаемого времени получения результатов. После

электрофореза гели дренируют, нейтрализуют в 1x TBE или TAE и переносят в дистиллированную воду или 1x TBE/TAE с 1x SYBR Gold. Затем полосы могут быть визуализированы, например, с использованием красителя SYBR[®] Gold Nucleic Acid Gel Stain от Thermo Fisher (10000-кратный концентрат в ДМСО) и эпифлуоресцентного света (синего) или УФ (312 нм).

[00525] Чистоту полученного зкДНК-вектора можно оценить с помощью любого метода, известного в данной области техники. В качестве одного примерного и неограничивающего метода, вклад зкДНК-плазмиды в общее поглощение в УФ-диапазоне образца можно оценить путем сравнения интенсивности флуоресценции зкДНК-вектора со стандартом. Например, если на основании поглощения в УФ-диапазоне определено, что на гель загружено 4 мкг зкДНК-вектора, а интенсивность флуоресценции зкДНК-вектора эквивалентна полосе 2 тыс. п. о. при известной массе 1 мкг, значит, масса зкДНК-вектора равна 1 мкг, и зкДНК-вектор составляет 25% от общего количества поглощающего УФ материала. Затем строят график зависимости интенсивности полосы на геле от вычисленного введенного количества, которому соответствует полоса - например, если общее количество зкДНК-вектора соответствует 8 тыс. п. о., а вырезанная сравнительная полоса соответствует 2 тыс. п. о., то интенсивность указанной полосы на графике будет соответствовать 25% от общего введенного количества, что в данном случае составит 0,25 мкг при введении 1,0 мкг. Используя титрование плазмиды зкДНК-вектора для построения стандартной кривой, затем рассчитывают количество для полосы зкДНК-вектора, используя уравнение линии регрессии, которое затем можно использовать для определения процента от общего введенного количества, представленного зкДНК-вектором, или процента чистоты.

[00526] Для сравнительных целей в Примере 1 описано получение зкДНК-векторов с использованием метода на основе клеток насекомых и полинуклеотидной матрицы конструкции, а также описано в Примере 1 из РСТ/US18/49996, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. Например, полинуклеотидная матрица конструкции, используемая для получения зкДНК-векторов согласно настоящему изобретению в соответствии с Примером 1, может представлять собой зкДНК-плазмиду, зкДНК-бакмиду и/или зкДНК-бакуловирус. Не ограничиваясь какой-либо теорией, в перmissive клетке-хозяине в присутствии, например, Rep, полинуклеотидная матрица конструкции, содержащая два симметричных ITR и экспрессионную конструкцию, где по меньшей мере один из ITR модифицирован относительно последовательности ITR дикого типа, реплицируется с получением зкДНК-векторов. Получение зкДНК-вектора проходит в два этапа: во-первых, вырезание («извлечение») матрицы из остова матрицы (например, генома зкДНК-плазмиды, зкДНК-бакмиды, зкДНК-бакуловируса и т.д.) с помощью белков Rep, и, во-вторых, Rep-опосредуемая репликация вырезанного зкДНК-вектора.

[00527] Примерный способ получения зкДНК-векторов в способе с использованием клетки насекомого представляет собой получение из зкДНК-плазмиды, как описано в данном документе. На ФИГ. 1А и 1В полинуклеотидная матрица конструкции каждой из зкДНК-плазмид включает как левый модифицированный ITR, так и правый модифицированный ITR, с расположенными между указанными ITR следующими элементами: (i) энхансер/промотор; (ii) сайт клонирования для трансгена; (iii) посттранскрипционный элемент ответа (например, посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита североамериканского сурка (WPRE)); и (iv) сигнал полиаденилирования (например, из гена бычьего гормона роста (BGHrA)). Уникальные

сайты распознавания рестрикционной эндонуклеазой (R1-R6) (показанные на ФИГ. 1А и ФИГ. 1В) также были введены между каждым компонентом для облегчения введения новых генетических компонентов в конкретные сайты в конструкции. Сайты ферментов R3 (PmeI) GTTTAAAC (SEQ ID NO: 123) и R4 (PacI) TTAATТАА (SEQ ID NO: 124) конструировали в сайте клонирования для введения открытой рамки считывания трансгена. Эти последовательности клонировали в плазмиду pFastBac HT В, полученную от ThermoFisher Scientific.

ПРИМЕР 2: Синтетическое получение зкДНК путем вырезания из двухцепочечной молекулы ДНК

[00528] Синтетическое получение зкДНК-векторов описано в Примерах 2-6 международной заявки РСТ/US19/14122, поданной 18 января 2019 г., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. Один примерный способ получения зкДНК-вектора с применением синтетического способа включает вырезание двухцепочечной молекулы ДНК. В общих чертах, зкДНК-вектор может быть получен с применением конструкции двухцепочечной ДНК, например, см. ФИГ. 7А-8Е из РСТ/US19/14122. Согласно некоторым вариантам реализации конструкция двухцепочечной ДНК представляет собой зкДНК-плазмиду, например, см. ФИГ. 6 в международной заявке на патент РСТ/US2018/064242, поданной 6 декабря 2018 г.

[00529] Согласно некоторым вариантам реализации конструкция для получения зкДНК-вектора содержит регуляторный переключатель, описанный в данном документе.

[00530] В иллюстративных целях в Примере 2 описано получение зкДНК-векторов в качестве примерных ДНК-векторов с замкнутыми концами, полученных с использованием этого метода. Однако, хотя в этом Примере зкДНК-векторы приведены в качестве примеров для иллюстрации синтетических способов получения *in vitro* для получения ДНК-вектора с замкнутыми концами путем вырезания двухцепочечного полинуклеотида, содержащего ITR и экспрессионную кассету (например, гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты), с последующим лигированием свободных 3' и 5' концов, как описано в данном документе, обычному специалисту в данной области техники известно, что, как проиллюстрировано выше, полинуклеотидную молекулу двухцепочечной ДНК можно модифицировать так, чтобы получить любой целевой ДНК-вектор с замкнутыми концами, включая, но не ограничиваясь этим, *doggybone* ДНК, гантелеобразную ДНК и т.п. Примерные зкДНК-векторы для получения антител или слитых белков, которые могут быть получены с помощью синтетического метода получения, описанного в Примере 2, обсуждаются в разделах, озаглавленных «III зкДНК-векторы в целом». Примерные антитела и слитые белки, экспрессируемые зкДНК-векторами, описаны в разделе, озаглавленном «IV Примерные антитела и слитые белки, экспрессируемые зкДНК-векторами».

[00531] Способ включает (i) вырезание последовательности, кодирующей экспрессионную кассету, из конструкции двухцепочечной ДНК, и (ii) образование шпичечных структур на одном или более ITR, и (iii) соединение свободных 5'- и 3'-концов путем лигирования, например, с помощью ДНК-лигазы T4.

[00532] Конструкция двухцепочечной ДНК содержит, в порядке от 5' к 3': первый сайт рестрикционной эндонуклеазы; левый ITR; экспрессионную кассету; правый ITR; и второй сайт рестрикционной эндонуклеазы. Конструкцию двухцепочечной ДНК затем приводят в контакт с одной или более рестрикционными эндонуклеазами для образования двухцепочечных разрывов в обоих сайтах рестрикционных эндонуклеаз. Одна эндонуклеаза может нацелено действовать на оба сайта, или каждый сайт может быть мишенью разной эндонуклеазы, при условии, что сайты рестрикции не

присутствуют в матрице зкДНК-вектора. Это позволяет вырезать последовательность между сайтами рестрикционной эндонуклеазы из остальной части конструкции двухцепочечной ДНК (см. Фиг. 9 РСТ/US19/14122). После лигирования образуется ДНК-вектор с замкнутыми концами.

5 [00533] Один или оба ITR, используемые в способе, могут представлять собой ITR дикого типа. Также могут быть использованы модифицированные ITR, причем указанная модификация может включать делецию, вставку или замену одного или более нуклеотидов из ITR дикого типа в последовательностях, образующих плечо В и В' и/или плечо С и С' (см., например, Фиг. 6-8 и 10 ФИГ. 11В из РСТ/US19/14122), и может
10 иметь две или более шпилечных петель (см., например, ФИГ. 6-8, ФИГ. 11В из РСТ/US19/14122) или одну шпилечную петлю (см., например, ФИГ. 10А-10В, ФИГ. 11В из РСТ/US19/14122). ITR, модифицированный шпилечной петлей, может быть получен путем генетической модификации существующего олиго или путем биологического и/или химического синтеза de novo.

15 [00534] В неограничивающем примере ITR-6 слева и справа (SEQ ID NO: 111 и 112) включают 40 делеций нуклеотидов в плечах В-В' и С-С' из ITR дикого типа ААВ2. Прогнозируется, что нуклеотиды, оставшиеся в модифицированном ITR, образуют одну шпилечную структуру. Свободная энергия Гиббса разворачивания структуры составляет примерно -54,4 ккал/моль. В ITR также могут быть внесены другие
20 модификации, включая необязательную делецию функционального сайта связывания Rep или сайта Trs.

ПРИМЕР 3: получение зкДНК за счет конструирования олигонуклеотидов

[00535] Другой примерный способ получения зкДНК-вектора с использованием синтетического способа, который включает сборку различных олигонуклеотидов,
25 представлен в Примере 3 из РСТ/US19/14122, полностью включенной в данный документ посредством ссылки, в котором зкДНК-вектор получают путем синтеза 5'-олигонуклеотида и 3'-олигонуклеотида ITR и лигирования указанных олигонуклеотидов ITR в двухцепочечный полинуклеотид, содержащий экспрессионную кассету. На ФИГ. 11В из РСТ/US19/14122 представлен примерный способ лигирования 5'-олигонуклеотида
30 ITR и 3'-олигонуклеотида ITR в двухцепочечный полинуклеотид, содержащий экспрессионную кассету.

[00536] Как раскрыто в данном документе, олигонуклеотиды ITR могут содержать WT-ITR (например, см. ФИГ. 3А, ФИГ. 3С) или модифицированные ITR (например, см. ФИГ. 3В и ФИГ. 3D). (См. также, например, ФИГ. 6А, 6В, 7А и 7В из РСТ/US19/14122,
35 которая полностью включена в данный документ). Примерные олигонуклеотиды ITR включают, но не ограничиваются перечисленными, SEQ ID NO: 134-145 (например, см. Таблицу 7 в РСТ/US19/14122). Модифицированные ITR могут включать делецию, вставку или замену одного или более нуклеотидов из ITR дикого типа в последовательностях, образующих плечо В и В' и/или плечо С и С'. Олигонуклеотиды ITR, содержащие WT-ITR или mod-ITR, описанные в данном документе, для использования в бесклеточном синтезе могут быть получены путем генетической модификации или биологического и/или химического синтеза. Как обсуждается в данном документе, олигонуклеотиды ITR в Примерах 2 и 3 могут содержать WT-ITR или модифицированные ITR (mod-ITR)
40 в симметричных или асимметричных конфигурациях, как обсуждается в данном документе.

ПРИМЕР 4: получение зкДНК за счет одноцепочечной молекулы ДНК

[00537] В другом примерном способе получения зкДНК-вектора с использованием синтетического способа, представленном в Примере 4 из РСТ/US19/14122, полностью

включенной в данный документ посредством ссылки, используют одноцепочечную линейную ДНК, содержащую два смысловых ITR, которые фланкируют смысловую последовательность экспрессионной кассеты и ковалентно присоединены к двум антисмысловым ITR, которые фланкируют антисмысловую последовательность экспрессионной кассеты, а концы указанной одноцепочечной линейной ДНК затем лигируют с образованием одноцепочечной молекулы с замкнутыми концами. Один неограничивающий пример включает синтез и/или продуцирование молекулы одноцепочечной ДНК, ренатурацию частей указанной молекулы с образованием одной линейной молекулы ДНК, которая содержит одну или более областей вторичной структуры со спаренными основаниями, с последующим лигированием свободных 5'- и 3'-концов между собой с образованием замкнутой одноцепочечной молекулы.

[00538] Примерная одноцепочечная молекула ДНК для получения зкДНК-вектора содержит, от 5' к 3': смысловый первый ITR; смысловую последовательность экспрессионной кассеты; смысловый второй ITR; антисмысловый второй ITR; антисмысловую последовательность экспрессионной кассеты; и антисмысловый первый ITR.

[00539] Молекула одноцепочечной ДНК для использования в примерном способе Примера 4 может быть образована с помощью любой методологии синтеза ДНК, описанной в данном документе, например, путем синтеза ДНК *in vitro*, или обеспечена путем расщепления конструкции ДНК (например, плазмиды) нуклеазами и плавления полученных фрагментов дцДНК для получения фрагментов оцДНК.

[00540] Ренатурацию можно осуществлять путем понижения температуры ниже расчетных температур плавления пар смысловой и антисмысловой последовательностей. Температура плавления зависит от содержания конкретных нуклеотидных оснований и характеристик используемого раствора, например, от концентрации соли. Температуры плавления для любой конкретной последовательности и комбинации растворов легко рассчитываются обычным специалистом в данной области техники.

[00541] Свободные 5' и 3' концы ренатурированной молекулы могут быть лигированы друг с другом или лигированы со шпилечной молекулой с образованием зкДНК-вектора. Подходящие примерные методологии лигирования и шпилечные молекулы описаны в Примерах 2 и 3.

ПРИМЕР 5: Очистка и/или подтверждение получения зкДНК

[00542] Любой из продуктов ДНК-вектора, полученных с помощью способов, описанных в данном документе, например, включая способы получения на основе клеток насекомых, описанные в Примере 1, или синтетические способы получения, описанные в Примерах 2-4, может быть очищен, например, для удаления примесей, неиспользованных компонентов или побочных продуктов с использованием методов, обычно известных квалифицированному специалисту; и/или может быть проанализирован для подтверждения того, что полученный ДНК-вектор (в данном случае зкДНК-вектор) представляет собой целевую молекулу. Примерным методом очистки ДНК-вектора, например, зкДНК, является использование протокола очистки Qiagen Midi Plus (Qiagen) и/или очистки на геле.

[00543] Ниже приведен примерный метод подтверждения идентичности зкДНК-векторов.

[00544] ДНК-векторы можно идентифицировать с помощью электрофореза в агарозном геле в нативных или денатурирующих условиях, как проиллюстрировано на ФИГ. 4D, где (а) наличие характерных полос, мигрирующих при двукратно большем размере на денатурирующих гелях, по сравнению с нативными гелями, после

расщепления рестрикционной эндонуклеазой и анализа методом гель-электрофореза, и (b) наличие полос мономера и димера (2x) на денатурирующих гелях для нерасщепленного материала характеризует наличие зкДНК-вектора.

5 [00545] Структуры выделенных зкДНК-векторов были дополнительно проанализированы путем расщепления очищенной ДНК рестрикционными эндонуклеазами, выбранными на основании а) присутствия только одного сайта разрезания в зкДНК-векторах, и б) получения фрагментов достаточно большого размера, чтобы они были отчетливо видны при фракционировании на 0,8% денатурирующем агарозном геле (>800 п.о.). Как проиллюстрировано на ФИГ. 4С и 10 4D, линейные ДНК-векторы с прерывистой структурой и зкДНК-вектор с линейной и непрерывной структурой можно различить по размеру их продуктов реакции - например, ожидается, что ДНК-вектор с прерывистой структурой даст фрагменты размером 1 тыс. п. о. и 2 тыс. п. о., в то время как зкДНК-вектор с непрерывной структурой, как ожидается, даст фрагменты размером 2 тыс. п. о. и 4 тыс. п. о.

15 [00546] Таким образом, чтобы качественно продемонстрировать, что выделенные зкДНК-векторы имеют ковалентно замкнутые концы, как требует их определение, образцы расщепляли рестрикционной эндонуклеазой, идентифицированной на основании конкретной последовательности ДНК-вектора как эндонуклеаза с одним сайтом рестрикции, что предпочтительно приводит к получению двух продуктов расщепления 20 неравного размера (например, 1000 п. о. и 2000 п. о.). После расщепления и электрофореза на денатурирующем геле (который разделяет две комплементарные цепи ДНК), линейная, не замкнутая ковалентно ДНК будет разделяться на фрагменты размером 1000 п.о. и 2000 п.о., в то время как ковалентно замкнутая ДНК (т. е. зкДНК-вектор) будет разделяться на фрагменты в 2 раза большего размера (2000 п.о. и 4000 25 п.о.), так как две цепи ДНК связаны, уже развернуты и имеют вдвое большую длину (но одноцепочечные). Кроме того, при расщеплении мономерных, димерных и n-мерных форм ДНК-векторов все они будут разделяться на фрагменты одинаковых размеров из-за связанных между собой концов мультимерных ДНК-векторов (см. ФИГ. 4Е).

[00547] В данном документе выражение «анализ для идентификации ДНК-векторов 30 с помощью электрофореза на агарозном геле на нативном геле и в денатурирующих условиях» относится к анализу для оценки наличия замкнутых концов зкДНК путем выполнения расщепления рестрикционной эндонуклеазой с последующей электрофоретической оценкой продуктов расщепления. Ниже приведен один такой примерный анализ, хотя обычный специалист в данной области техники поймет, что 35 возможны многие известные в данной области техники вариации этого примера. Рестрикционную эндонуклеазу выбирают таким образом, чтобы это был фермент, выполняющий один разрез представляющего интерес зкДНК-вектора с образованием продуктов, длина которых составляет приблизительно 1/3x и 2/3x от длины ДНК-вектора. Это обеспечивает разделение полос как на нативном, так и на денатурирующем 40 гелях. Перед денатурацией важно удалить буфер из образца. Набор для очистки продуктов ПЦР от Qiagen или «центрифужные колонки» для обессоливания, например, колонки GE HEALTHCARE ILLUSTRATM MICROSPIN TM G-25, представляют собой некоторые из известных в данной области техники средств для расщепления эндонуклеазами. Анализ включает, например, i) расщепление ДНК соответствующей 45 рестрикционной эндонуклеазой (ами), 2) внесение, например, в набор для очистки продуктов ПЦР от Qiagen, элюирование дистиллированной водой, iii) добавление 10-кратного денатурирующего раствора (10x = 0,5 М NaOH, 10 мМ ЭДТА), добавление 10-кратного красителя, не забуференного, и проведение анализа с использованием

маркеров молекулярной массы ДНК, приготовленных путем добавления 10-кратного денатурирующего раствора к 4-кратному, на 0,8-1,0% геле, предварительно инкубированном с 1 мМ ЭДТА и 200 мМ NaOH, чтобы обеспечить одинаковую концентрацию NaOH в геле и в боксе для геля, и анализ геля в присутствии 1x денатурирующего раствора (50 мМ NaOH, 1 мМ ЭДТА). Обычный специалист в данной области техники поймет, какое напряжение использовать для проведения электрофореза на основании размера и желаемого времени получения результатов. После электрофореза гели дренируют, нейтрализуют в 1x TBE или TAE и переносят в дистиллированную воду или 1x TBE/TAE с 1x SYBR Gold. Затем полосы могут быть визуализированы, например, с использованием красителя SYBR[®] Gold Nucleic Acid Gel Stain от Thermo Fisher (10000-кратный концентрат в ДМСО) и эпифлуоресцентного света (синего) или УФ (312 нм). Вышеупомянутый метод на основе геля может быть адаптирован для целей очистки путем выделения зкДНК-вектора из полосы геля и обеспечения его ренатурации.

[00548] Чистоту полученного зкДНК-вектора можно оценить с помощью любого метода, известного в данной области техники. В качестве одного примерного и неограничивающего метода, вклад зкДНК-плазмиды в общее поглощение в УФ-диапазоне образца можно оценить путем сравнения интенсивности флуоресценции зкДНК-вектора со стандартом. Например, если на основании поглощения в УФ-диапазоне определено, что на гель загружено 4 мкг зкДНК-вектора, а интенсивность флуоресценции зкДНК-вектора эквивалентна полосе 2 тыс. п. о. при известной массе 1 мкг, значит, масса зкДНК-вектора равна 1 мкг, и зкДНК-вектор составляет 25% от общего количества поглощающего УФ материала. Затем строят график зависимости интенсивности полосы на геле от вычисленного введенного количества, которому соответствует полоса - например, если общее количество зкДНК-вектора соответствует 8 тыс. п. о., а вырезанная сравнительная полоса соответствует 2 тыс. п. о., то интенсивность указанной полосы на графике будет соответствовать 25% от общего введенного количества, что в данном случае составит 0,25 мкг при введении 1,0 мкг. Используя титрование плазмиды зкДНК-вектора для построения стандартной кривой, затем рассчитывают количество для полосы зкДНК-вектора, используя уравнение линии регрессии, которое затем можно использовать для определения процента от общего введенного количества, представленного зкДНК-вектором, или процента чистоты.

ПРИМЕР 6: Контролируемая экспрессия трансгена с зкДНК: экспрессия трансгена с зкДНК-вектора *in vivo* может поддерживаться и/или повышаться путем повторного введения дозы.

[00549] ЗкДНК-вектор получали в соответствии со способами, описанными в Примере 1 выше, с использованием зкДНК-плазмиды, содержащей промотор CAG (SEQ ID NO: 72) и трансген люциферазы (SEQ ID NO: 56), в качестве примерного PАН, фланкированный асимметричными ITR (например, 5'-WT-ITR (SEQ ID NO: 2) и 3' mod-ITR (SEQ ID NO: 3)), и оценивали в различных программах лечения *in vivo*. Этот зкДНК-вектор использовали во всех последующих экспериментах, описанных в Примерах 6-10. В Примере 6 зкДНК-вектор очищали, изготавливали в виде состава с липидной наночастицей (ЛНЧ-зкДНК) и вводили путем инъекции в хвостовую вену каждой мыши CD-1[®] IGS. Липосомы изготавливали с использованием подходящей смеси липидов, содержащей четыре компонента для образования липосом на основе липидных наночастиц (ЛНЧ), включая катионные липиды, вспомогательные липиды, холестерин и ПЭГ-липиды.

[00550] Для оценки устойчивой экспрессии трансгена *in vivo* с зкДНК-вектора на протяжении длительного периода времени ЛНЧ-зкДНК вводили в стерильном ФСБ путем внутривенной инъекции в хвостовую вену мышам CD-1[®] IGS в возрасте приблизительно 5-7 недель. Была проведена оценка трех групп с разными дозировками: 0,1 мг/кг, 0,5 мг/кг и 1,0 мг/кг, по десять мышей на группу (за исключением группы 1,0 мг/кг, в которой было 15 мышей на группу). Инъекции вводили в день 0. Пять мышей из каждой группы получали инъекцию дополнительной идентичной дозы в день 28. Экспрессию люциферазы измеряли путем визуализации IVIS после внутривенного введения мышам CD-1[®] IGS (Charles River Laboratories; мыши дикого типа (WT)). Экспрессию люциферазы оценивали с помощью визуализации IVIS после введения путем внутрибрюшинной инъекции 150 мг/кг субстрата люциферина в дни 3, 4, 7, 14, 21, 28, 31, 35 и 42 и регулярно (например, еженедельно, два раза в неделю или через каждые 10 суток, или через каждые 2 недели) в период между днями 42-110. Экспрессия трансгена люциферазы, в качестве примерного РАН, измеренная с помощью визуализации IVIS в течение по меньшей мере 132 дней после 3 разных протоколов введения (данные не показаны).

[00551] Расширенное исследование выполняли для изучения эффекта повторной дозы, например, повторного введения ЛНЧ-зкДНК, экспрессирующей люциферазу, субъектам, получавшим ЛНЧ-зкДНК. В частности, оценивали возможность повышения уровней экспрессии путем одного или более дополнительных введений зкДНК-вектора.

[00552] В этом исследовании биораспределение экспрессии люциферазы с зкДНК-вектора оценивали с помощью IVIS у мышей CD-1[®] IGS после первоначального внутривенного введения 1,0 мг/кг (т. е. праймирующей дозы) в дни 0 и 28 (Группа А). Второе введение зкДНК-вектора осуществляли путем инъекции в хвостовую вену 3 мг/кг (Группа В) или 10 мг/кг (Группа С) в 1,2 мл в хвостовую вену в день 84. В этом исследовании использовали по пять (5) мышей CD-1[®] в каждой из Групп А, В и С. Визуализацию IVIS экспрессии люциферазы у мышей выполняли перед введением дополнительных доз в дни 49, 56, 63 и 70, как описано выше, а также после введения повторных доз в день 84 и в дни 91, 98, 105, 112 и 132. Экспрессию люциферазы оценивали и детектировали во всех трех Групп А, В и С по меньшей мере до дня 110 (самый продолжительный оцененный период).

[00553] Было показано, что уровень экспрессии люциферазы повышается с помощью повторной дозы (т. е. повторного введения композиции зкДНК) ЛНЧ-зкДНК-Лус, согласно определению путем оценки активности люциферазы в присутствии люциферина. Экспрессия трансгена люциферазы, в качестве примерного РАН, измеренная с помощью визуализации IVIS в течение по меньшей мере 110 дней после 3 разных протоколов введения (Группы А, В и С). У мышей, не получавших никакой дополнительной повторной дозы (праймирующая доза 1 мг/кг (т. е. Группа А)), наблюдали стабильную экспрессию люциферазы на протяжении всего исследования. Мыши в группе В, которым вводили повторную дозу 3 мг/кг зкДНК-вектора, демонстрировали приблизительно семикратное увеличение наблюдаемой светимости по сравнению с мышами в Группе С. Неожиданно, мыши, получившие повторную дозу 10 мг/кг зкДНК-вектора, продемонстрировали 17-кратное увеличение наблюдаемой светимости люциферазы по сравнению с мышами, не получавшими какой-либо повторной дозы (Группа А).

[00554] Группа А мышей CD-1[®] IGS демонстрирует экспрессию люциферазы после внутривенного введения 1 мг/кг зкДНК-вектора в хвостовую вену в дни 0 и 28. Группы

В и С мышей CD-1[®] IGS демонстрируют экспрессию люциферазы после введения 1 мг/кг зкДНК-вектора в первый момент времени (день 0) и введения повторной дозы зкДНК-вектора во второй момент времени в день 84. Второе введение (т. е. повторная доза) зкДНК-вектора повысило экспрессию по меньшей мере в 7 раз, и даже до 17 раз.

5 [00555] 3-кратное увеличение дозы (т. е. количества) зкДНК-вектора при повторном введении дозы в Группе В (т. е. при повторном введении дозы 3 мг/кг) привело к 7-кратному увеличению экспрессии люциферазы. Также неожиданно 10-кратное увеличение количества зкДНК-вектора при повторном введении дозы (т. е. при повторном введении дозы 10 мг/кг) в Группе С привело к 17-кратному увеличению экспрессии люциферазы. Таким образом, второе введение (т. е. повторная доза) зкДНК

10 повысило экспрессию по меньшей мере в 7 раз, и даже до 17 раз. Это показывает, что повышение экспрессии трансгена в результате повторной дозы больше, чем ожидалось, и зависит от дозы или количества зкДНК-вектора при введении повторной дозы и, по-видимому, является синергическим по отношению к начальной экспрессии трансгена

15 после первоначального праймирующего введения в день 0. Таким образом, дозозависимое повышение экспрессии трансгена не является аддитивным, скорее, уровень экспрессии трансгена является дозозависимым и сверхпропорционален суммарному количеству зкДНК-вектора, введенному в каждый момент времени.

[00556] Обе группы В и С показали значительное дозозависимое повышение экспрессии люциферазы по сравнению с контрольными мышами (Группа А), которые не получали повторной дозы зкДНК-вектора во второй момент времени. В совокупности эти данные показывают, что экспрессия трансгена с зкДНК-вектора может быть

20 повышена дозозависимым образом с помощью повторной дозы (т. е. повторного введения) зкДНК-вектора по меньшей мере во второй момент времени.

25 [00557] В совокупности эти данные демонстрируют, что уровень экспрессии трансгена, например, РАН, с зкДНК-векторов может поддерживаться на устойчивом уровне на протяжении по меньшей мере 84 дней и может быть повышен *in vivo* после повторной дозы зкДНК-вектора, введенной по меньшей мере во второй момент времени.

30 ПРИМЕР 7: Устойчивая экспрессия трансгена *in vivo* зкДНК-векторами, изготовленными в виде составов с ЛНЧ

[00558] Воспроизводимость результатов, полученных в Примере 6, с другой липидной наночастицей оценивали *in vivo* на мышах. В день 0 мышам вводили дозу либо зкДНК-вектора, содержащего трансген люциферазы, управляемый промотором СAG, который был инкапсулирован в ЛНЧ, отличную от использованной в Примере 6, либо тех же

35 ЛНЧ, содержащих поли(С), но без зкДНК или гена люциферазы. В частности, самцам мышей CD-1[®] в возрасте приблизительно 4 недель вводили однократную инъекцию 0,5 мг/кг ЛНЧ-ТТХ-люциферазы или контрольных ЛНЧ-поли(С), вводимых внутривенно через латеральную хвостовую вену в день 0. В день 14 животным вводили системно люциферин в дозе 150 мг/кг путем внутрибрюшинной инъекции при 2,5 мл/кг.

40 Приблизительно через 15 минут после введения люциферина каждое животное визуализировали с использованием системы визуализации *in vivo* («IVIS»).

[00559] Как показано на ФИГ. 7, значительная флуоресценция в печени наблюдалась у всех четырех мышей, получивших зкДНК, при этом за исключением места инъекции у животных наблюдалась очень незначительная флуоресценция, это указывает на то,

45 что ЛНЧ опосредовали специфичную для печени доставку конструкции зкДНК, и что доставленный зкДНК-вектор был способен к контролируемой устойчивой экспрессии своего трансгена в течение по меньшей мере двух недель после введения.

ПРИМЕР 8: Устойчивая экспрессия трансгена в печени *in vivo* после введения зкДНК-

вектора

[00560] В отдельном эксперименте оценивали локализацию зкДНК, доставленной с помощью ЛНЧ, в печени экспериментальных животных. ЗкДНК-вектор, содержащий представляющий интерес функциональный трансген, инкапсулировали в те же ЛНЧ, что и использованные в Примере 7, и вводили мышам *in vivo* при уровне дозы 0,5 мг/кг путем внутривенной инъекции. Через 6 часов мышей умерщвляли и отбирали образцы печени, фиксировали формалином и заливали парафином с использованием стандартных протоколов. Анализы методом гибридизации *in situ* RNAscope® выполняли для визуализации зкДНК-векторов в ткани с использованием зонда, специфичного для трангена зкДНК, и детектирования с использованием хромогенной реакции и окрашивания гематоксилином (Advanced Cell Diagnostics). ФИГ. 8 показывает результаты, которые указывают на наличие зкДНК в гепатоцитах.

ПРИМЕР 9: Устойчивая экспрессия трангена зкДНК в глазах *in vivo*

[00561] Устойчивость экспрессии трангена зкДНК-вектора в тканях, отличных от печени, оценивали для определения переносимости и экспрессии зкДНК-вектора после введения в глаза *in vivo*. Несмотря на то, что люциферазу использовали в качестве примерного трангена в Примере 9, обычный специалист может легко заменить трансген люциферазы последовательностью РАН из любой из последовательностей, перечисленных в Таблице 5.

[00562] В день 0 самцам крыс Sprague Dawley в возрасте приблизительно 9 недель вводили путем субретинальной инъекции 5 мкл либо зкДНК-вектора, содержащего трансген люциферазы, в виде состава с реагентом для трансфекции jetPEI® (Polyplus), либо плазмидной ДНК, кодирующей люциферазу, в виде состава с jetPEI®, в обоих случаях в концентрации 0,25 мкг/мкл. В каждой группе тестировали по четыре крысы. Животным давали седативное средство и вводили исследуемый препарат в правый глаз путем субретинальной инъекции с помощью иглы калибра 33. Левый глаз каждого животного оставляли интактным. Сразу после инъекции глаза проверяли методом оптической когерентной томографии или визуализации глазного дна, чтобы подтвердить наличие субретинального пузырька. Крысы получали бупренорфин и местную мазь с антибиотиком в соответствии со стандартными процедурами.

[00563] В дни 7, 14, 21, 28 и 35 животным в обеих группах вводили системно свежеприготовленный люциферин в дозе 150 мг/кг путем внутрибрюшинной инъекции при 2,5 мл/кг. Через 5-15 минут после введения люциферина всех животных визуализировали с использованием IVIS под анестезией изофлураном. Полный поток [фотон/с] и средний поток (фотон/с/ср/см²) в представляющей интерес области, включающей глаз, получали при экспозиции 5 минут. Результаты представлены графически в виде средней светимости в обработанном глазу («инъецированный») для каждой группы лечения относительно средней светимости в необработанном глазу («неинъецированный») для каждой группы лечения (ФИГ. 9В). Значительная флуоресценция легко детектировалась в глазах, в которые был введен зкДНК-вектор, но была намного слабее в глазах, в которые была введена плаزمид (ФИГ. 9А). Через 35 дней крыс, которым инъецировали плазмиду, умерщвляли, продолжая исследование для крыс, получивших зкДНК, с инъекцией люциферина и визуализацией IVIS в дни 42, 49, 56, 63, 70 и 99. Результаты демонстрируют, что зкДНК-вектор, введенный в глаз крысы путем однократной инъекции, опосредует экспрессию трангена *in vivo* и что такая экспрессия поддерживалась на высоком уровне на протяжении по меньшей мере 99 дней после инъекции.

ПРИМЕР 10: Длительное введение доз и введение повторных доз зкДНК-вектора у мышей Rag2.

[00564] В ситуациях, когда один или более трансгенов, кодируемых в экспрессионной генной кассете зкДНК-вектора, экспрессируются в среде хозяина (например, в клетке или в организме субъекта), где экспрессированный белок распознается как чужеродный, существует вероятность того, что у хозяина выработается адаптивный иммунный ответ, который может привести к нежелательному истощению продукта экспрессии, которое может быть ошибочно принято за отсутствие экспрессии. В некоторых случаях это может происходить с репортерной молекулой, которая является гетерологичной для нормальной среды хозяина. Соответственно, экспрессию трансгена зкДНК-вектора оценивали *in vivo* в модели на мышях Rag2, в которой отсутствуют В- и Т-клетки и, следовательно, не вырабатывается адаптивный иммунный ответ на ненативные для мышей белки, такие как люцифераза. В общих чертах, в день 0 мышам линий c57bl/6 и Rag2 с подавленными генами вводили путем внутривенной инъекции в хвостовую вену 0,5 мг/кг инкапсулированного в ЛНЧ зкДНК-вектора, экспрессирующего люциферазу, или контроля поли(С), а в день 21 некоторым мышам вводили повторную дозу того же самого ЛНЧ-инкапсулированного зкДНК-вектора при том же уровне дозы. Все тестируемые группы состояли из 4 мышей в каждой. Визуализацию IVIS выполняли после инъекции люциферина, как описано в Примере 9, с недельными интервалами.

[00565] При сравнении полного потока, наблюдаемого в анализах IVIS, флуоресценция, наблюдаемая у мышей дикого типа (косвенная мера присутствия экспрессированной люциферазы), которым вводили ЛНЧ-зкДНК-вектор-Luc, постепенно снижалась после дня 21, в то время как мыши Rag2, которым вводили тот же самый препарат, проявили относительно постоянную устойчивую экспрессию люциферазы на протяжении 42 дней эксперимента (ФИГ. 9А). Снижение у мышей дикого типа, наблюдаемое приблизительно в день 21, соответствует временному интервалу, в котором можно ожидать появления адаптивного иммунного ответа. Повторное введение ЛНЧ с зкДНК-вектором мышам Rag2 приводило к заметному увеличению экспрессии, которая была устойчивой в течение по меньшей мере 21 дня, на протяжении которых проводили наблюдения в этом исследовании (ФИГ. 9В). Результаты позволяют предположить, что адаптивный иммунитет может играть определенную роль при экспрессии ненативного белка с зкДНК-вектора у хозяина, и что наблюдаемое снижение экспрессии в период времени 20+ дней с момента первоначального введения может указывать на мешающий адаптивный иммунный ответ на экспрессируемую молекулу, а не на снижение экспрессии (или в дополнение к ней). Следует отметить, что этот ответ, как ожидается, будет низким в случае экспрессии у хозяина нативных белков, когда, предположительно, хозяин будет правильно распознавать экспрессированные молекулы как собственные и не будет вырабатывать такой иммунный ответ.

ПРИМЕР 11: Влияние специфической для печени экспрессии и модуляции CpG на устойчивую экспрессию

[00566] Как описано в Примере 10, нежелательный иммунный ответ хозяина в некоторых случаях может искусственно ослаблять то, что иначе могло бы быть устойчивой экспрессией одного или более целевых трансгенов с введенного зкДНК-вектора. Использовали два подхода, чтобы оценить влияние избегания и/или ослабления потенциального иммунного ответа хозяина на устойчивую экспрессию с зкДНК-вектора. Во-первых, поскольку вектор зкДНК-Luc, использованный в предшествующих примерах, находился под контролем конститутивного промотора CAG, была получена сходная конструкция с использованием специфического для печени промотора (hAAT) или

другого конститутивного промотора (hEF-1), чтобы определить, будет ли избегание длительного воздействия миелоидных клеток или тканей, не относящихся к печени, снижать любые наблюдаемые иммунные эффекты. Во-вторых, некоторые конструкции зкДНК-люцифераза конструировали так, чтобы иметь пониженное содержание CpG, известного триггера иммунной реакции хозяина. Измеряли экспрессию гена люциферазы, кодируемой зкДНК, при введении мышам таких модифицированных зкДНК-векторов с замененным промотором.

[00567] Использовали три разных зкДНК-вектора, каждый из которых кодировал люциферазу в качестве трансгена. Первый зкДНК-вектор имел большое количество неметилированного CpG (~350) и содержал конститутивный промотор CAG («зкДНК CAG»); второй имел умеренное количество неметилированного CpG (~60) и содержал специфический для печени промотор hAAT («зкДНК hAAT с низким содержанием CpG»); и третий представлял собой метилированную форму второго, не содержащую неметилированного CpG, и также содержал промотор hAAT («зкДНК hAAT без CpG»). В остальном зкДНК-векторы были идентичны. Векторы готовили, как описано выше.

[00568] Четыре группы по четыре самца мышей CD-1[®], в возрасте приблизительно 4 недель, получали один из зкДНК-векторов, инкапсулированных в ЛНЧ, или контроль поли(С). В день 0 каждой мышке вводили путем однократной внутривенной инъекции в хвостовую вену 0,5 мг/кг зкДНК-вектора в объеме 5 мл/кг. Значения массы тела регистрировали в дни -1, -, 1, 2, 3, 7 и еженедельно после этого, до умерщвления мышей. Образцы цельной крови и сыворотки брали в дни 0, 1 и 35. Прижизненную визуализацию проводили в дни 7, 14, 21, 28 и 35, и затем еженедельно с использованием системы визуализации *in vivo* (IVIS). Для визуализации каждой мышке вводили люциферин при 150 мг/кг путем внутрибрюшинной инъекции при 2,5 мл/кг. Через 15 минут каждую мышку анестезировали и визуализировали. Мышей умерщвляли в день 93 и собирали терминальные ткани, включая печень и селезенку. Измерения цитокинов проводили через 6 часов после введения дозы в день 0.

[00569] Несмотря на то, что у всех получивших зкДНК мышей наблюдали значительную флуоресценцию в дни 7 и 14, у мышей, получивших зкДНК CAG, флуоресценция быстро снижалась после дня 14 и более постепенно уменьшалась на протяжении оставшейся части исследования. Напротив, у мышей, получивших зкДНК hAAT с низким содержанием CpG и без CpG, полный поток оставался на стабильно высоком уровне (Фиг. 10). Это позволяет предположить, что направление доставки зкДНК-вектора специфически в печень приводило к устойчивой и длительной экспрессии трансгена с вектора в течение по меньшей мере 77 дней после однократной инъекции. Конструкции с минимизированным содержанием CpG или с полным отсутствием CpG имели сходные профили длительной устойчивой экспрессии, в то время как конструкция с конститутивным промотором и высоким содержанием CpG проявила снижение экспрессии с течением времени, это позволяет предположить, что иммунная активация хозяина при введении зкДНК-вектора может играть определенную роль в любом снижении экспрессии, наблюдаемом при введении такого вектора субъекту. Эти результаты обеспечивают альтернативные методы адаптации продолжительности ответа к желаемому уровню путем выбора ограниченного конкретной тканью промотора и/или изменения содержания CpG в зкДНК-векторе в том случае, если наблюдается иммунный ответ хозяина - потенциально, специфичный в отношении трансгена ответ.

ПРИМЕР 12: Гидродинамическая доставка зкДНК, экспрессирующей РАН

[00570] Гидродинамическая инъекция в хвостовую вену является хорошо известным

методом введения нуклеиновой кислоты в печень у грызунов. В этой системе инъекция под давлением большого объема неинкапсулированной нуклеиновой кислоты приводит к кратковременному увеличению проницаемости клеток и доставке непосредственно в ткани и клетки. Это обеспечивает экспериментальный механизм обхода многих иммунных систем хозяина, таких как привлечение макрофагов, что обеспечивает возможность наблюдать доставку и экспрессию в отсутствие такой активности.

[00571] Два разных зкДНК-вектора, каждый с левым ITR дикого типа и усеченным мутантным правым ITR и имеющие трансгенную область, кодирующую РАН человека, получали и очищали, как описано выше в Примерах 1 и 5. Каждый зкДНК-вектор РАН находился под контролем разного специфического для печени промотора. В анализ также был включен контрольный ЛНЧ-инкапсулированный поли(С). Каждый из зкДНК-векторов РАН (по отдельности, без какой-либо инкапсуляции ЛНЧ) и контроль вводили подобранным по возрасту мышам обоего пола РАН^{enu2} в возрасте приблизительно 4-6 недель. Незащищенные зкДНК-векторы вводили при 5 мкг на животное (6 животных на группу) с помощью гидродинамической внутривенной инъекции через латеральную хвостовую вену в объеме <100 мг/мл. Массу тела измеряли в дни -1, 0, 1, 2, 3, 7 и 14. Образцы крови собирали у каждого обработанного животного в дни -1, 3, 7 и 14. Количество фенилаланина в образцах сыворотки обработанных животных измеряли с помощью высокопроизводительной масс-спектрометрии и выражали как процент от уровней, наблюдаемых у обработанных контролем животных.

[00572] Как показано на ФИГ. 11, уровни фенилаланина в этой модели на мутантных мышах оставались стабильно высокими в течение эксперимента у обработанных контролем животных. Введение любого из зкДНК-векторов снижало уровни фенилаланина у мышей приблизительно на 75% на протяжении эксперимента (ФИГ. 11). Этот эксперимент продемонстрировал, что зкДНК-векторы, введенные с помощью гидродинамической инъекции, экспрессировали активный РАН, который был способен системно снижать уровни фенилаланина в модели ФКУ на мышах.

ПРИМЕР 13: Фармакологическое исследование для оценки биохимической коррекции уровней фенилаланина путем экспрессии фермента РАН человека у мышей РАН^{enu2} с помощью гидродинамической инъекции

[00573] Доступная модель дефицита РАН на мышах, мышь РАН^{enu2}, позволяет исследовать эффект экспрессии фермента РАН человека на уровень фенилаланина у мышей РАН^{enu2}. Дефицит РАН ассоциирован с нарушением клиренса фенилаланина и, как следствие, с гиперфенилаланинемией.

[00574] ЗкДНК-векторы получали, как описано в Примере 12. Каждый из зкДНК-векторов РАН (по отдельности, без какой-либо инкапсуляции ЛНЧ) и контроль вводили подобранным по возрасту мышам обоего пола РАН^{enu2} в возрасте приблизительно 4-6 недель. Незащищенные зкДНК-векторы вводили при 5 мкг на животное (6 животных на группу) с помощью гидродинамической внутривенной инъекции через латеральную хвостовую вену в объеме <100 мг/мл. Массу тела измеряли в дни -1, 0, 1, 2, 3, 7 и 14. Образцы крови собирали у каждого обработанного животного в дни -1, 3, 7 и 14. Количество фенилаланина в образцах сыворотки обработанных животных измеряли с помощью высокопроизводительной масс-спектрометрии и выражали как процент от уровней, наблюдаемых у контрольных обработанных животных (РАН^{enu2}).

[00575] Дизайн исследования показан ниже в Таблице 9 и Таблице 10.

Таблица 9

№ группы	Кол-во животных в группе	Генотип	Лечение	Уровень дозы	Объем дозы	Схема лечения, ROA	Конечная временная точка
5	1	WT VTBR однопометники	Носитель	0	90-100 мл/кг (установленный объем)	Один раз в День 0 путем в/в гидродинамической инъекции	День 28
	2		зкДНК-РАН мыши	5 мкг			
	3	РАН ^{enu2} КО	Носитель	0			
	4		зкДНК-РАН мыши	5 мкг			
10	зкДНК-промотор VD, функционально связанный с codor4 РАН человека (с минимальным содержанием CpG)						
	6		зкДНК-промотор VD, функционально связанный с codor2 РАН человека				
15	7	зкДНК-промотор hAAT, связанный с codor4 hРАН (с минимальным содержанием CpG)	5 мкг				
8	Плаزمид-РАН мыши						

Таблица 10

№ группы	Кол-во животных в группе	Генотип	Лечение	Уровень дозы	Объем дозы	Схема лечения, ROA	Конечная временная точка
20	1	WT VTBR однопометники	Носитель	0	90-100 мл/кг (установленный объем)	Один раз в День 0 путем в/в гидродинамической инъекции	День 28
	2		зкДНК-промотор hEF1a, связанный с hРАН Codor2	5 мкг			
25	3	РАН ^{enu2} КО	Носитель	0			
	4		зкДНК-промотор hEF1a, связанный с hРАН Codor2	5 мкг			
	5		зкДНК-эндогенный промотор hРАН, связанный с hРАН_экзон1-модифицированный интрон1-экзон2_кДНК_ORF_v5				
6			зкДНК-промотор VD, связанный с эндогенной кДНК hРАН				
30	7		зкДНК-II эндо_hРАН_промотор, связанный с hРАН_экзон1-MVМинтрон-экзон2_кДНК_ORF_v5				

№ = номер; в/в = внутривенно; ROA = путь введения; WT = дикий тип; КО = нокаут.

[00576] Исследуемые препараты поставлялись в виде концентрированного исходного раствора и хранились при номинальной температуре 4°C. Составы не перемешивали на вортексе и не центрифугировали. Группы размещали в прозрачных поликарбонатных клетках с контактной подстилкой на вентилируемой стойке в процедурной комнате. Корм и фильтрованную водопроводную воду, подкисленную 1 н. HCl до заданного pH 2,5-3,0, предоставляли животным ad libitum.

[00577] Кровь собирали в промежуточных и конечных временных точках, как показано в Таблицах 11А и 11В, соответственно.

Таблица 11А

Номер группы	Время сбора образцов цельной крови	
	Хвост, подкожный или глазничный	Терминальный
	Сыворотка ^a	
1 - 8	ГОЛОДАНИЕ День -3(-), 3, 7, 14, 21	ГОЛОДАНИЕ День 28
1 - 7	ГОЛОДАНИЕ День -3(-), 3, 7, 14, 21	ГОЛОДАНИЕ День 28

Обработка/Хранение	Две (2) аликвоты	Две (2) аликвоты
	Замороженные при номинальной температуре -70°C	

[00578] ^aЦельную кровь собирали в пробирки для отделения сыворотки с активатором свертывания; MOV = максимальный доступный объем

[00579] Таблица 11В

Номер группы	Время сбора образцов
	Печень
1 - 8	В День 28
1 - 7	В День 28
Объем/доля	Целый орган, разделенный
Обработка	2х куса по ~50 мг, (не взвешенные) (Спонсор) Левая доля печени, хранившаяся в 10% NBF (EPL) 3х куса по ~25-50 мг взвешенные и мгновенно замороженные по отдельности (Lake Pharma)
Хранение	Фиксированные образцы, хранящиеся охлажденными Замороженные образцы, хранящиеся при номинальной температуре -70°C (n = 2 для Pure Honey / n = 3 для Lake Pharma)

[00580] № = номер, NBF = нейтральный забуференный формалин

[00581] Сбор образцов крови выполняли, как описано ниже в Таблице 12.

Таблица 12

Объем (мл) Цельная кровь	Образец Назначение	D -3 (~)	D 3, 7, 14, 21	D28 (терминальный)
0,15	цитокин			
0,05	анализ РНЕ X2	0,05	0,05	0,6
	всего/день (мл)	0,05	0,05	0,6

[00582] Детали исследования описаны далее:

[00583] Вид (количество, пол, возраст): Для групп 1-8: 36 + 2 запасные мыши РАН^{enu2} (обоюго пола, возраст ~4-6 недель, подобранные по возрасту); 10 + 1 запасная мышь

WT (однопометники; подобранные по возрасту). Для групп 1-7: 30 мышей РАН^{enu2} (обоюго пола, возраст ~7-10 недель, подобранные по возрасту); 10 WT (однопометники; подобранные по возрасту).

[00584] Класс соединения: ДНК в липидных наночастицах.

[00585] Наблюдения за клеткой: Наблюдения за клеткой выполняли ежедневно.

[00586] Клинические наблюдения: Клинические наблюдения выполняли через ~1, ~6 и ~24 часа после введения дозы в День.

[00587] Масса тела: Массу тела всех животных регистрировали в Дни -4, 0, 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28, в том числе до умерщвления.

[00588] Лекарственная форма: Исследуемые препараты поставляются в виде концентрированного исходного раствора. Исходный раствор разбавляют ФСБ непосредственно перед использованием. Полученные материалы хранят при температуре ~4°C (или на влажном льду), если дозирование не выполняется немедленно.

[00589] Введение дозы: Исследуемые материалы для Групп 1-8 и Групп 1-7 вводили в День 0 путем гидродинамического внутривенного (в/в) введения в установленном объеме на животное, 90-100 мл/кг (в зависимости от самого легкого животного в группе) через латеральную хвостовую вену (введение дозы в течение 5 секунд).

[00590] Голодание перед сбором крови и вскрытием: Все животные (все группы) голодали в течение минимум 4 часов до сбора крови в исходных условиях перед введением дозы в День 3 (~), а также в День 3, 7, 14, 21 и 28 (перед терминальным сбором

крови).

[00591] Сбор крови: После каждого сбора животным подкожно вводили 0,5-1,0 мл раствора Рингера с лактатом. У животных собирали кровь в соответствии с приведенными выше таблицами сбора крови.

5 [00592] После 4-часового голодания в Дни -3 (~), 3, 7, 14 и 21 у животных брали цельную кровь для выделения сыворотки, которую собирали путем надрезания хвостовой вены, из подкожной вены или из глазничного синуса (при вдыхании изофлурана в соответствии с СОП учреждения). Будут сделаны две (2) аликвоты. Все образцы хранили при номинальной температуре -70°C до отправки.

10 [00593] Восстановление после анестезии: За животными непрерывно наблюдали, пока они находились под анестезией, во время восстановления и до восстановления подвижности.

[00594] Умерщвление и терминальный сбор крови: В День 28 после 4-часового голодания животных умерщвляли путем асфиксии в CO_2 с последующей торакотомией и обескровливанием. Максимальный доступный объем крови собирали с помощью 15 сердечной пункции и обрабатывали для получения сыворотки в соответствии с СОП учреждения и хранили в двух (2) аликвотах.

[00595] Перфузия: После обескровливания всех животных подвергали перфузии сердца физиологическим раствором. В общих чертах, внутрисердечную перфузию всего 20 тела выполняли путем введения иглы калибра 23/21, прикрепленной к 10 мл шприцу, содержащему физиологический раствор, в просвет левого желудочка для перфузии. Правое предсердие было рассечено, чтобы обеспечить дренажный выход для перфузата. После того, как игла была помещена в сердце, к поршню прикладывали легкое и 25 постоянное давление для перфузии животного. Адекватный поток промывочного раствора обеспечивали до тех пор, пока выходящий перфузат не станет прозрачным (без видимой крови), это указывает на то, что промывочный раствор насытил тело и процедура завершена.

[00596] Сбор ткани: Терминальные ткани собирали у агонирующих животных, 30 которых умерщвляли до запланированной временной точки. При наличии возможности, собирали и сохраняли ткани животных, которые были найдены мертвыми.

[00597] После умерщвления и перфузии забирали печень. Из печени собирали два (2) среза по ~ 50 мг, но не взвешивали и мгновенно замораживали как можно скорее. Затем собирали и взвешивали три (3) среза по ~ 25 -50 мг (≤ 50 мг). Срезы мгновенно 35 замораживали по отдельности и хранили при номинальной температуре -70°C до отправки. Левую долю печени помещали в кассеты для гистологии, фиксировали в 10% NBF и охлаждали ($\sim 4^{\circ}\text{C}$). Ткань в 10% NBF хранили охлажденной ($\sim 4^{\circ}\text{C}$) до отправки в герметичном контейнере на пакетах со льдом.

[00598] Уровни фенилаланина (PHE): Образцы сыворотки анализировали с помощью Pure Honey для определения уровней PHE.

40 [00599] Уровни активности: Два (2) замороженных образца печени анализировали с помощью Pure Honey для определения уровней активности.

[00600] Результаты: Как показано на ФИГ. 12, уровни фенилаланина (% PHE относительно контроля) в этой модели на мутантных мышях оставались стабильно высокими в ходе эксперимента у обработанных контролем животных. Введение любого 45 из зкДНК-векторов (Codop2 или Codop4) снижало уровни фенилаланина у мышей на протяжении эксперимента (ФИГ. 12). Эти результаты продемонстрировали, что зкДНК-векторы, вводимые с помощью гидродинамической инъекции, экспрессировали активный РАН, который был способен системно снижать уровни фенилаланина в модели ФКУ

на мышах. ЗкДНК, содержащая промотор VD, связанный с оптимизированным по кодонам вариантом 2 РАН человека (Codop2), функционировала лучше всего из трех протестированных экспериментальных зкДНК-векторов. Этот результат, показывающий, что оптимизированный по кодонам вариант 2 РАН человека (Codop2) функционировал незначительно лучше, чем оптимизированный по кодонам вариант 4 РАН человека (Codop4), был неожиданным, по меньшей мере частично, поскольку вариант 4 был сконструирован с минимизацией CpG, что, как ожидается, обычно приводит к повышенной экспрессии трансгена, которая будет коррелировать со снижением уровней РНЕ в экспериментальной системе, описанной в данном документе. Однако было обнаружено, что Codop2 (без минимизации CpG) снижал уровни РНЕ больше, чем Codop4 (с минимизацией CpG).

[00601] ПРИМЕР 14: Фармакологическое исследование для оценки биохимической коррекции уровней фенилаланина путем экспрессии фермента РАН человека у мышей РАН^{enu2} на основании ответа на дозу, введенную путем в/в гидродинамической инъекции

[00602] ЗкДНК-векторы получали, как описано в Примере 12. Каждый из зкДНК-векторов РАН (по отдельности, без какой-либо инкапсуляции ЛНЧ) и контроль вводили подобранным по возрасту мышам обоего пола РАН^{enu2} в возрасте приблизительно 4-6 недель. Незащищенные зкДНК-векторы вводили при 0,5 мкг на животное, 5 мкг на животное или 50 мкг на животное (5 животных на группу) путем гидродинамической внутривенной инъекции через латеральную хвостовую вену в объеме <100 мкг/мл. Массу тела измеряли в дни -1, 0, 1, 2, 3, 7 и 14. Образцы крови собирали у каждого обработанного животного в дни -1, 3, 7 и 14. Количество фенилаланина в образцах сыворотки обработанных животных измеряли с помощью высокопроизводительной масс-спектрометрии.

[00603] Дизайн исследования показан ниже в Таблице 13.

Таблица 13

№ группы	1 животное на группу	Генотип	Лечение	Уровень дозы	Объем дозы	Схема лечения, ROA	Конечная временная точка
1	5	WT VTBR одно-пометники	Носитель	0	90-100 мл/кг (установленный объем)	Один раз в День 0 путем в/в гидродинамической инъекции	День 28
2	5		зкДНК-промотор hAAT, связанный с РАН мыши	5 мкг			
3	5	РАН ^{enu2} КО	Носитель	0			
4	5		зкДНК-hAAT-mРАН	0,5 мкг			
5	5			5 мкг			
6	5			50 мкг			
7	5		зкДНК-VD-codop2	0,5 мкг			
8	5			5 мкг			
9	5			50 мкг			

[00604] Сбор крови проводили, как описано в Примере 13.

[00605] Детали исследования описаны далее:

[00606] Вид (количество, пол, возраст): 35 + 1 запасная мышь РАН' (обоего пола, =возраст 6-9 недель, подобранные по возрасту); 10 + 2 запасные мыши WT (однопометники; подобранные по возрасту).

[00607] Класс соединения: ДНК в липидных наночастицах

[00608] Наблюдения за клеткой: Наблюдения за клеткой выполняли ежедневно.

[00609] Клинические наблюдения: Клинические наблюдения выполняли через -1, =6 и =24 часа после введения дозы исследуемого материала (День 0). Дополнительные наблюдения выполняли в виде исключения.

[00610] Масса тела: Массу тела всех животных регистрировали в Дни -4, 0, 1, 2, 3, 7,

14, 21, 28, в том числе до умерщвления.

[00611] Лекарственная форма: Исследуемые препараты поставлялись в виде концентрированного исходного раствора. Исходный раствор разбавляли тФСБ непосредственно перед использованием.

5 [00612] Введение дозы: Исследуемые материалы для групп 1-9 вводили в День 0 путем гидродинамического в/в введения в установленном объеме на животное, 90-100 мл/кг (в зависимости от самого легкого животного в группе) через латеральную хвостовую вену (введение дозы в течение 5 секунд).

[00613] Голодание перед сбором крови и вскрытием: Все животные (все группы)
10 голодали в течение минимум 4 часов до сбора крови в исходных условиях перед введением дозы в День -4 (=), а также в День 3, 7, 14 и 21.

[00614] Сбор крови: После каждого сбора животным подкожно вводили 0,5-1,0 мл раствора Рингера с лактатом. У животных брали кровь в соответствии с таблицами сбора крови. В Дни -4 (--), 3, 7, 14 и 21 у животных собирали цельную кровь для
15 получения сыворотки натошак (см. таблицу выше). Цельную кровь для получения сыворотки собирали путем надрезания хвостовой вены, из подкожной вены или из глазничного синуса (при вдыхании изофлурана в соответствии с СОП учреждения). Цельную кровь собирали в пробирки для отделения сыворотки с активатором свертывания. Была сделана одна (1) аликвота. До отправки все образцы хранили при
20 номинальной температуре -70°C .

[00615] Восстановление после анестезии: За животными непрерывно наблюдали, пока они находились под анестезией, во время восстановления и до восстановления подвижности.

[00616] Умерщвление и терминальный сбор крови: В День 28 после 4-часового
25 голодания животных умерщвляли путем асфиксии в CO_2 с последующей торакотомией и обескровливанием. Максимальный доступный объем крови собирали с помощью сердечной пункции и обрабатывали для получения сыворотки в соответствии с СОП учреждения и хранили в двух (2) аликвотах.

[00617] Перфузия: После обескровливания всех животных подвергали перфузии
30 сердца физиологическим раствором. В общих чертах, внутрисердечную перфузию всего тела выполняли путем введения иглы калибра 23/21, прикрепленной к 10 мл шприцу, содержащему физиологический раствор, в просвет левого желудочка для перфузии. Правое предсердие было рассечено, чтобы обеспечить дренажный выход для перфузата. После того, как игла была помещена в сердце, к поршню прикладывали легкое и
35 постоянное давление для перфузии животного. Адекватный поток промывочного раствора обеспечивали до тех пор, пока выходящий перфузат не станет прозрачным (без видимой крови), это указывает на то, что промывочный раствор насытил тело и процедура завершена.

[00618] Сбор ткани: Терминальные ткани собирали у агонирующих животных,
40 которых умерщвляли до запланированной временной точки. При наличии возможности, собирали и сохраняли ткани животных, которые были найдены мертвыми.

[00619] После умерщвления и перфузии забирали печень. Из печени собирали два
(2) среза по ~50 мг, но не взвешивали и мгновенно замораживали как можно скорее. Затем собирали и взвешивали три (3) среза по ~25-50 мг (<50 мг). Срезы мгновенно
45 замораживали по отдельности и хранили при номинальной температуре -70°C до отправки. Всю оставшуюся печень выбрасывали.

[00620] Уровни фенилаланина (PHE): Образцы сыворотки анализировали с помощью Pure Honey для определения уровней PHE.

[00621] Уровни активности: Два (2) замороженных образца печени анализировали с помощью Pure Honey для определения уровней активности.

[00622] Результаты: Как показано на ФИГ. 13, уровни фенилаланина в этой модели на мутантных мышах оставались стабильно высокими в ходе эксперимента у обработанных контролем животных. Введение зкДНК-вектора, содержащего VD-hPAH codop2, снижало уровни фенилаланина у мышей на протяжении эксперимента дозозависимым образом (ФИГ. 13). Этот эксперимент продемонстрировал, что зкДНК-векторы, введенные путем гидродинамической инъекции, экспрессировали активный PAH, который был способен системно дозозависимо снижать уровни фенилаланина в модели ФКУ на мышах.

ПРИМЕР 15: Фармакологическое исследование для оценки биохимической коррекции уровней фенилаланина путем экспрессии фермента PAH человека у мышей PAH^{enu2} с помощью гидродинамической инъекции - корреляция РНЕ с конструкции hPAH-codop2 с активностью фермента PAH

[00623] Следующее исследование проводили для определения эффекта экспрессии фермента PAH человека на уровень фенилаланина у мышей PAH^{enu2} и для корреляции экспрессии PAH человека с активностью фермента.

[00624] зкДНК-векторы получали, как описано в Примере 12. Каждый из зкДНК-векторов PAH (по отдельности, без какой-либо инкапсуляции ЛНЧ) и контроль вводили подобранным по возрасту мышам обоего пола PAH^{enu2} в возрасте приблизительно 4-6 недель. Незащищенные зкДНК-векторы вводили при 5 мкг на животное (6 животных на группу) с помощью гидродинамической внутривенной инъекции через латеральную хвостовую вену в объеме <100 мг/мл. Массу тела измеряли в дни -1, 0, 1, 2, 3, 7 и 14.

Образцы крови собирали у каждого обработанного животного в дни -1, 3, 7 и 14. Количество фенилаланина в образцах сыворотки обработанных животных измеряли с помощью высокопроизводительной масс-спектрометрии и выражали как процент от уровней, наблюдаемых у обработанных контролем животных (PAH^{enu2}).

[00625] Дизайн исследования показан ниже в Таблице 14.

Таблица 14

№ группы	Кол-во животных в группе	Генотип	Лечение	Уровень дозы (мкг)	Объем дозы (мл/кг)	Схема лечения, в/в	Конечная временная точка
1	5	WT однопометники	ФСБ	Неприменимо	90-100 мл/кг (установленный объем)	Один раз в День 0 путем в/в гидродинамической инъекции	День 28
2	5		ФСБ	Неприменимо			День 28
3	5		зкДНК, содержащая промотор VD, связанный с hPAH Codop2 (Codop2)	50			День 3
4	5		Codop2	50			День 7
5	5		Codop2	50			День 14
6	5		Codop2	50			День 21
7	5		Codop2	50			День 28
8	5		зкДНК, содержащая промотор hAAT, связанный с PAH мыши (mPAH)	50			День 3
9	5		зкДНК hAAT-mPAH	50			День 7
10	5		зкДНК hAAT-mPAH	50			День 14
11	5		зкДНК hAAT-mPAH	50			День 21
12	5		зкДНК hAAT-mPAH	50			День 28

№ = номер; в/в = внутривенно; ROA = путь введения; WT = дикий тип; KO = нокаут.

[00626] Кровь собирали в промежуточных и конечных временных точках, как показано в Таблицах 15А и 15В, соответственно.

Таблица 15А

5	Номер группы	Время сбора образцов цельной крови
		Хвост, подкожный или глазничный
		Сыворотка ^а
10	1-12	ГОЛОДАНИЕ День -2, 3, 7, 14 и 21 Если применимо до умерщвления
	Объем/Доля	~50 мкл цельной крови
	Обработка/Хранение	Одна (1) аликвота
Замороженные при номинальной температуре -70°C		

[00627] Цельную кровь собирали в пробирки для отделения сыворотки с активатором свертывания; MOV = максимальный доступный объем

Таблица 15В

15	Номер группы	Время сбора образцов	
		Сыворотка ^а	Печень
20	3 + 8	ГОЛОДАНИЕ: В День 3	
	4 + 9	ГОЛОДАНИЕ: В День 7	
	5 + 10	ГОЛОДАНИЕ: В День 14	
	6 + 11	ГОЛОДАНИЕ: В День 21	
	1, 2, 7, 12	ГОЛОДАНИЕ: В День 28	
	Объем/доля	MOV	Целый орган, разделенный
25	Обработка	Две (2) аликвоты (Pure Honey)	Левая доля печени, хранившаяся в 10% NBF (EPL) 2х куска по ~50 мг, не взвешенные и мгновенно замороженные по отдельности (Pure Honey)
			4х куска по ~25-50 мг, взвешенные и мгновенно замороженные по отдельности (Lake Pharma)
	Хранение	Замороженные при номинальной температуре -70°C	Фиксированные образцы, хранящиеся охлажденными Замороженные образцы, хранящиеся при номинальной температуре -70°C.

[00628] № = номер, NBF = нейтральный забуференный формалин

[00629] Детали исследования описаны далее:

[00630] Вид (количество, пол, возраст): 55 + 2 запасные мыши РАН^{enu2} (обою пола, возраст ~5-8 недель, подобранные по возрасту); 5 + 1 запасная мышь WT (обою пола, однопометники; подобранные по возрасту).

[00631] Класс соединения: ДНК в липидных наночастицах

[00632] Наблюдения за клеткой: Наблюдения за клеткой выполняли ежедневно.

[00633] Клинические наблюдения: Клинические наблюдения выполняли через ~1, ~6 и ~24 часа после введения дозы в День. Дополнительные наблюдения будут сделаны в качестве исключения.

[00634] Масса тела: Массу тела всех животных, если применимо, регистрировали в Дни -2, 0, 1, 2, 3, 7, 14, 21 и 28 (до умерщвления).

[00635] Лекарственная форма: Исследуемые препараты поставлялись в виде концентрированного исходного раствора. Исходный раствор разбавляли ФСБ, предоставленным Спонсором, непосредственно перед использованием.

[00636] Введение дозы: Исследуемые материалы для Групп 1-12 вводили в День 0 путем гидродинамического в/в введения в установленном объеме на животное, 90-100 мл/кг (в зависимости от самого легкого животного в группе) через латеральную хвостовую вену (введение дозы в течение 5 секунд).

[00637] Голодание перед сбором крови и вскрытием: Все животные (все группы)

голодали в течение минимум 4 часов перед всеми сборами крови и вскрытием: Дни -2, 3, 7, 14, 21 и 28.

5 [00638] Сбор крови: После каждого сбора животным подкожно вводили 0,5-1,0 мл раствора Рингера с лактатом. В Дни -2, 3, 7, 14 и 21 у животных будет собрана цельная кровь для получения сыворотки натошак. Были сделаны две (2) аликвоты. До отправки все образцы хранили при номинальной температуре -70°C.

[00639] Восстановление после анестезии: За животными непрерывно наблюдали, пока они находились под анестезией, во время восстановления и до восстановления подвижности.

10 [00640] Умерщвление и терминальный сбор крови: В День 28 после 4-часового голодания животных умерщвляли путем асфиксии в CO₂ с последующей торакотомией и обескровливанием. Максимальный доступный объем крови собирали с помощью сердечной пункции и обрабатывали для получения сыворотки в соответствии с СОП учреждения и хранили в двух (2) аликвотах.

15 [00641] Перфузия: После обескровливания всех животных подвергали перфузии сердца физиологическим раствором. В общих чертах, внутрисердечную перфузию всего тела выполняли путем введения иглы калибра 23/21, прикрепленной к 10 мл шприцу, содержащему физиологический раствор, в просвет левого желудочка для перфузии. Правое предсердие было рассечено, чтобы обеспечить дренажный выход для перфузата.
20 После того, как игла была помещена в сердце, к поршню прикладывали легкое и постоянное давление для перфузии животного. Адекватный поток промывочного раствора обеспечивали до тех пор, пока выходящий перфузат не станет прозрачным (без видимой крови), это указывает на то, что промывочный раствор насытил тело и процедура завершена.

25 [00642] Сбор ткани: Терминальные ткани собирали у агонирующих животных, которых умерщвляли до запланированной временной точки. При наличии возможности, собирали и сохраняли ткани животных, которые были найдены мертвыми.

[00643] После умерщвления и перфузии печень собирали. Из печени собирали два (2) среза по ~50 мг, но не взвешивали и мгновенно замораживали как можно скорее.
30 Затем собирали и взвешивали четыре (4) среза по ~25-50 мг (≤ 50 мг). Срезы мгновенно замораживали по отдельности и хранили при номинальной температуре -70°C до отправки.

[00644] Левую долю печени помещали в кассеты для гистологии, фиксировали в 10% NBF и охлаждали (~4°C). Ткань в 10% NBF хранили охлажденной (~4°C) до отправки
35 в герметичном контейнере на пакетах со льдом.

[00645] Вся оставшаяся печень будет выброшена.

[00646] Уровни фенилаланина (PHE): Образцы сыворотки анализировали с помощью Pure Honey для определения уровней PHE.

40 [00647] Уровни активности: Два (2) замороженных образца печени анализировали с помощью Pure Honey для определения уровней активности.

[00648] Результаты: Как показано на ФИГ. 14А-14В, ко дню 3 введение зкДНК, содержащей оптимизированный по кодонам вариант 2 РАН человека («Codop2»), привело к снижению уровней PHE в сыворотке, это указывает на достаточную активность РАН для коррекции уровней фенилаланина в крови при ФКУ мышей уже
45 на день 3.

Последовательности нуклеиновых кислот:

[00649] Последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей оптимизированный по кодонам вариант 2 РАН человека (зкДНК «hРАН Codop2»),

показана ниже. Промотор подчеркнут (SEQ ID NO: 191), а открытая рамка считывания (ORF) оптимизированного по кодонам варианта 2 РАН показана двойным подчеркиванием (SEQ ID NO: 382).

[00650] AAAGTAGCCGAAGATGACGGTTTGTACATGGAGTTGGCAGGATGTTTG
 5 ATAAAAACATAACAGGAAGAAAAATGCCCCGCTGTGGGCGGACAAAATAGTTGG
 GAACTGGGAGGGGTGGAAATGGAGTTTTTAAGGATTATTTAGGGAAGAGTGACAAA
 ATAGATGGGAACCTGGGTGTAGCGTCGTAAGCTAATACGAAAATTA AAAATGACAAA
 ATAGTTTGGAAC TAGATTTCACTTATCTGGTTCGGATCTCCTAGGCCTGCAGGCAGC
 TGC GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTTCGGGCGACC
 10 TTTGGTCCGCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAATC
 CATCACTAGGGGTTCCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCGCGGCC
 GCCGGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGGTCACCCAGTTATCGGAGGAGC
 AACAGGGGGCTAAGTCCACACGCGTGGTACCGTCTGTCTGCACATTTTCGTAGAGCG
 AGTGTTCGGATACTCTAATCTCCCTAGGCAAGGTT CATATTTGTGTAGGTTACTTATT
 15 CTCCTTTTGTGACTAAGTCAATAATCAGAATCAGCAGGTTTGGAGTCAGCTTGGCA
 GGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAAGGAGGGGGTATAAAAGCCCCTTCACCAGGAGA
 AGCCGTCACACAGATCCACAAGCTCCTGAAGAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGG
 TTGGTGGGGTATTAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTTCA
 GGTTGGTTTAAACCGCAGCCACCATGAGCACCGCCGTGCTGGAAAATCCTGGCCTG
 20 GGCAGAAAGCTGAGCGACTTCGGCCAAGAGACAAGCTACATCGAGGACA ACTGCA
 ACCAGAACGGCGCCATCAGCCTGATCTTCAGCCTGAAAGAAGAAGTGGGCGCCCTG
 GCCAAGGTGCTGAGACTGTTTCGAAGAGAACGACGTGAACCTGACACACATCGAGAG
 CAGACCCAGCAGACTGAAGAAGGACGAGTACGAGTTCTTCACCCACCTGGACAAGC
 GGAGCCTGCCTGCTCTGACCAACATCATCAAGATCCTGCGGCACGACATCGGGCGCC
 25 ACAGTGCACGA ACTGAGCCGGGACAAGAAAAAGGACACCCGTGCCATGGTTCCCCA
 GAACCATCCAAGAGCTGGACAGATTCGCCAACCAGATCCTGAGCTATGGCGCCGAG
 CTGGACGCTGATCACCCCTGGCTTTAAGGACCCCGTGTACCGGGCCAGAAGAAAGCA
 GTTTGCCGATATCGCCTACA ACTACCGGCACGGCCAGCCTATTCCTCGGGTCGAGTA
 CATGGAAGAGGAAAAGAAAACCTGGGGCACCGTGTTCAAGACCCTGAAGTCCCTGT
 30 ACAAGACCCACGCCTGCTACGAGTACAACCACATCTTCCCCTGCTCGAAAAGTAC
 TGCGGCTTCCACGAGGACAATATCCCTCAGCTTGAGGACGTGTCCAGTTCCCTGCAG
 ACCTGCACCGGCTTTAGACTGAGGCCAGTTGCCGGACTGCTGAGCAGCAGAGATTT
 TCTCGGCGGCCTGGCCTTCAGAGTGTTCCTACTGTACCCAGTACATCAGACACGGCAG
 CAAGCCCATGTACACCCTGAGCCTGATATCTGCCACGAGCTGCTGGGACATGTGCC
 35 CCTGTT CAGCGATAGAAGCTTCGCCCCAGTTCAGCCAAGAGATCGGACTGGCTTCTCT
 GGGAGCCCCTGACGAGTACATTGAGAAGCTGGCCACCATCTACTGGTTCACCGTGG
 AATTCGGCCTGTGCAAGCAGGGCGACAGCATCAAAGCTTATGGCGCTGGCCTGCTG
 TCTAGCTTTCGGCGAGCTGCAGTACTGTCTGAGCGAGAAGCCTAAGCTGCTGCCCTG
 GAACTGGAAAAGACCGCCATCCAGAACTACACCGTGACCGAGTTCCAGCCTCTGTA
 40 CTACGTGGCCGAGAGCTTCAACGACGCCAAAGAAAAGTGCGGAACTTCGCCGCCA
 CCATTCCTCGGCCTTTCAGCGTCAGATACGACCCCTACACACAGCGGATCGAGGTGC
 TGGACAACACACAGCAGCTGAAAATTTCTGGCCGACTCCATCAACAGCGAGATCGGC
 ATCCTGTGCAGCGCCCTGCAGAAAATCAAGTGATAGTTAATTAAGAGCATCTTACC
 GCCATTTATCCCATATTTGTTCTGTTTTTCTTGATTTGGGTATACATTTAAATGTTAA
 45 TAAAACAAAATGGTGGGGCAATCATTTACATTTTTAGGGATATGTAATTA ACTAGTTC
 AGGTGTATTGCCACAAGACAAACATGTTAAGAACTTTCCCGTTATTTACGCTCTGT
 TCCTGTTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGATATTCTTAA
 CTATGTTGCTCCTTTTACGCTGTGTGGATATGCTGCTTTATAGCCTCTGTATCTAGCT

ATTGCTTCCCGTACGGCTTTCGTTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCT
 TTTAGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTCAACGTGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTTGC
 TGACGCAACCCCACTGGCTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAACTCCTTTCTGGGAC
 TTTCGTTTTCCCCCTCCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCG
 5 CTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCTGGGCACTGATAATTCCGTGGTGTGTTGTCTGTGCC
 TTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAA
 GGTGCCACTCCCCTGTCTTTTCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTG
 AGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGG
 ATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTCTAGAG
 10 CATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACACCTGCAGGAG
 GAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAG
 GCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCG
 CGCAGCTGCCTGCAGGGGCGCGCCTCGAGCCATGGTGCTAGCAGCTGATGCATAGC
 ATGCGGTACCGGGAGATGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGAGACAATACCG
 15 GAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGGTGTT
 GGGTCGTTTGTTCATAAACGCGGGGTTCGGTCCCAGGGCTGGCACTCTGTTCGATACC
 CCACCGAGACCCATTGGGACCAATACGCCCGCGTTTCTTCCTTTTCCCAACCCCAA
 CCCCCAAGTTCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTGGGGCGGCAAGCCC
 TGCCATAGCCACTACGGGTACGTAGGCCAACCACTAGA ACTATAGCTAGAGTCCTG
 20 GGCGAACAAACGATGCTCGCCTTCCAGAAAACCGAGGATGCCAACCACTTCATCCG
 GGGTCAGCACCACCGGCAAGCGCCGCGACGGCCGAGGTCTACCGATCTCCTGAAGC
 CAGGGCAGATCCGTGCACAGCACCTTGCCGTAGAAGAACAGCAAGGCCGCCAATGC
 CTGACGATGCGTGGAGACCGAAACCTTGCCTCGTTCGCCAGCCAGGACAGAAATG
 CCTCGACTTCGCTGCTGCCCAAGGTTGCCGGGTGACGCACACCGTGGAACGGATG
 25 AAGGCACGAACCCAGTTGACATAAGCCTGTTTCGGTTCGTA AACTGTAATGCAAGTA
 GCGTATGCGCTCACGCAACTGGTCCAGAACCTTGACCGAACGCAGCGGTGGTAACG
 GCGCAGTGGCGGTTTTTCATGGCTTGTTATGACTGTTTTTTTGTACAGTCTATGCCTCG
 GGCATCCAAGCAGCAAGCGCGTTACGCCGTGGGTGCGATGTTTGATGTTATGGAGCA
 GCAACGATGTTACGCAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAC
 30 AAAGTTAGGTGGCTCAAGTATGGGCATCATTCGCACATGTAGGCTCGGCCCTGACC
 AAGTCAAATCCATGCGGGCTGCTCTTGATCTTTTCGGTTCGTGAGTTCGGAGACGTAG
 CCACCTACTCCCAACATCAGCCGACTCCGATTACCTCGGGA ACTTGCTCCGTAGTA
 AGACATTCATCGCGCTTGCTGCCTTCGACCAAGAAGCGGTTGTTGGCGCTCTCGCGG
 CTTACGTTCTGCCAGGTTTGAGCAGCCGCGTAGTGAGATCTATATCTATGATCTCG
 35 CAGTCTCCGGCGAGCACC GGAGGCAGGGCATTGCCACCGCGCTCATCAATCTCCTC
 AAGCATGAGGCCAACGCGCTTGGTGCTTATGTGATCTACGTGCAAGCAGATTACGG
 TGACGATCCCGCAGTGGCTCTCTATACAAAGTTGGGCATACGGGAAGAAGTGATGC
 ACTTTGATATCGACCCAAGTACCGCCACCTAACAAATTCGTTCAAGCCGAGATCGGCT
 TCCCGGCCGCGGAGTTGTTTCGGTAAATTGTCACAACGCCGCGAATATAGTCTTTACC
 40 ATGCCCTTGGCCACGCCCTCTTTAATACGACGGGCAATTTGCACTTCAGAAAATGA
 AGAGTTTGCTTTAGCCATAACAAAAGTCCAGTATGCTTTTTTCACAGCATAACTGGAC
 TGATTCAGTTTACA ACTATTCTGTCTAGTTTAAGACTTTATTGTCATAGTTTAGATC
 TATTTTGTTCAGTTTAAGACTTTATTGTCCGCCACACCCGCTTACGCAGGGCATCCA
 TTTATTACTCAACCGTAACCGATTTTGCCAGGTTACGCGGCTGGTCTGCGGTGTGAA
 45 ATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCCTC
 GCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGTTTCGGCTGCGGGCAGCGGTATCAGCTCACTC
 AAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGA ACATG
 TGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGT

TTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGA
 GGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCC
 CTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCC
 CTTCCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGT
 5 AGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCT
 GCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGC
 CACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCT
 ACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGG
 TATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATC
 10 CGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTAC
 GCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACG
 CTCAGTGGAACGAAAACACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGG
 ATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATA
 TATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCA
 15 GCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTA
 CGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCA
 CGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCG
 CAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGA
 AGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTAC
 20 AGGCATCGTGGTGTACGCTCGTTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCA
 ACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCT
 TCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTACTCATGGTTA
 TGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGAC
 TGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTC
 25 TTGCCC GGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGA ACTTTAAAAGTGC
 TCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGA
 GATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCA ACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTT
 CACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAATGCCGCAAAAAGGGA
 ATAAGGGCGACACGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGA
 30 AGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTAGAAA
 AATAACAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGAAATTGT
 AACGTTAATATTTTGTAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTT
 AACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAAGAATAGACCGAGAT
 AGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACT
 35 CCAACGTCAAAGGGCGAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCA
 TCACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTTCGAGGTGCCGTAAGCACTAAATCGGAACCCT
 AAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAA
 AGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGT
 CACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGT
 40 CCCATTCGCCATTCAGGCTGCAAATAAGCGTTGATATTCAGTCAATTACAAACATTA
 ATAACGAAGAGATGACAGAAAAATTTTCATTCTGTGACAGAGAA (SEQ ID NO: 192)

[00651] Конструкция зкДНК выше включает левый-I TR_v1:спейсер_левый-I TR_v2.1:
 VandenDriessche_Набор промоторов: Сайт_PmeI: Модифицированный_минимальный
 _консенсус_Козак: hPAH_codop_ORF_v2: Сайт_PacI: WPRE_3pUTR: bGH/спейсер:
 45 спейсер_правый-I TR_v1:правый-I TR_v1

[00652] В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность
 нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей оптимизированный по кодонам вариант 2
 PAH человека (зкДНК «hPAH Codop2»), содержит SEQ ID NO: 192. В соответствии с

некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей оптимизированный по кодонам вариант 2 РАН человека (зкДНК «hРАН Codop2»), по меньшей мере на 85% идентична SEQ ID NO: 192. В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей оптимизированный по кодонам вариант 2 РАН человека (зкДНК «hРАН Codop2»), по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 192. В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей оптимизированный по кодонам вариант 2 РАН человека (зкДНК «hРАН Codop2»), по меньшей мере на 91% идентична SEQ ID NO: 192. В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей оптимизированный по кодонам вариант 2 РАН человека (зкДНК «hРАН Codop2»), по меньшей мере на 92% идентична SEQ ID NO: 192. В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей оптимизированный по кодонам вариант 2 РАН человека (зкДНК «hРАН Codop2»), по меньшей мере на 93% идентична SEQ ID NO: 192. В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей оптимизированный по кодонам вариант 2 РАН человека (зкДНК «hРАН Codop2»), по меньшей мере на 94% идентична SEQ ID NO: 192. В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей оптимизированный по кодонам вариант 2 РАН человека (зкДНК «hРАН Codop2»), по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 192. В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей оптимизированный по кодонам вариант 2 РАН человека (зкДНК «hРАН Codop2»), по меньшей мере на 96% идентична SEQ ID NO: 192. В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей оптимизированный по кодонам вариант 2 РАН человека (зкДНК «hРАН Codop2»), по меньшей мере на 97% идентична SEQ ID NO: 192. В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей оптимизированный по кодонам вариант 2 РАН человека (зкДНК «hРАН Codop2»), по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 192. В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей оптимизированный по кодонам вариант 2 РАН человека (зкДНК «hРАН Codop2»), по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 192. В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей оптимизированный по кодонам вариант 2 РАН человека (зкДНК «hРАН Codop2»), состоит из SEQ ID NO: 192.

[00653] Последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей кДНК РАН человека (промотор VD зкДНК, связанный с кДНК hРАН без оптимизации кодонов), показана ниже. Промотор подчеркнут (SEQ ID NO: 191), а открытая рамка считывания (ORF) РАН показана двойным подчеркиванием (SEQ ID NO: 394).

[00654] GGCCGGCCCCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCC
GGGCAAAGCCCCGGGCGTTCGGGCGACSTTTGGTTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGA
GCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTTCCTTGTAGTTAATGAT
ТААСССГССАТГСТАСТТАТСТАСГТАГССАТГСТСТАГАСГГГГГАГГСТГСТГГТ
GAATATTAACCAAGGTCACCCAGTTATCGGAGGAGCAAACAGGGGCTAAGTCCAC
ACGCGTGGTACCGTCTGTCTGCACATTTTCGTAGAGCGAGTGTTCGATACTСТААТС
TCCСТАГГСААГГТТАТАТТТГТГТАГГТТАСТТАТТСТССТТТТГТТГАСТААГТС
AATAATCAGAATCAGCAGGTTTGGAGTCAGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTT

GGAAGGAGGGGGTATAAAAGCCCCTTCACCAGGAGAAGCCGTCACACAGATCCAC
AAGCTCCTGAAGAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATTAATGTT
TAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTTTTCAGGTTGGTTTAAACGCCGC
CACCATGTCCACTGCGGTCTGGAAAACCCAGGCTTGGGCAGGAACTCTCTGACT
5 TTGGACAGGAAACAAGCTATATTGAAGACAACCTGCAATCAAATGGTGCCATATCA
CTGATCTTCTCACTCAAAGAAGAAGTTGGTGCATTGGCCAAAGTATTGCGCTTATTT
GAGGAGAATGATGTAACCTGACCCACATTGAATCTAGACCTTCTCGTTTAAAGAA
AGATGAGTATGAATTTTTACCCATTTGGATAAACGTAGCCTGCCTGCTCTGACAAA
CATCATCAAGATCTTGAGGCATGACATTGGTGCCACTGTCCATGAGCTTTCACGAGA
10 TAAGAAGAAAGACACAGTGCCCTGGTTCCCAAGAACCATTCAAGAGCTGGACAGAT
TTGCCAATCAGATTCTCAGCTATGGAGCGGAACTGGATGCTGACCACCCTGGTTTAA
AAGATCCTGTGTACCGTGCAAGACGGAAGCAGTTTGCTGACATTGCCTACAACACTAC
CGCCATGGGCAGCCCATCCCTCGAGTGGAATACATGGAGGAAGAAAAGAAAACAT
GGGGCACAGTGTTCAAGACTCTGAAGTCCTTGTATAAAACCCATGCTTGCTATGAGT
15 ACAATCACATTTTTCCACTTCTTGAAGTACTGTGGCTTCCATGAAGATAACATTC
CCCAGCTGGAAGACGTTTCTCAGTTCCTGCAGACTTGCCTGGTTTCCGCCTCCGAC
CTGTGGCTGGCCTGCTTTCCTCTCGGGATTTCTTGGGTGGCCTGGCCTTCCGAGTCTT
CCACTGCACACAGTACATCAGACATGGATCCAAGCCCATGTATACCCCCGAACCTG
ACATCTGCCATGAGCTGTTGGGACATGTGCCCTTGTTTTAGATCGCAGCTTTGCCC
20 AGTTTTCCAGGAAATTGGCCTTGCCCTCTCTGGGTGCACCTGATGAATACATTGAAA
AGCTCGCCACAATTTACTGTTTTACTGTGGAGTTTGGGCTCTGCAAACAAGGAGACT
CCATAAAGGCATATGGTGCTGGGCTCCTGTATCCTTTGGTGAATTACAGTACTGCT
TATCAGAGAAGCCAAAGCTTCTCCCCCTGGAGCTGGAGAAGACAGCCATCCAAAAT
TACACTGTCACGGAGTCCAGCCCCTCTATTACGTGGCAGAGAGTTTTAATGATGCC
25 AAGGAGAAAGTAAGGAACCTTGTGTCACAATACCTCGGCCCTTCTCAGTTCGCTAC
GACCCATACACCCAAAGGATTGAGGTCTTGGACAATACCCAGCAGCTTAAGATTTT
GGCTGATTCCATTAACAGTGAAATTGGAATCCTTTGCAGTGCCCTCCAGAAAATAAA
GTAATTAATTAAGAGCATCTTACCGCCATTTATTCCCATATTTGTTCTGTTTTTCTTG
ATTTGGGTATACATTTAAATGTTAATAAAAACAAAATGGTGGGGCAATCATTTACATT
30 TTTAGGGATATGTAATTAAGTTCAGGTGTATTGCCACAAGACAAACATGTTAAGA
AACTTTCCCGTTATTTACGCTCTGTTTCTGTTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTG
TGAAAGATTGACTGATATTCTTA ACTATGTTGCTCCTTTTACGCTGTGTGGATATGCT
GCTTTATAGCCTCTGTATCTAGCTATTGCTTCCCGTACGGCTTTCGTTTTCTCCTCCTT
GTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTTAGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTCAACG
35 TGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTTGTGACGCAACCCCCACTGGCTGGGGCATTGCCAC
CACCTGTCAACTCCTTCTGGGACTTTCGCTTTCCTCCCTCCCGATCGCCACGGCAGA
ACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCTGGGCACTGA
TAATTCGGTGGTGTGCTGTGCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCC
CCCGTGCTTCCCTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCTTTTCTAATAAAAT
40 GAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTG
GGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATG
CGGTGGGCTCTATGGCTCTAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCAGGGTTA
ATCATTAACTACACCTGCAGGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTC
TGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAGGTGCGCCGACGCCCGGGC
45 GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGCGCGCCTCGAGGCATG
CGGTACCAAGCTTGTGCGAGAAGTACTAGAGGATCATAATCAGCCATACCACATTTG
TAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATA
AAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAAT

AAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTT
GTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCTGATCACTGATATC
GCCTAGGAGATCCGAACCAGATAAGTGAAATCTAGTTCCAAACTATTTTGTCAATTT
TAATTTTCGTATTAGCTTACGACGCTACACCCAGTTCCCATCTATTTTGTCACTCTTC
5 CCTAAATAATCCTTAAAAACTCCATTTCCACCCCTCCCAGTTCCCAACTATTTTGTCC
GCCACAGCGGGGCATTTTTCTTCTGTTATGTTTTTAATCAAACATCCTGCCAACTC
CATGTGACAAACCGTCATCTTCGGCTACTTTTTCTCTGTACACAGAATGAAAATTTTC
TGTCATCTCTTCGTTATTAATGTTTGTAAATTGACTGAATATCAACGCTTATTTGCAGC
CTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGGCGCATTAAAGCGCGGGCGGGTGTGGT
10 GGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGC
TTTCTTCCCTTCCCTTTCTCGCCACGTTCCGCCGGCTTTCCCCGTCAGCTCTAAATCGG
GGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTT
GATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCT
TTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACCTGGAACAACA
15 CTCAACCCATATCTCGGTCTATTCCTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCT
ATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATA
TTAACGTTTACAATTTTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATT
TGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGA
TAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTC
20 GCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGC
TGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAA
CTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCA
ATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCC
GGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTA
25 CTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCA
GTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCG
GAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGC
CTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACAC
CACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTAC
30 TTA CTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCA
GGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGA
GCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCC
CTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAA
ATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACCTGTCAGAC
35 CAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTTAATTTAAAAGGA
TCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTT
CGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTT
TTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGG
TTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCA
40 GAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCA
AGA ACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTG
CTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCG
GATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGA
GCGAACGACCTACACCGA ACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCA
45 CGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAAC
AGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCTG
TCGGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGC
GGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCT

GGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTAT
 TACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCG
 AGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCAT
 CTGTGCGGTATTTACACCGCAGACCAGCCGCGTAACCTGGCAAATCGGTTACGG
 5 TTGAGTAATAAATGGATGCCCTGCGTAAGCGGGTGTGGGCGGACAATAAAGTCTTA
 AACTGAACAAAATAGATCTAAACTATGACAATAAAGTCTTAAACTAGACAGAATAG
 TTGTAAACTGAAATCAGTCCAGTTATGCTGTGAAAAGCATACTGGACTTTTGTAT
 GGCTAAAGCAAACCTTTCATTTTCTGAAGTGCAAATTGCCCGTCGTATTAAGAGGG
 GCGTGCCAAAGGGCATGGTAAAGACTATATTCGCGGCGTGTGACAATTTACCGAA
 10 CAACTCCGCGGCGGGAAGCCGATCTCGGCTTGAACGAATTGTTAGGTGGCGGTAC
 TTGGGTTCGATATCAAAGTGCATCACTTCTTCCCGTATGCCCAACTTTGTATAGAGAG
 CCACTGCGGGATCGTCACCGTAATCTGCTTGCACGTAGATCACATAAGCACCAAGC
 GCGTTGGCCTCATGCTTGAGGAGATTGATGAGCGCGGTGGCAATGCCCTGCCTCCG
 GTGCTCGCCGGAGACTGCGAGATCATAGATATAGATCTCACTACGCGGCTGCTCAA
 15 ACCTGGGCAGAACGTAAGCCGCGAGAGCGCCAACAACCGCTTCTTGGTTCGAAGGCA
 GCAAGCGCGATGAATGTCTTACTACGGAGCAAGTTCGAGGTAATCGGAGTCCGG
 CTGATGTTGGGAGTAGGTGGCTACGTCTCCGAACTCACGACCGAAAAGATCAAGAG
 CAGCCCGCATGGATTTGACTTGGTCAGGGCCGAGCCTACATGTGCGAATGATGCC
 ATACTTGAGCCACCTAACTTTGTTTTAGGGCGACTGCCCTGCTGCGTAAACATCGTTG
 20 CTGCTGCGTAAACATCGTTGCTGCTCCATAACATCAAACATCGACCCACGGCGTAACG
 CGCTTGTGCTTGGATGCCCGAGGCATAGACTGTACAAAAAACAGTCATAACAAG
 CCATGAAAACCGCCACTGCGCCGTTACCACCGCTGCGTTCGGTCAAGGTTCTGGACC
 AGTTGCGTGAGCGCATACGCTACTTGCATTACAGTTTACGAACCGAACAGGCTTATG
 TCAACTGGGTTTCGTGCCTTCATCCGTTTCCACGGTGTGCGTCACCCGGCAACCTTGG
 25 GCAGCAGCGAAGTCGAGGCATTTCTGTCCTGGCTGGCGAACGAGCGCAAGGTTTCG
 GTCTCCACGCATCGTCAGGCATTGGCGGCCCTTGTGTTCTTCTACGGCAAGGTGCTG
 TGCACGGATCTGCCCTGGCTTCAGGAGATCGGAAGACCTCGGCCGTCGCGGCGCTT
 GCCGGTGGTGTGACCCCGGATGAAGTGGTTCGCATCCTCGGTTTTCTGGAAGGCGA
 GCATCGTTTTGTTCCGCCAGGACTCTAGCTATAGTTCTAGTGGTTGGCTACGTATACT
 30 CCGGAATATTAATAGATCATGGAGATAATTAATAAATGATAACCATCTCGCAAATAAA
 TAAGTATTTTACTGTTTTTCGTAACAGTTTTGTAATAAAAAAACCTATAAATATTCG
 GATTATTCATACCGTCCCACCATCGGGCGCGGATCTCGGTCCGAAACCATGTTCGTAC
 TACCATCACCATCACCATCACGATTACGATATCCCAACGACCGAAAACCTGTATTTT
 CAGGGCGCCATGGGATCC (SEQ ID NO: 193)

35 [00655] Конструкция выше включает следующие элементы. Левый-ITR_v1:
 спейсер_левый-ITR_v1: VandenDriessche_Набор промоторов: Сайт_PmeI: Консенсус_К
 озак:hPAH_кДНК_ORF_v3: Сайт_PacI: WPRE_3pUTR:bGH:спейсер_правый-ITR_v1:
 правый-ITR_v1.

40 [00656] В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность
 нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей кДНК PAH человека (промотор VD зкДНК,
 связанный с кДНК hPAH без оптимизации кодонов), содержит SEQ ID NO: 193. В
 соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой
 кислоты зкДНК, содержащей кДНК PAH человека (промотор VD зкДНК, связанный
 с кДНК hPAH без оптимизации кодонов), по меньшей мере на 85% идентична SEQ ID
 45 NO: 193. В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность
 нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей кДНК PAH человека (промотор VD зкДНК,
 связанный с кДНК hPAH без оптимизации кодонов), по меньшей мере на 90% идентична
 SEQ ID NO: 193. В соответствии с некоторыми вариантами реализации

последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей кДНК РАН человека (промотор VD зкДНК, связанный с кДНК hРАH без оптимизации кодонов), по меньшей мере на 91% идентична SEQ ID NO: 193. В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей кДНК РАН человека (промотор VD зкДНК, связанный с кДНК hРАH без оптимизации кодонов), по меньшей мере на 92% идентична SEQ ID NO: 193. В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей кДНК РАН человека (промотор VD зкДНК, связанный с кДНК hРАH без оптимизации кодонов), по меньшей мере на 93% идентична SEQ ID NO: 193. В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей кДНК РАН человека (промотор VD зкДНК, связанный с кДНК hРАH без оптимизации кодонов), по меньшей мере на 94% идентична SEQ ID NO: 193. В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей кДНК РАН человека (промотор VD зкДНК, связанный с кДНК hРАH без оптимизации кодонов), по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 193. В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей кДНК РАН человека (промотор VD зкДНК, связанный с кДНК hРАH без оптимизации кодонов), по меньшей мере на 96% идентична SEQ ID NO: 193. В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей кДНК РАН человека (промотор VD зкДНК, связанный с кДНК hРАH без оптимизации кодонов), по меньшей мере на 97% идентична SEQ ID NO: 193. В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей кДНК РАН человека (промотор VD зкДНК, связанный с кДНК hРАH без оптимизации кодонов), по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 193. В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей кДНК РАН человека (промотор VD зкДНК, связанный с кДНК hРАH без оптимизации кодонов), по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 193. В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей кДНК РАН человека (промотор VD зкДНК, связанный с кДНК hРАH без оптимизации кодонов), состоит из SEQ ID NO: 193.

[00657] Последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей оптимизированный по кодонам вариант 4 hРАH (РАH человека с минимизацией CpG и оптимизацией кодонов), показана ниже. Промотор подчеркнут (SEQ ID NO: 191), а открытая рамка считывания (ORF) оптимизированного по кодонам варианта 4 hРАH показана двойным подчеркиванием (SEQ ID NO: 384).

[00658] GGCCGGCCCCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCC
 GGGCAAAGCCC GGGCGTCCGGGCGACCTTTGGTCCGCCGCTCAGTGAGCGAGCGA
 GCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCA ACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGAT
 40 TAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCTCTAGACGGGGGAGGCTGCTGGT
 GAATATTAACCAAGGTCACCCAGTTATCGGAGGAGCAAACAGGGGCTAAGTCCAC
 ACGCGTGGTACCGTCTGTCTGCACATTTTCGTAGAGCGAGTGTTCGGATACTCTAATC
 TCCCTAGGCAAGGTTCAATTTGTGTAGGTTACTTATCTCCTTTTGTGACTAAGTC
 AATAATCAGAATCAGCAGGTTTGGAGTCAGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTT
 45 GGAAGGAGGGGGTATAAAAGCCCCTTACCAGGAGAAGCCGTCACACAGATCCAC
 AAGCTCCTGAAGAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATTAATGTT
 TAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTTCAGGTTGGTTTAAACGCCGC
 CACCATGAGTACAGCTGTGCTTGAAAATCCTGGCCTGGGCAGGAAGCTTAGTGACT

TTGGCCAGGAAACATCTTATATTGAAGACA ACTGCAACCAGAATGGTGCCATTTCTC
TTATCTTCTCCCTGAAAGAAGAGGTGGGAGCCCTGGCAAAGGTTTTAAGGCTCTTTG
AGGAGAATGATGTGAATTTGACACACATTGAGTCCAGGCCTTCTAGACTCAAGAAA
GATGAATATGAGTTCTTCACCCACCTGGACAAGAGGAGTCTCCCTGCTCTGACCAAC
5 ATTATCAAGATCTTGAGACATGATATAGGAGCTACAGTGCATGAACTTTCAAGGGA
TAAAAAGAAGGACACTGTCCCCTGGTTTCCCAGA ACTATCCAAGAATTAGACAGGT
TTGCCAATCAGATCCTGAGCTATGGTGCAGAAATTAGATGCAGACCACCCTGGGTTTA
AAGACCCTGTGTATAGAGCCAGAAGAAAGCAGTTTGCTGACATTGCATACTACTAC
AGGCATGGGCAGCCCATTCTAGGGTGGAGTACATGGAGGAAGAAAAAAGACCT
10 GGGGCACAGTTTTCAAGACCCTGAAGAGCCTTTACAAGACACATGCCTGCTATGAA
TATAACCATATATTTCCATTGTTGGAGAAATACTGTGGATTTTCATGAAGATAACATC
CCCCAGCTGGAGGATGTTAGTCAGTTTCTGCAGACCTGCACAGGCTTTAGACTGAGG
CCAGTTGCAGGACTGCTAAGTTCTAGGGACTTCTGGGGTGGGCTAGCCTTCAGAGTG
TTCCACTGTACCCAATATATAAGGCATGGATCCAAGCCCATGTACACCCTGAGCCT
15 GATATCTGCCATGAGCTATTGGGCCATGTCCCCCTATTTTCTGACAGAAGCTTTGCC
CAGTTCTCCAGGAGATTGGATTAGCCTCTCTGGGAGCTCCTGATGAGTACATTGAG
AAGTTAGCAACCATCTACTGGTTCAGTGTGGAATTTGGCCTTTGCAAACAAGGGGAT
AGTATAAAGGCTTATGGAGCAGGTCTGCTTAGCAGTTTTGGAGAGCTGCAGTACTG
CCTGTCAGAAAAGCCAAAGCTCCTACCATTAGAACTAGAAAAGACTGCCATCCAGA
20 ACTATACAGTCACTGAATTCCAGCCTCTCTACTATGTGGCTGAGTCTTTCAATGATG
CCAAGGAGAAGGTGAGAAATTTGACAGCCACCATTCCCAGGCCCTTCTCTGTTAGAT
ATGACCCTTACACTCAGAGGATTGAGGTCTGGACAATACCCAGCAACTAAAAATT
CTGGCTGATTCCATTAATTCTGAAATTGGCATCCTCTGCTCTGCTCTCCAGAAGATTA
AATGATTAATTAAGAGCATCTTACCGCCATTTATCCCATATTTGTTCTGTTTTTCTT
25 GATTTGGGTATACATTTAAATGTTAATAAAAACAAAATGGTGGGGCAATCATTTACAT
TTTTAGGGATATGTAATTACTAGTTCAGGTGTATTGCCACAAGACAAACATGTTAAG
AACTTTCCCGTTATTTACGCTCTGTTCCCTGTTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTT
GTGAAAGATTGACTGATATTCTTA ACTATGTTGCTCCTTTTACGCTGTGTGGATATGC
TGCTTTATAGCCTCTGTATCTAGCTATTGCTTCCCGTACGGCTTTCGTTTTCTCCTCCT
30 TGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTTAGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTCAAC
GTGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTTGTGACGCAACCCCCACTGGCTGGGGCATTGCCA
CCACCTGTCAACTCCTTTCTGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCGATCGCCACGGCAGA
ACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCTGGGCACTGA
TAATTCGGTGGTGTGTTGTCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCC
35 CCCGTGCCTTCCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTTCCCTAATAAAAT
GAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTG
GGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATG
CGGTGGGCTCTATGGCTCTAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCAGGGTTA
ATCATTAACTACACCTGCAGGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTC
40 TGC GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCGCCGACGCCCGGGC
GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGCGCGCCTCGAGGCATG
CGGTACCAAGCTTGTGCGAGAAGTACTAGAGGATCATAATCAGCCATACCACATTTG
TAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATA
AAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTATTGTCAGCTTATAATGGTTACAAAT
45 AAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTT
GTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCTGATCACTGATATC
GCCTAGGAGATCCGAACCAGATAAGTGAAATCTAGTTCCAAACTATTTTGTCAATTT
TAATTTTCGTATTAGCTTACGACGCTACACCCAGTTCCCATCTATTTTGTCACTCTTC

CCTAAATAATCCTTAAAAACTCCATTTCCACCCCTCCCAGTTCCCAACTATTTTGTCC
GCCACAGCGGGGCATTTTTCTTCTGTTATGTTTTTAATCAAACATCCTGCCAACTC
CATGTGACAAACCGTCATCTTCGGCTACTTTTTCTCTGTACAGAATGAAAATTTTTTC
TGTCATCTCTTCGTTATTAATGTTTGTAAATTGACTGAATATCAACGCTTATTTGCAGC
5 CTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGCGGGTGTGGT
GGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGC
TTTCTTCCCTTCCCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGG
GGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTT
GATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCT
10 TTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTCCAAACTGGAACAACA
CTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCT
ATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAAACAAAATA
TTAACGTTTACAATTTACAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATT
TGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGA
15 TAAATGCTTCAATAAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTC
GCCCTTATTCCCTTTTTTTCGCGCATTTTGCCTTCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGC
TGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAA
CTGGATCTCAACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCA
ATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCC
20 GGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTA
CTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCA
GTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCG
GAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTA ACTCGC
CTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACAC
25 CACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAA ACTATTA ACTGGCGAACTAC
TACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCA
GGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGA
GCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCC
CTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAA
30 ATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTA ACTGT CAGAC
CAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAA ACTTCA TTTTTAATTTAAAAGGA
TCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACTGTGAGTTTT
CGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTT
TTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGG
35 TTTGTTTGC CGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTA ACTGGCTT CAGCA
GAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCA
AGA ACTCTGTAGCACC GCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTG
CTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTGCTTACC GG GTTGACTCAAGACGATAGTTACCG
GATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGA
40 GCGAACGACCTACACCGA ACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCA
CGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAAC
AGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTG
TCGGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGC
GGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTTGCT
45 GGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTAT
TACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCG
AGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCAT
CTGTGCGGTATTTACACCGCAGACCAGCCGCGTAACCTGGCAAATCGGTTACGG

TTGAGTAATAAATGGATGCCCTGCGTAAGCGGGTGTGGGCGGACAATAAAGTCTTA
 AACTGAACAAAATAGATCTAAACTATGACAATAAAGTCTTAAACTAGACAGAATAG
 TTGTAAACTGAAATCAGTCCAGTTATGCTGTGAAAAGCATACTGGACTTTTGTAT
 GGCTAAAGCAAACCTTTCATTTTTCTGAAGTGCAAATTGCCCGTCGTATTAAGAGGGG
 5 GCGTGGCCAAGGGCATGGTAAAGACTATATTCGCGGCGTGTGACAATTTACCGAA
 CAACTCCGCGGCCGGGAAGCCGATCTCGGCTTGAACGAATTGTTAGGTGGCGGTAC
 TTGGGTTCGATATCAAAGTGCATCACTTCTTCCCCTATGCCCAACTTTGTATAGAGAG
 CCACTGCGGGATCGTCACCGTAATCTGCTTGCACGTAGATCACATAAGCACCAAGC
 GCGTTGGCCTCATGCTTGAGGAGATTGATGAGCGCGGTGGCAATGCCCTGCCTCCG
 10 GTGCTCGCCGGAGACTGCGAGATCATAGATATAGATCTCACTACGCGGCTGCTCAA
 ACCTGGGCAGAACGTAAGCCGCGAGAGCGCCAACAACCGCTTCTTGGTTCGAAGGCA
 GCAAGCGCGATGAATGTCTTACTACGGAGCAAGTTCCCGAGGTAATCGGAGTCCGG
 CTGATGTTGGGAGTAGGTGGCTACGTCTCCGAACCTCACGACCGAAAAGATCAAGAG
 CAGCCCGCATGGATTTGACTTGGTCAGGGCCGAGCCTACATGTGCGAATGATGCCC
 15 ATACTTGAGCCACCTAACTTTGTTTTAGGGCGACTGCCCTGCTGCGTAACATCGTTG
 CTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTCCATAACATCAAACATCGACCCACGGCGTAACG
 CGCTTGCTGCTTGGATGCCCGAGGCATAGACTGTACAAAAAACAGTCATAACAAG
 CCATGAAAACCGCCACTGCGCCGTTACCACCGCTGCGTTCGGTCAAGGTTCTGGACC
 AGTTGCGTGAGCGCATACGCTACTTGCAATACAGTTTACGAACCGAACAGGCTTATG
 20 TCAACTGGGTTTCGTGCCTTCATCCGTTTCCACGGTGTGCGTACCCGGCAACCTTGG
 GCAGCAGCGAAGTCGAGGCATTTCTGTCTTGGCTGGCGAACGAGCGCAAGGTTTCG
 GTCTCCACGCATCGTCAGGCATTGGCGGCCCTTGGCTGTTCTTCTACGGCAAGGTGCTG
 TGCACGGATCTGCCCTGGCTTCAGGAGATCGGAAGACCTCGGCCGTCGCGGCGCTT
 GCCGGTGGTGTGACCCCGGATGAAGTGGTTCGCATCCTCGGTTTTCTGGAAGGCGA
 25 GCATCGTTTTGTTTCGCCAGGACTCTAGCTATAGTTCTAGTGGTGGCTACGTATACT
 CCGGAATATTAATAGATCATGGAGATAATTAATAATGATAACCATCTCGCAAATAAA
 TAAGTATTTTACTGTTTTTCGTAACAGTTTTGTAATAAAAAACCTATAAATATTCGG
 GATTATTCATACCGTCCCACCATCGGGCGCGGATCTCGGTCCGAAACCATGTTCGTAC
 TACCATACCATCACCATCACGATTACGATATCCCAACGACCGAAAACCTGTATTTT
 30 CAGGGCGCCATGGGATCC (SEQ ID NO: 194)

[00659] Конструкция выше включает левый-ITR_v1:спейсер_левый-ITR_v1:
 VandenDriessche_Набор промоторов: Сайт_PmeI: Консенсус_Козак: hPAH_CpGmin-
 codop_ORF_v4: Сайт_PacI: WPRE_3pUTR:bGH:спейсер_правый-ITR_v1:правый-ITR_v1.

[00660] В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность
 35 нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей вариант 4 hPAH (PAH человека с
 минимизацией CpG и оптимизацией кодонов), содержит SEQ ID NO: 194. В соответствии
 с некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК,
 содержащей вариант 4 hPAH (PAH человека с минимизацией CpG и оптимизацией
 кодонов), по меньшей мере на 85% идентична SEQ ID NO: 194. В соответствии с
 40 некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК,
 содержащей вариант 4 hPAH (PAH человека с минимизацией CpG и оптимизацией
 кодонов), по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 194. В соответствии с
 некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК,
 содержащей вариант 4 hPAH (PAH человека с минимизацией CpG и оптимизацией
 45 кодонов), по меньшей мере на 91% идентична SEQ ID NO: 194. В соответствии с
 некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК,
 содержащей вариант 4 hPAH (PAH человека с минимизацией CpG и оптимизацией
 кодонов), по меньшей мере на 92% идентична SEQ ID NO: 194. В соответствии с

некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей вариант 4 hРАН (РАН человека с минимизацией CpG и оптимизацией кодонов), по меньшей мере на 93% идентична SEQ ID NO: 194. В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей вариант 4 hРАН (РАН человека с минимизацией CpG и оптимизацией кодонов), по меньшей мере на 94% идентична SEQ ID NO: 194. В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей вариант 4 hРАН (РАН человека с минимизацией CpG и оптимизацией кодонов), по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 194. В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей вариант 4 hРАН (РАН человека с минимизацией CpG и оптимизацией кодонов), по меньшей мере на 96% идентична SEQ ID NO: 194. В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей вариант 4 hРАН (РАН человека с минимизацией CpG и оптимизацией кодонов), по меньшей мере на 97% идентична SEQ ID NO: 194. В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей вариант 4 hРАН (РАН человека с минимизацией CpG и оптимизацией кодонов), по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 194. В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей вариант 4 hРАН (РАН человека с минимизацией CpG и оптимизацией кодонов), по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 194. В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность нуклеиновой кислоты зкДНК, содержащей вариант 4 hРАН (РАН человека с минимизацией CpG и оптимизацией кодонов), состоит из SEQ ID NO: 194.

ССЫЛКИ

[00661] Все публикации и ссылки, включая, но не ограничиваясь перечисленными, патенты и заявки на патенты, указанные в данном описании и в Примерах в данном документе, полностью включены посредством ссылки, как если бы каждая отдельная публикация или ссылка была конкретно и по отдельности указана для включения в данный документ посредством ссылки во всей полноте. Любая заявка на патент, согласно которой настоящая заявка испрашивает приоритет, также включена в данный документ посредством ссылки способом, описанным выше для публикаций и ссылок.

Перечень последовательностей

<110> ДЖЕНЕРЕЙШЕН БИО КО.
 <120> Невирусные ДНК-векторы и варианты их применения для экспрессии терапевтического средства на основе фенилаланингидроксилазы (РАН)
 <130> 131698-05720
 <140> PCT/US2020/022595
 <141> 2020-03-13
 <150> 62/857,514
 <151> 2019-06-05
 <150> 62/817,771
 <151> 2019-03-13
 <160> 396
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 141
 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 1
 5 aggaaccsct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcaactgagg 60
 ccgggscgacc aaaggtcgcc cгacgcccгg gctttgcccг ggcggcctca gtgagcгagc 120
 gagcгcгcag ctгcctгcag g 141
 <210> 2
 <211> 141
 10 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 2
 15 cctгcaggca gctгcгcгct cгctcгctca ctgaggccгc ccgggcaaag cccgggсгtc 60
 gggcгacctt tggtcгcccг gcctcagtgа cгgagcгagc гcгcagagag ggagtggcca 120
 actccatcac taggggttcc t 141
 <210> 3
 <211> 130
 20 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 3
 25 aggaaccsct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcaactgagg 60
 ccgggscgacc aaaggtcgcc cгacgcccгg гcggcctcag tgagcгagcг агcгcгcagc 120
 тгcctгcagг 130
 <210> 4
 <211> 130
 30 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 4
 35 cctгcaggca gctгcгcгct cгctcгctca ctgaggccгc ccgggсгtcг ggcгaccttt 60
 ggtcгcccгg cctcagtgag cгagcгagcг cгcagagagg gagtggccaа ctccatcact 120
 aggggttccct 130
 <210> 5
 <211> 143
 40 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 5
 45 ttgcccactc cctctctgcg cгctcгctcg ctcгgtgggg cctгcгgacc aaaggtccгc 60
 агacггcaga ggtctcctct gccгgccccа ccгagcгagc гacгcгcгca gagaggгagt 120
 gggcaactcc atcaactaggг таа 143
 <210> 6

<211> 144
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 5 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 6
 ttggcactc cctctatgcg cactcgctcg ctcggtgggg cctggcgacc aaaggtcgcc 60
 agacggacgt gggtttccac gtccggcccc accgagcgcg cgagtgcgca tagagggagt 120
 ggccaactcc atcactagag gtat 144

10 <210> 7
 <211> 127
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 15 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 7
 ttggcactc cctctatgcg cgctcgctca ctcaactcggc cctggagacc aaaggtctcc 60
 agactgccgg cctctggccg gcagggccga gtgagtgagc gagcgcgcat agagggagtg 120
 gccaact 127

20 <210> 8
 <211> 166
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 25 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 8
 tccccctgt cgcgttcgct cgctcgctgg ctcgtttggg ggggcgacgg ccagagggcc 60
 gtcgtctggc agctctttga gctgccacc cccaaacga gccagcgcg gagcgaacgc 120
 gacagggggg agagtgccac actctcaagc aagggggggtt tgtaag 166

30 <210> 9
 <211> 144
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 35 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 9
 ttgcccactc cctctaagtc gcgctcgctc gctcgggtgg gctgcggac caaaggtccg 60
 cagacggcag aggtctcctc tgccggcccc accgagcgcg cgagcgcgca tagagggagt 120
 gggcaactcc atcactaggg gtat 144

40 <210> 10
 <211> 143
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 45 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 10
 ttaccctagt gatggagttg cccactccct ctctgcgcgc gtcgctcgct cgggtggggcc 60
 ggcagaggag acctctgccg tctgcggacc tttggtccgc aggccacc gagcgcgca 120

gcgcgcagag agggagtggg caa 143
 <210> 11
 <211> 144
 <212> ДНК
 5 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 11
 atacctctag tgatggagtt ggccactccc tctatgcgca ctcgctcgct cggtagggcc 60
 10 ggacgtgga acccacgtcc gtctggcgac ctttggtcgc caggccccac cgagcgagcg 120
 agtgcgcata gagggagtgg ccaa 144
 <210> 12
 <211> 127
 <212> ДНК
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 12
 agttggccac attagctatg cgcgctcgct cactcactcg gccctggaga ccaaaggtct 60
 20 ccagactgcc ggcctctggc cggcagggcc gagtgagtga gcgagcgcgc atagagggag 120
 tggcaca
 <210> 13
 <211> 166
 <212> ДНК
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 13
 cttacaaaac ccccttgctt gagagtgtgg cactctcccc cctgtcgcgt tcgctcgctc 60
 30 gctggctcgt ttgggggggt ggcagctcaa agagctgcc gacgacggcc ctctggccgt 120
 cccccccca aacgagccag cgagcgagcg aacgcgacag ggggga 166
 <210> 14
 <211> 144
 <212> ДНК
 35 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 14
 atacccttag tgatggagtt gccactccc tctatgcgcg ctcgctcgct cggtagggcc 60
 40 ggcagaggag acctctgcc tctgcggacc tttggtccgc agccccacc gagcgagcga 120
 gcgcgcatta gagggagtgg gcaa 144
 <210> 15
 <211> 120
 <212> ДНК
 45 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 15

aggaaccsct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
 cgcacgcccg ggtttcccgg gcggcctcag tgagcgagcg agcgcgagc tgcctgcagg 120
 <210> 16
 <211> 122
 5 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 16
 10 aggaaccsct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
 ccgacgcccg ggctttgccc gggcggcctc agtgagcgag cgagcgcgca gctgcctgca 120
 gg 122
 <210> 17
 <211> 129
 15 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 17
 20 aggaaccsct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
 ccgggscacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gcgcctcagt gagcgagcga gcgcgcagct 120
 gcctgcagg 129
 <210> 18
 <211> 101
 25 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 18
 30 aggaaccsct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
 ctttgscctca gtgagcgagc gagcgcgag ctgcctgcag g 101
 <210> 19
 <211> 139
 <212> ДНК
 35 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 19
 aggaaccsct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
 40 ccgggscaca aagtcgcccg acgcccggg tttgcccgg cggcctcagt gagcgagcga 120
 gcgcgcagct gcctgcagg 139
 <210> 20
 <211> 137
 <212> ДНК
 45 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 20

aggaaccsct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
 ccgggsgaaa atcgcccgac gcccgggctt tgccggggcg gcctcagtga gcgagcgagc 120
 gcgcagctgc ctgcagg 137
 <210> 21
 5 <211> 135
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 10 <400> 21
 aggaaccsct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
 ccgggsgaaa cggccgacgc ccgggctttg cccggggcggc ctcagtgagc gagcgagcgc 120
 gcagctgcct gcagg 135
 <210> 22
 15 <211> 133
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 20 <400> 22
 aggaaccsct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
 ccgggsgaaa cccgacgccc gggctttgcc cgggsggctt cagtgagcga gcgagcgagc 120
 agctgcctgc agg 133
 <210> 23
 25 <211> 139
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 30 <400> 23
 aggaaccsct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
 ccgggsgacc aaaggtcgcc cgcgccccgg gtttccccggg cggcctcagt gagcgagcga 120
 gcgcgcagct gcctgcagg 139
 <210> 24
 35 <211> 137
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 40 <400> 24
 aggaaccsct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
 ccgggsgacc aaaggtcgcc cgcgccccgg tttccggggc gcctcagtga gcgagcgagc 120
 gcgcagctgc ctgcagg 137
 <210> 25
 45 <211> 135
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 25
 aggaaccsct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
 ccgggsgacc aaaggtcgcc cgacgcccgt ttcgggsggc ctcaagtgagc gagcgagcgc 120
 5 gcagctgcct gcagg 135
 <210> 26
 <211> 133
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 10 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 26
 aggaaccsct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
 ccgggsgacc aaaggtcgcc cgacgscctt tgggsggcct cagtgagcga gcgagcgcgc 120
 15 agctgcctgc agg 133
 <210> 27
 <211> 131
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 20 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 27
 aggaaccsct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
 ccgggsgacc aaaggtcgcc cgacgscctt ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgagc 120
 25 ctgcctgcag g 131
 <210> 28
 <211> 129
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 30 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 28
 aggaaccsct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
 ccgggsgacc aaaggtcgcc cgacgctttg cggcctcagt gagcgagcga gcgcgagct 120
 35 gcctgcagg 129
 <210> 29
 <211> 127
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 40 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 29
 aggaaccsct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
 ccgggsgacc aaaggtcgcc cgacgtttcg gcctcagtga gcgagcgagc gcgagctgc 120
 45 ctgcagg 127
 <210> 30
 <211> 122
 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 30
 5 aggaaccsct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
 ccgggscgacc aaaggtcgcc cgacggcctc agtgagcgag cgagcgcgca gctgcctgca 120
 gg 122
 <210> 31
 <211> 130
 10 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 31
 15 aggaaccsct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
 ccgggscgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gcggcctcag tgagcgagcg agcgcgcagc 120
 tgcctgcagg 130
 <210> 32
 <211> 120
 20 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 32
 25 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggaaacc cgggcgtgcg 60
 cctcagtgag cgagcgagcg cgacagagagg gagtggccaa ctccatcact aggggttcct 120
 <210> 33
 <211> 122
 <212> ДНК
 30 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 33
 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgt ccgggcgacct ttggtcgccc 60
 35 ggcctcagtg agcagcgagcg cgcgacagaga gggagtggcc aactccatca ctaggggttc 120
 ct 122
 <210> 34
 <211> 122
 <212> ДНК
 40 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 34
 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgctc 60
 45 ggcctcagtg agcagcgagcg cgcgacagaga gggagtggcc aactccatca ctaggggttc 120
 ct 122
 <210> 35
 <211> 129

<212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 5 <400> 35
 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggcgcc cgggcgtcgg gcgaccttg 60
 gtcgcccggc ctcaagtgagc gagcagcgc gcagagagg agtggccaac tccatcacta 120
 ggggttcct 129
 <210> 36
 10 <211> 101
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 15 <400> 36
 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggcaaa gcctcagtga gcgagcagc 60
 gcgcaagag ggagtggcca actccatcac taggggttc t 101
 <210> 37
 <211> 139
 20 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 37
 25 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggctc 60
 gggcgacttt gtcgcccggc ctcaagtgagc gagcagcgc gcagagagg agtggccaac 120
 tccatcacta ggggttcct 139
 <210> 38
 <211> 137
 30 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 38
 35 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggctc 60
 gggcgatttt cggccgct caagtgagc gcagcgcgc agagaggag tggccaactc 120
 cactactagg ggttcct 137
 <210> 39
 <211> 135
 40 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 39
 45 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggctc 60
 gggcgtttcg cccggcctca gtgagcagc gagcgcgag agaggagtg gccaactcca 120
 tcaactaggg ttcct 135
 <210> 40

<211> 133
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 5 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 40
 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60
 gggctttgcc cggcctcagt gagcgcgagcga gcgcgcagag agggagtggc caactccatc 120
 actagggggt cct 133
 10 <210> 41
 <211> 139
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 15 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 41
 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggaaacc cgggcgctcgg 60
 gcgacctttg gtcgcccggc ctcaagtgagc gagcgcgagc gcagagagg agtggccaac 120
 tccatcacta ggggttcct 139
 20 <210> 42
 <211> 137
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 25 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 42
 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccggaaccg ggcgctcgggc 60
 gacctttggt cggccggcct cagtgcgagc gcgagcgcgc agagaggag tggccaactc 120
 catcactagg ggttcct 137
 30 <210> 43
 <211> 135
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 35 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 43
 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgaaacggg cgtcgggcga 60
 ctttggtcg cccggcctca gtgagcgcgc gagcgcgagc agaggagtgc gccaactcca 120
 tcaactagggg ttcct 135
 40 <210> 44
 <211> 133
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 45 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 44
 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccaaagggcg tcgggcgacc 60
 tttggtcgcc cggcctcagt gagcgcgagcga gcgcgcagag agggagtggc caactccatc 120

actagggggtt cct 133
 <210> 45
 <211> 131
 <212> ДНК
 5 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 45
 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc caaaggcgtc gggcgacctt 60
 10 tggtcgccccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgagagag ggagtggcca actccatcac 120
 taggggttcc t 131
 <210> 46
 <211> 129
 <212> ДНК
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 46
 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc aaagcgtcgg gcgacctttg 60
 20 gtcgccccggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcaagagagg agtggccaac tccatcacta 120
 ggggttcct 129
 <210> 47
 <211> 127
 <212> ДНК
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 47
 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccga aacgtcgggc gacctttggt 60
 30 cgccccggcct cagtgagcga gcgagcgcgc agagagggag tggccaactc catcactagg 120
 ggttcct 127
 <210> 48
 <211> 122
 <212> ДНК
 35 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 48
 aggaaccctt agtgatggag ttggccaactc cctctctgcy cgctcgctcg ctactgagg 60
 40 ccgggscgacc aaaggtcgcc cgacggcctc agtgagcgag cgagcgcgca gctgcctgca 120
 gg 122
 <210> 49
 <211> 12
 <212> ДНК
 45 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид

<400> 49
 cgatcgttcg at 12
 <210> 50
 <211> 12
 5 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид
 10 <400> 50
 atcgaaccat cg 12
 <210> 51
 <211> 12
 <212> ДНК
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид
 <400> 51
 20 atcgaaccgat cg 12
 <210> 52
 <211> 165
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 25 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 52
 aggaaccsct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
 ccgcccgggc aaagcccggg cgtcgggcca cctttggtcg cccggcctca gtgagcagc 120
 30 gagcgcgag agagggagtg gccaaactcca tactagggg ttcct 165
 <210> 53
 <211> 140
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 35 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 53
 ccctagtga tggagtggc cactccctct ctgctgctc gctcgctcac tgaggccgsc 60
 cgggcaaac ccgggcgctg ggcgaccttt ggctgcccgg cctcagtgag cgagcagcgc 120
 40 cgcagagaga tactagggg 140
 <210> 54
 <211> 91
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 45 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид
 <400> 54

	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcaaagccc gggcgtcggg cgacctttgg	60
	tcgcccggcc tcagtgagcg agcgagcgcg c	91
	<210> 55	
	<211> 91	
5	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид	
10	<400> 55	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg ассааaggtc gcccгacгcc cgggctttgc	60
	ccgggсggcc tcagtгagcg агсгagсгсг с	91
	<210> 56	
	<211> 1662	
15	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид	
	<400> 56	
20	gcccгсacca tggaagacгc caaaaacata aagaaaggcc cggcгccatt ctatccгctg	60
	gaagatggaa ccгctggaga гсаactгcat aaggctatga агagatacгc cctggttcct	120
	ggaacaattg cttttacaga тгсacatatc gaggtggaca tcacttacгc тgagtacttc	180
	gaaatgtccg ttсгgttgгc agaagctatg aaacгatatg ggctgaatac аaatcacaga	240
	atcгtсgtat гсagtgaaaa ctctcttcaa ttctttatgс cggtgttggg cгcгttattt	300
25	atcгgagttg cagttгcгcc cгcгaacгac атттатаатg аacгtgaatt гctcaacagt	360
	atgggсattt cгcagcctac cgtggtgttc gtttccaaaa aggggttgca aaaaattttg	420
	aacгtgcaaa aaaagctccc аatcatcaa aaaattatta tcatggattc таааacгgat	480
	taccagggat ttсagtcгat гtacacгttc гtcacatctc атctacctcc cggttttaat	540
	gaatacгatt ttgtгccaga гtccttcгat agggacaaga caattgсact gatcatgaac	600
30	tcctctggat ctactggтct гcctaaaaggт гtcгctctгc ctcatagaac тгcctгcгtg	660
	agattctcгc атгссagaga tcctattttt ggcaatcaaa tcattccгga tactгcгatt	720
	ttaagtгttg ttccattcca tcacгgtttt ggaatгttta ctacactcгg ататттgata	780
	тgtгgatttc gagtcгtctt аatgtataga tttgaaгаag агctгttct гaggagcctt	840
	caggattaca агattcaaaг тгcгctгctг gtgccaacc тattctcctt cttгcгcaaa	900
35	agcactctga ttгacaaaata cгattttatct аatttacagг аaattгcttc тggтggcгct	960
	cccctctcta aggaagтcгg ggaagcгgtt gccaaгaggt tccatctгcc aggtatcagg	1020
	caaggatatg ggctcactga гactacatca гctattctga ttacaccгga gggggatgat	1080
	aaaccгggгcг cggтcгgтаa агttгttcca ttttttгаag cгаaggttгt гgatctggat	1140
	accгggaaaa cгctгggгcгt таatcaaaга ggсgaactгt гtгtgagagg tcctatgatt	1200
40	atгtccгgtt атgтаacaa tccгgaagcг accaacгcct тgattгacaa гgatгgatгg	1260
	ctacattctг gagacatagc ttactggгac гаagacгаac acttcttcat cгttгaccгc	1320
	ctгаagtctc тgattaagта caaaggctat caggтggctc ccгctгаatt гgaatccatc	1380
	ttгctccaac accccaacat cttгcгacгca гgtгtсгcгag гtcttcccга cгatгacгcc	1440
	ggтgaacttc ccгccгccгt тgtttгttttг gagcacггаа агacгatгac гgaaaaгаг	1500
45	atcгtгgatt acгtсгccag тcaagтаaca accгcгaaaa агttгcгcгg агgagttгtg	1560
	tttгtгgгacг аagтaccгaa агgtcttacc гgaaaactcг acгcaagaaa аatcagagag	1620
	atcctcataa агgccaagaa гggcгgaaaг атcгccгtгt aa	1662
	<210> 57	

<211> 453

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

5 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Любая аминокислота

10 <400> 57

Xaa Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

15 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

20 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp

100 105 110

25 Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys

115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly

130 135 140

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro

30 145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr

165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val

180 185 190

35 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn

195 200 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro

210 215 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu

40 225 230 235 240

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

245 250 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

260 265 270

45 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

275 280 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn

290 295 300

RU 2814137 C2

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315 320
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
325 330 335
5 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340 345 350
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
355 360 365
10 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415
15 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445
Ser Leu Ser Pro Gly
20 450
<210> 58
<211> 214
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
25 <220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид
<400> 58
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
30 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
35 50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
85 90 95
40 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
45 130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

RU 2 814 137 C2

		165		170		175	
	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr						
		180		185		190	
	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser						
5		195		200		205	
	Phe Asn Arg Gly Glu Cys						
	210						
	<210> 59						
	<211> 1310						
10	<212> ДНК						
	<213> Искусственная последовательность						
	<220>						
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид						
	<400> 59						
15	ggagccgaga gtaattcata caaaaggagg gatcgccttc gcaaggggag agcccagga						60
	ccgtccctaa attctcacag acccaaatcc ctgtagccgc cccacgacag cgcgaggagc						120
	atgctctcag ggctgagcgc ggggagagca gagcacacaa gctcatagac cctggctcgtg						180
	ggggggagga ccggggagct ggcgcggggc aaactgggaa agcgggtgctg tgtgctggct						240
	ccgccctctt cccgaggggtg ggggagaacg gtatataagt gcggcagtcg ccttgacgt						300
20	tctttttcgc aacgggtttg ccgtcagaac gcaggtgagg ggccgggtgtg gcttccgcgg						360
	gccgccgagc tggaggtcct gctccgagcg ggccgggccc cgtctgctgc gccggggatt						420
	agctgctgagc attcccgtct cgagttgcgg gcggcgcggg aggcagagtg cgaggcctag						480
	cggcaacccc gtagcctcgc ctctgtctccg gcttgaggcc tagcgtggtg tccgcgccgc						540
	cgccgcgtgc tactccggcc gcaactctggt cttttttttt tttgttggtg ttgccctgct						600
25	gccttcgatt gccgttcagc aataggggct aacaaaggga ggggtgcgggg cttgctcgcc						660
	cggagcccgg agaggatcatg gttggggagg aatggaggga caggagtggc ggctggggcc						720
	cgccgcctt cggagcacat gtccgacgcc acctggatgg gccgaggcct ggggtttttc						780
	ccgaagcaac caggctgggg ttagcgtgcc gaggccatgt ggcccagca cccggcacga						840
	tctggcttg cggcgcgcgc ttgccctgcc tccctaacta gggtgaggcc atcccgtccg						900
30	gcaccagttg cgtgcgtgga aagatggccg ctcccgggcc ctggtgcaag gagtcaaaa						960
	tggaggacgc gccagcccgg tggagcgggc gggtagtca cccacacaaa ggaagagggc						1020
	ctggctccctc accggctgct gcttcctgtg accccgtggt cctatcggcc gcaatagtca						1080
	cctcgggctt ttgagcacgg ctagtcgcgg cggggggagg ggatgtaatg gcgttgaggt						1140
	ttgttcacat ttggtgggtg gagactagtc aggccagcct ggcgctggaa gtcatttttg						1200
35	gaatttgtcc ccttgagttt tgagcggagc taattctcgg gcttcttagc ggttcaaagg						1260
	tatcttttaa accctttttt aggtgttggtg aaaaccaccg ctaattcaaa						1310
	<210> 60						
	<211> 16						
	<212> ДНК						
40	<213> Искусственная последовательность						
	<220>						
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид						
	<400> 60						
45	gcgcgctcgc tcgctc						16
	<210> 61						
	<211> 6						
	<212> ДНК						

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид
 5 <400> 61
 ggttga 6
 <210> 62
 <211> 4
 <212> ДНК
 10 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид
 <400> 62
 15 agtt 4
 <210> 63
 <211> 6
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 20 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид
 <400> 63
 ggttgg 6
 25 <210> 64
 <211> 6
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 30 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид
 <400> 64
 agttgg 6
 <210> 65
 35 <211> 6
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 40 олигонуклеотид
 <400> 65
 agttga 6
 <210> 66
 <211> 6
 45 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический

	олигонуклеотид	
	<400> 66	
	rrttrr	6
	<210> 67	
5	<211> 581	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид	
10	<400> 67	
	gagcatctta ccgccattta ttcccatatt tgttctgttt ttcttgattt gggatacat	60
	ttaaatgtta ataaaaaааа atgggtggggc aatcatttac attttaggg atatgtaatt	120
	actagttcag gtgtattgcc асааgасааа catgttaаga aactttcccg ttatttacgc	180
	tctgttcctg ttaatсааcc tctggattac аааатттgtg аааgattgac tgatattcctt	240
15	aactatgttg ctccttttac gctgtgtgga tatgctgctt tatagcctct gtatctagct	300
	attgcttccc gtacggcttt cgttttctcc tccttgata aatcctgggt gctgtctctt	360
	ttagaggagt tgtggcccgt tgtccgtcaa cgtggcgtgg tgtgctctgt gtttgctgac	420
	gcaacccccа ctggctgggg cattgccacc acctgtcaac tcctttctgg gactttcget	480
	ttccccctcc cgatcgccac ggcagaactc atcgccgct gccttgcccg ctgctggaca	540
20	ggggctaggт tgctgggcac tgataattcc gtggtgtgt c	581
	<210> 68	
	<211> 225	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
25	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид	
	<400> 68	
	tgtgccttct agttgccagc catctgttgt ttgcccctcc cccgtgcctt ccttgaccct	60
	ggaaggтgсc actcccactg tcctttccta ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct	120
30	gagtaggtgt cattctattc tgggggggtgg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg	180
	ggaagacaat agcaggcatg ctgggggatgc ggtgggctct atggc	225
	<210> 69	
	<211> 8	
	<212> ДНК	
35	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид	
	<400> 69	
40	actgaggc	8
	<210> 70	
	<211> 8	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
45	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид	
	<400> 70	

gcctcagt
 <210> 71
 <211> 16
 <212> ДНК
 5 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид
 <400> 71

10 gagcagcсga gcсcсc
 <210> 72
 <211> 1923
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

15 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 72

tcaatattgg	ccattagcca	tattattcat	tggttatata	gcataaatca	atattggcta	60
ttggccattg	catacgttgt	atctatatca	taatatgtac	atttatattg	gctcatgtcc	120
20 aatatgaccg	ccatgttggc	attgattatt	gactagttat	taatagtaat	caattacggg	180
gtcattagtt	catagcccat	atatggagtt	ccgcgttaca	taacttacgg	taaatggccc	240
gcctggctga	ccgccccaacg	acccccgccc	attgacgtca	ataatgacgt	atgttcccat	300
agtaacgcca	atagggactt	tccattgacg	tcaatgggtg	gagtatttac	ggtaaactgc	360
ccacttgcca	gtacatcaag	tgtatcatat	gccaagtccg	ccccctattg	acgtcaatga	420
25 cggtaaатgg	cccgcctggc	attatgcca	gtacatgacc	ttacgggact	ttcctacttg	480
gcagtacatc	tacgtattag	tcatcgctat	taccatggtc	gaggtgagcc	ccacgttctg	540
cttcaactctc	cccactctccc	ccccctcccc	accccccaatt	ttgtatttat	ttatttttta	600
attattttgt	gcagcgatgg	gggcgggggg	gggggggggg	cgcgcgccag	gcggggcggg	660
gcggggcgag	gggcggggcg	gggcgagggc	gagaggtgcg	gcggcagcca	atcagagcgg	720
30 cgcgctccga	aagtttcctt	ttatggcgag	gcggcgggcg	cgggggccct	ataaaaagcg	780
aagcgcgcg	cgggcgggag	tcgctgcgac	gctgccttcg	ccccgtgcc	cgctccgccg	840
ccgcctcgcg	ccgcccggcc	cggtcttgac	tgaccgcggt	actcccacag	gtgagcgggc	900
gggacggccc	ttctcctccg	ggctgtaatt	agcgcttgg	ttaatgacgg	cttgtttctt	960
ttctgtggct	gcgtgaaagc	cttgaggggc	tccgggaggg	ccctttgtgc	gggggggagc	1020
35 ggctcggggg	gtgctgctgc	gtgtgtgtgc	gtggggagcg	ccgcgtgctg	cccgcgtgctg	1080
ccggcggtcg	tgagcgctgc	gggcgcgggc	cggggctttg	tgcgctccgc	agtgtgctgc	1140
aggggagcgc	ggccgggggc	ggtgccccgc	ggtgcggggg	gggctgagag	gggaacaaag	1200
gctgctgctg	gggtgtgtgc	gtgggggggt	gagcaggggg	tgtggggcgc	gcggtcgggc	1260
tgtaaccccc	ccctgcaccc	ccctccccga	ggtgctgagc	acggcccggc	ttcgggtgcg	1320
40 gggctccgta	cggggcgtgg	cgcggggctc	gccgtgccgg	gcgggggggtg	gcggcaggtg	1380
gggggtgccg	gcggggcggg	gccgcctcgg	gccggggagg	gctcggggga	ggggcgcggc	1440
ggcccccgga	gcgcccggcg	ctgtcgaggg	gcggcgagcc	gcagccattg	ccttttatgg	1500
taatcgctgc	agagggcgca	gggacttcct	ttgtcccaaa	tctgtgagga	gccgaaatct	1560
gggagggcgc	gccgcacccc	ctctagcggg	cgcgggggca	agcggtgctg	cgccggcagg	1620
45 aaggaaатgg	gcggggaggg	ccttcgtgct	tcgcccgcgc	gccgtcccct	tctccctctc	1680
cagcctcggg	gctgtcccg	gggggacggc	tgcttcggg	ggggacgggg	cagggcgggg	1740
ttcggttct	ggcgtgtgac	cggcggctct	agagcctctg	ctaaccatgt	tttagccttc	1800
ttctttttcc	tacagctcct	gggcaacgtg	ctgggtattg	tgctgtctca	tcatttgtcg	1860

	acagaattcc tcgaagatcc gaagggggttc aagcttggca ttccggtact gttggtaaag	1920
	cca	1923
	<210> 73	
	<211> 1272	
5	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид	
	<400> 73	
10	aggctcagag gcacacagga gtttctgggc tcaccctgcc cccttccaac ccctcagttc	60
	ccatcctcca gcagctgttt gtgtgctgcc tctgaagtcc aacttgaaca aacttcagcc	120
	tactcatgtc cctaaaatgg gcaaacattg caagcagcaa acagcaaca cacagccctc	180
	cctgcctgct gaccttgag ctggggcaga ggtcagagac ctctctgggc ccatgccacc	240
	tccaacatcc actcgacccc ttggaatttc ggtggagagg agcagagggt gtcctggcgt	300
15	ggtttaggta gtgtgagagg gtccggggttc aaaaccactt gctgggtggg gagtcgtcag	360
	taagtggcta tgccccgacc ccgaagcctg tttccccatc tgtacaatgg aaatgataaa	420
	gacgcccac tgataggggt tttgtggcaa ataaacattt ggtttttttg ttttgttttg	480
	ttttgttttt tgagatggag gtttgctctg tcgcccaggc tggagtgcag tgacacaatc	540
	tcatctcacc acaaccttcc cctgcctcag cctcccaagt agctgggatt acaagcatgt	600
20	gccaccacac ctggctaatt ttctattttt agtagagac ggtttctcca tgttggctcag	660
	cctcagcctc ccaagtaact gggattacag gcctgtgccca ccacaccgg ctaatttttt	720
	ctatttttga cagggacggg gtttcacat gttggtcagg ctggtctaga ggtaccggat	780
	cttgctacca gtggaacagc cactaaggat tctgcagtga gagcagaggg ccagctaagt	840
	ggtactctcc cagagactgt ctgactcacg ccaccccctc caccttgac acaggacgct	900
25	gtggtttctg agccaggtac aatgactcct ttcggtaagt gcagtggaag ctgtacactg	960
	cccaggcaaa gcgtccgggc agcgtaggcg ggcgactcag atcccagcca gtggacttag	1020
	cccctgtttg ctctccgat aactggggtg accttggtta atattacca gcagcctccc	1080
	ccgttgcccc tctggatcca ctgcttaaat acggacgagg acagggcct gtctcctcag	1140
	cttcaggcac caccactgac ctgggacagt gaatccggac tctaaggtaa atataaaatt	1200
30	tttaagtgta taatgtgta aactactgat tctaattggt tctctctttt agattccaac	1260
	ctttggaact ga	1272
	<210> 74	
	<211> 1177	
	<212> ДНК	
35	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид	
	<400> 74	
40	ggctcagagg ctcagaggca cacaggagt tctgggctca ccctgcccc ttccaacccc	60
	tcagttccca tcctccagca gctgtttgtg tgctgcctct gaagtccaca ctgaacaac	120
	ttcagcctac tcatgtccct aaaatgggca aacattgcaa gcagcaaca gcaaacacac	180
	agccctccct gcctgctgac cttggagctg gggcagagg cagagacctc tctgggccca	240
	tgccacctcc aacatccact cgacccttg gaatttcggt ggagaggagc agaggttgtc	300
	ctggcgtggg ttaggtagtg tgagagggtc cgggttcaaa accacttgct ggggtggggag	360
45	tcgtcagtaa gtggctatgc cccgaccccg aagcctgttt ccccatctgt acaatggaaa	420
	tgataaagac gcccatctga tagggttttt gtggcaaata aacatttggt tttttgttt	480
	tgttttgttt tgttttttga gatggagggt tgctctgtcg cccaggctgg agtgcagtga	540
	cacaatctca tctcaccaca accttcccct gcctcagcct cccaagtagc tgggattaca	600

agcatgtgcc accacacctg gctaattttc tatttttagt agagacgggt ttctccatgt 660
 tggtcagcct cagcctccca agtaactggg attacaggcc tgtgccacca caccgggcta 720
 attttttcta tttttgacag ggacgggggtt tcaccatggt ggtcaggctg gtctagaggt 780
 accggatcct gctaccagtg gaacagccac taaggattct gcagtgagag cagagggcca 840
 5 gctaagtggg actctcccag agactgtctg actcacgcca cccctccac cttggacaca 900
 ggacgctgtg gtttctgagc cagggtacaat gactcctttc ggtaagtgca gtggaagctg 960
 tacactgccc aggcaaagcg tccgggcagc gtaggcgggc gactcagatc ccagccagtg 1020
 gacttagccc ctgtttgctc ctccgataac tggggtgacc ttgggtaata ttcaccagca 1080
 gcctcccccg ttgccctctt ggatccactg cttaaatacg gacgaggaca gggccctgtc 1140
 10 tcctcagctt caggcaccac cactgacctg ggacagt 1177
 <210> 75
 <211> 547
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 15 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 75
 ccctaaaatg ggcaaacatt gcaagcagca aacagcaaac acacagccct ccctgcctgc 60
 tgaccttgga gctggggcag aggtcagaga cctctctggg cccatgccac ctccaacatc 120
 20 cactcgacc cttggaatth ttcggtggag aggagcagag gttgtcctgg cgtggtttag 180
 gtagtgtgag aggggaatga ctcccttcgg taagtgcagt ggaagctgta cactgcccag 240
 gcaaacgctc cgggcagcgt aggcgggcga ctcagatccc agccagtgga ctagcccct 300
 gtttgctcct ccgataactg gggtgacctt ggtaaatatt caccagcagc ctccccgctt 360
 gcccctctgg atccactgct taaatacggg cgaggacagg gccctgtctc ctgagcttca 420
 25 ggcaccacca ctgacctggg acagtgaatc cggactctaa ggtaaatata aaatthttaa 480
 gtgtataatg tgttaaacata ctgattctaa ttgtttctct ctttagatt ccaacctttg 540
 gaactga 547
 <210> 76
 <211> 556
 30 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 76
 35 ccctaaaatg ggcaaacatt gcaagcagca aacagcaaac acacagccct ccctgcctgc 60
 tgaccttgga gctggggcag aggtcagaga cctctctggg cccatgccac ctccaacatc 120
 cactcgacc cttggaatth cgggtggagag gagcagaggt tgtcctggcg tggtttaggt 180
 agtgtgagag gggaatgact cttttcggtg agtgacgtgg aagctgtaca ctgcccaggc 240
 aaagcgtccg ggcagcgtag gcgggcgact cagatcccag ccagtggact tagcccctgt 300
 40 ttgctcctcc gataactggg gtgaccttgg ttaaatattca ccagcagcct cccccgttgc 360
 ccctctggat ccactgctta aatacggagc aggacactcg agggccctgt ctctcagct 420
 tcaggcacca ccactgacct gggacagtga atccggacat cgattctaag gtaaatataa 480
 aatthttaaag tgtataatth gttaaacctac tgattctaag tgtttctctc ttttagattc 540
 caacctttgg aactga 556
 45 <210> 77
 <211> 1179
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

<400> 77

	ggctccggtg cccgtcagtg ggcagagcgc acatcgccca cagtccccga gaagttgggg	60
5	ggaggggtcg gcaattgaac cggcgcctag agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt	120
	gatgtcgtgt actggctccg cctttttccc gaggggtggg gagaaccgta tataagtgca	180
	gtagtcgccg tgaacgttct ttttcgcaac gggtttgccg ccagaacaca ggtaagtgcc	240
	gtgtgtggtt cccgcgggcc tggcctcttt acgggttatg gcccttgctg gccttgaatt	300
	acttccacct ggctgcagta cgtgattctt gatccccgagc ttcgggttg aagtgggtgg	360
10	gagagttcga ggccttgctg ttaaggagcc ccttcgcctc gtgcttgagt tgaggcctgg	420
	cctgggctcg ggggccgccc cgtgcgaatc tgggtggcacc ttcgcgcctg tctcgcctgct	480
	ttcgataagt ctctagccat ttaaaatttt tgatgacctg ctgcgacgct ttttttctgg	540
	caagatagtc ttgtaaagtc gggccaagat ctgcacactg gtatttcggt ttttggggcc	600
	gcgggcggcg acggggcccg tgcgtcccag cgcacatggt cggcgaggcg gggcctgcga	660
15	gcgcggccac cgagaatcgg acgggggtag tctcaagctg gccggcctgc tctggtgctt	720
	ggtctcgcgc cgcctgtgat cccccgccc tgggcggcaa ggctggcccg gtcggcacca	780
	gttgcgtgag cggaaagatg gccgcttccc ggccctgctg cagggagctc aaaatggagg	840
	acgcggcgtc cgggagagcg ggcgggtgag tcaccacac aaaggaaaag ggccttccg	900
	tcctcagccg tcgcttcatg tgactccacg gagtaccggg cgcctccag gcacctgat	960
20	tagttctcga gcttttgag tacgctgtct ttaggttggg gggaggggtt ttatgcatg	1020
	gagtttccc aactgagtg ggtggagact gaagttaggc cagcttggca cttgatgtaa	1080
	ttctccttgg aatttgcct ttttgagttt ggatcttgg tcatctcaa gcctcagaca	1140
	gtggttcaaa gtttttttct tccatttcag gtgtcgtga	1179

<210> 78

25 <211> 141

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

30 <400> 78

	aataaacgat aacgcccgtt gtggcgtgag gcatgtaaaa ggttacatca ttatcttgtt	60
	cgccatccgg ttggtataaaa tagacgttca tgttggtttt tgtttcagtt gcaagttggc	120
	tgccggcgcgc gcagcacctt t	141

<210> 79

35 <211> 317

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

40 <400> 79

	ggtgtggaaa gtccccaggc tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt	60
	agtcagcaac caggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca	120
	tgcattctca ttagtcagca accatagtcc cgcctcctaac tccgcccac cgcctcctaa	180
	ctccgcccag ttccgcccac tctccgcccc atggctgact aatttttttt atttatgcag	240
45	aggccgaggc cgcctcggcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc ttttttggag	300
	gcctaggctt ttgcaaaa	317

<210> 80

<211> 241

<212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 5 <400> 80
 gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc tgtagagag 60
 ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag taaaaaac gtgacgtaga 120
 aagtaataat ttcttgggta gtttgagcgtt ttaaaattat gttttaaaat ggactatcat 180
 atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttggcct tatatatctt gtggaagga 240
 10 с 241
 <210> 81
 <211> 215
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 15 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 81
 gaacgctgac gtcatsaacc cgctccaagg aatcgcgggc ccagtgtcac taggcgggaa 60
 caccagcgcc gcgtgcgccc tggcaggaag atggctgtga gggacagggg agtggcgccc 120
 20 tgcaatattt gcatgtcgct atgtgttctg gaaatcacc ataacgtga aatgtctttg 180
 gatttgggaa tcgtataaga actgtatgag accac 215
 <210> 82
 <211> 546
 <212> ДНК
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 82
 ccstaaaatg ggcaaacatt gcaagcagca aacagcaaac acacagccct ccctgcctgc 60
 30 tgaccttgga gctggggcag aggtcagaga cctctctggg cccatgccac ctccaacatc 120
 cactcgaccc cttggaattt ttcggtggag aggagcagag gttgtcctgg cgtggtttag 180
 gtagtgtgag aggggaatga ctcttttcgg taagtgcagt ggaagctgta cactgcccag 240
 gcaaacgcgtc cgggcagcgt aggcgggcca ctcatatccc agccagtgga ctagcccct 300
 gtttgctcct ccgataactg gggtgacctt ggtaaatatt caccagcagc ctccccgctt 360
 35 gccccctctgg atccactgct taaatacggg cgaggacagg gccctgtctc ctgagcttca 420
 ggcaccacca ctgacctggg acagtgaatc cggactctaa ggtaaatata aaatttttaa 480
 gtgtataatg tgttaaacata ctgattctaa ttgtttctct ctttagatt ccaacctttg 540
 gaactg 546
 <210> 83
 40 <211> 576
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 45 <400> 83
 tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagtccg cgttacataa 60
 cttacggtaa atggcccgc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata 120
 atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag 180

	tatttacggt aaactgcca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc	240
	cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta	300
	tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catgggtgatg	360
	cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt	420
5	ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg ggactttcca	480
	aaatgtcgt acaactccgc cccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt acgggtgggag	540
	gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cgtcag	576
	<210> 84	
	<211> 150	
10	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид	
	<400> 84	
15	ataaacgata acgccgttgg tggcgtgagg catgtaaaag gttacatcat tatcttgttc	60
	gccatccggt tggatataaat agacgttcat gttggttttt gtttcagttg caagttggct	120
	gcggcgcgcg cagcaccttt gcggccatct	150
	<210> 85	
	<211> 1313	
20	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид	
	<400> 85	
25	ggagccgaga gtaattcata caaaaggagg gatcgccttc gcaaggggag agcccagga	60
	ccgtccctaa attctcacag acccaaatcc ctgtagccgc cccacgacag cgcgaggagc	120
	atgcgcccag ggctgagcgc gggtagatca gagcacacaa gctcacagtc cccggcggtg	180
	gggggagggg cgcgctgagc gggggccagg gagctggcgc ggggcaact gggaaagtgg	240
	tgtcgtgtgc tggctccgcc ctcttcccga ggggtggggga gaacggtata taagtgcggt	300
30	agtcgccttg gacgttcttt ttcgcaacgg gtttgccgtc agaacgcagg tgagtggcgg	360
	gtgtggcttc cgcgggcccc ggagctggag ccctgctctg agcgggccgg gctgatatgc	420
	gagtgtcgtc cgcagggttt agctgtgagc attcccactt cgagtggcgg gcggtgcggg	480
	ggtgagagtg cgaggcctag cggcaacccc gtagcctcgc ctctgttccg gcttgaggcc	540
	tagcgtggtg tccgccgccc cgtgccactc cggccgcaact atgcgttttt tgccttgcct	600
35	gccctcgatt gccttccagc agcatgggct aacaaaaggga ggggtgtggg ctactctta	660
	aggagcccat gaagcttacg ttggatagga atggaagggc aggagggcg actggggccc	720
	gcccgccttc ggagcacatg tccgacgcca cctggatggg gcgaggcctg tggctttccg	780
	aagcaatcgg gcgtgagttt agcctacctg ggccatgtgg ccctagcact gggcacggtc	840
	tggcctggcg gtgccgctt cccttgccctc ccaacaaggg tgaggccgtc ccgccggca	900
40	ccagttgctt gcgcgaaaag atggccgctc ccggggccct gttgcaagga gctcaaaatg	960
	gaggacgcgg cagcccggtg gagcggggcg gtgagtcacc cacacaaagg aagagggcct	1020
	tgcccctcgc cggccgctgc ttcctgtgac cccgtggtct atcggccgca tagtcacctc	1080
	gggcttctct tgagcaccgc tcgtcgcggc ggggggaggg gatctaattg cgttgagatt	1140
	tgttcacatt tgggtgggtg agactagtca ggccagcctg gcgctggaag tcattcttgg	1200
45	aatttgcccc tttgagtttg gagcagggct aattctcaag cctcttagcg gttcaaaggt	1260
	atthttctaaa cccgtttcca ggtgtttgta aagccaccgc taattcaaag caa	1313
	<210> 86	
	<211> 213	

<212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 5 <400> 86
 taagatacat tgatgagttt ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa aaatgcttta 60
 tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaaccat tataagctgc aataaacaag 120
 ttaacaaca caattgcatt cattttatgt ttcaggttca gggggagggtg tgggagggtt 180
 tttaaagcaa gtaaaacctc tacaatgtg gta 213
 10 <210> 87
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 15 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид
 <400> 87
 Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
 1 5
 <210> 88
 20 <211> 19
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид
 25 <400> 88
 Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Ala His Ser
 <210> 89
 30 <211> 19
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид
 35 <400> 89
 Met Leu Pro Ser Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala
 1 5 10 15
 Ser Arg Gly
 <210> 90
 40 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Обезьяний вирус 40
 <400> 90
 Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
 45 1 5
 <210> 91
 <211> 21
 <212> ДНК

<213> Обезьяний вирус 40
 <400> 91
 сссаагаага агаггаагgt g
 <210> 92
 5 <211> 16
 <212> БЕЛОК
 <213> Неизвестный
 <220>
 <223> Описание неизвестного: двусоставная последовательность
 10 NLS нуклеоплазмина
 <400> 92
 Lys Arg Pro Ala Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys
 1 5 10 15
 <210> 93
 15 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Неизвестный
 <220>
 <223> Описание неизвестного: последовательность NLS С-мус
 20 <400> 93
 Pro Ala Ala Lys Arg Val Lys Leu Asp
 1 5
 <210> 94
 <211> 11
 25 <212> БЕЛОК
 <213> Неизвестный
 <220>
 <223> Описание неизвестного: последовательность NLS С-мус
 <400> 94
 30 Arg Gln Arg Arg Asn Glu Leu Lys Arg Ser Pro
 1 5 10
 <210> 95
 <211> 38
 <212> БЕЛОК
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 95
 Asn Gln Ser Ser Asn Phe Gly Pro Met Lys Gly Gly Asn Phe Gly Gly
 1 5 10 15
 Arg Ser Ser Gly Pro Tyr Gly Gly Gly Gly Gln Tyr Phe Ala Lys Pro
 40 20 25 30
 Arg Asn Gln Gly Gly Tyr
 35
 <210> 96
 <211> 42
 45 <212> БЕЛОК
 <213> Неизвестный
 <220>
 <223> Описание неизвестного: домен IBV из последовательности импортина-альфа

<400> 96
 Arg Met Arg Ile Glx Phe Lys Asn Lys Gly Lys Asp Thr Ala Glu Leu
 1 5 10 15
 Arg Arg Arg Arg Val Glu Val Ser Val Glu Leu Arg Lys Ala Lys Lys
 5 20 25 30
 Asp Glu Gln Ile Leu Lys Arg Arg Asn Val
 35 40
 <210> 97
 <211> 8
 10 <212> БЕЛОК
 <213> Неизвестный
 <220>
 <223> Описание неизвестного: последовательность Т-белка МИОМЫ
 <400> 97
 15 Val Ser Arg Lys Arg Pro Arg Pro
 1 5
 <210> 98
 <211> 8
 <212> БЕЛОК
 20 <213> Неизвестный
 <220>
 <223> Описание неизвестного: последовательность Т-белка МИОМЫ
 <400> 98
 Pro Pro Lys Lys Ala Arg Glu Asp
 25 1 5
 <210> 99
 <211> 8
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 99
 Pro Gln Pro Lys Lys Lys Pro Leu
 1 5
 <210> 100
 <211> 12
 35 <212> БЕЛОК
 <213> Mus musculus
 <400> 100
 Ser Ala Leu Ile Lys Lys Lys Lys Lys Met Ala Pro
 1 5 10
 40 <210> 101
 <211> 70
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 45 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид
 <400> 101
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggaaaccccg gcgtgcgcct cagtgagcga

	gсgаgсgсgс	70
	<210> 102	
	<211> 70	
	<212> ДНК	
5	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид	
	<400> 102	
10	gсgсgсtсgс tсgсtсactg агgсgсacгс ссgggtttcc cgggcggcct cagtгagсga	60
	gсgаgсgсgс	70
	<210> 103	
	<211> 72	
	<212> ДНК	
15	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид	
	<400> 103	
20	gсgсgсtсgс tсgсtсactg агgссgтсgг gсgасctttg gтсgсccггс tсagтgаgс	60
	gагсgаgсgс gс	72
	<210> 104	
	<211> 72	
	<212> ДНК	
25	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид	
	<400> 104	
30	gсgсgсtсgс tсgсtсactg агgссggггсg ассааaggтс gсссgасггс tсagтgаgс	60
	gагсgаgсgс gс	72
	<210> 105	
	<211> 72	
	<212> ДНК	
35	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид	
	<400> 105	
40	gсgсgсtсgс tсgсtсactg агgссgсссg ggсааaggсс gggсgтсgгс tсagтgаgс	60
	gагсgаgсgс gс	72
	<210> 106	
	<211> 72	
	<212> ДНК	
45	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид	

	<400> 106	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgacgc ccgggctttg cccgggcggc ctcagtgagc	60
	gagcagcgc gc	72
	<210> 107	
5	<211> 83	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический	
10	олигонуклеотид	
	<400> 107	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcaaagccc gggcgtcggg ctttgcccgg	60
	cctcagtgag cgaгcгagcг cgc	83
	<210> 108	
15	<211> 83	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический	
20	олигонуклеотид	
	<400> 108	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggca aagcccгacг cccgggcttt gcccgggcгg	60
	cctcagtгag cгагcгagcг cgc	83
	<210> 109	
25	<211> 77	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический	
30	олигонуклеотид	
	<400> 109	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgaaaс gtcgggгcгac ctttggtcгc ccggcctcag	60
	tgagcгagcг агcгcгc	77
	<210> 110	
35	<211> 77	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический	
40	олигонуклеотид	
	<400> 110	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggгcг accaaaggtc gcccgacgtt tcggcctcag	60
	tgagcгagcг агcгcгc	77
	<210> 111	
45	<211> 51	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	

	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид	
	<400> 111	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggcaaaagcc tcagtgagcg agcgagcgcg c	51
5	<210> 112	
	<211> 51	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
10	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид	
	<400> 112	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggctttgcc tcagtgagcg agcgagcgcg c	51
	<210> 113	
15	<211> 80	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
20	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид	
	<400> 113	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcgtcgggc gacctttggt cgcccgccct	60
	cagtgagcga gcgagcgcgc	80
	<210> 114	
25	<211> 80	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
30	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид	
	<400> 114	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg ассаааggtc gcccgacgcc cgggcgccct	60
	cagtgagcga gcgagcgcgc	80
	<210> 115	
35	<211> 79	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
40	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид	
	<400> 115	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggcgcccgg gcgtcgggcg acctttggtc gcccgccctc	60
	agtgagcga gcgagcgcgc	79
	<210> 116	
45	<211> 79	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид
 <400> 116
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggscg accaaaaggtc gcccgacgcc cgggcgcctc 60
 5 agtgagcagag cgaгcgcgc 79
 <210> 117
 <211> 5
 <212> БЕЛОК
 <213> Вирус гриппа
 10 <400> 117
 Asp Arg Leu Arg Arg
 1 5
 <210> 118
 <211> 7
 15 <212> БЕЛОК
 <213> Вирус гриппа
 <400> 118
 Pro Lys Gln Lys Lys Arg Lys
 1 5
 20 <210> 119
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Вирус гепатита дельта
 <400> 119
 25 Arg Lys Leu Lys Lys Lys Ile Lys Lys Leu
 1 5 10
 <210> 120
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 30 <213> Mus musculus
 <400> 120
 Arg Glu Lys Lys Lys Phe Leu Lys Arg Arg
 1 5 10
 <210> 121
 35 <211> 20
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 121
 Lys Arg Lys Gly Asp Glu Val Asp Gly Val Asp Glu Val Ala Lys Lys
 40 1 5 10 15
 Lys Ser Lys Lys
 20
 <210> 122
 <211> 17
 45 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 122
 Arg Lys Cys Leu Gln Ala Gly Met Asn Leu Glu Ala Arg Lys Thr Lys

	1	5	10	15		
	Lys					
	<210> 123					
	<211> 8					
5	<212> ДНК					
	<213> Искусственная последовательность					
	<220>					
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид					
10	<400> 123					
	gtttaaac					8
	<210> 124					
	<211> 8					
	<212> ДНК					
15	<213> Искусственная последовательность					
	<220>					
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид					
	<400> 124					
20	ttaattaa					8
	<210> 125					
	<211> 141					
	<212> ДНК					
	<213> Искусственная последовательность					
25	<220>					
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид					
	<400> 125					
	aataaacgat aacgccgttg gtggcgtgag gcatgtaaaa ggttacatca ttatcttggt					60
	cgccatccgg ttggtataaa tagacgttca tgttggtttt tgtttcagtt gcaagttggc					120
30	tgcggcgcgc gcagcacctt t					141
	<210> 126					
	<211> 317					
	<212> ДНК					
	<213> Искусственная последовательность					
35	<220>					
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид					
	<400> 126					
	ggtgtggaaa gtccccaggc tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt					60
	agtcagcaac caggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca					120
40	tgcattctcaa ttagtcagca accatagtcc cgcccctaac tccgccatc ccgcccctaa					180
	ctccgcccag ttccgcccct tctccgcccc atggctgact aatttttttt atttatgcag					240
	aggccgaggc cgcctcggcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc ttttttgag					300
	gcctaggctt ttgcaaa					317
	<210> 127					
45	<211> 72					
	<212> ДНК					
	<213> Искусственная последовательность					
	<220>					

	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид	
	<400> 127	
5	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg ассааaggtc gcccgacggc ctcagtgagc gagcgaгсgc gc	60 72
	<210> 128	
	<211> 60	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
10	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид	
	<400> 128	
15	gagacagaca cactcctgct atgggtactg ctgctctggg ttccaggttc cactggtgac	60
	<210> 129	
	<211> 1260	
	<212> ДНК	
	<213> Аденоассоциированный вирус - 2	
	<400> 129	
20	atggagctgg tcgggtggct cgtggacaag gggattacct cggagaagca gtggatccag	60
	gaggaccagg cctcatacat ctccctcaat gcggcctcca actcgcggtc ccaaatcaag	120
	gctgccttgg асаатgcggg aaagattatg агсctgacta aaaccgcccc cgactacctg	180
	gtgggссagc агсccgtgga ggacatttcc агсаатсgga tttataaaat tttggaacta	240
	aacgggtacg atccccaaata tgcggcttcc gtctttctgg gatgggссac gaaaaagttc	300
25	ggcaagagga acaccatctg gctgtttggg cctgcaacta ccgggaagac caacatcgcg	360
	gaggccatag cccacactgt gcccttctac gggtgсgtaa actggaccaа tgagaacttt	420
	cccttcaacg actgtgtcga caagatggtg atctggtggg агgaggggaa gatgaccgcc	480
	aaggtcgtgg агtcggccaa агссаттctc ggaggaagca агgtgcgcgt ggaccagaaa	540
	tgcaagtcct cggcccagat агacccgact cccgtgatcg tcacctcaa caccaacatg	600
30	tgcgcgtga ttgacgggaa ctcaacgacc ttcgaacacc агсagccgtt gcaagaccgg	660
	atgttcaaat ttgaactcac ccgccgtctg gatcatgact ttgggaaggt caccaagcag	720
	gaagtcaaaг actttttccg gtgggcaaaг gatcacgtgg ttgaggtgga gcatgaattc	780
	tacgtcaaaa агgggtggagc caagaaaaga cccgccccca gtgacgcaga tataagtгag	840
	cccaaacggg tgcgcgagtc агttgсgсag ccatcgacgt cagacgcgga агcttcgatc	900
35	aactacgcag acaggtacca aaacaaatgt tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg	960
	tttccctgca gacaatgcga gagaatgaat cagaattcaa atatctgctt cactcacgga	1020
	сagaaaгact gtttagagtg ctttcccgtg tcagaatctc aacccgtttc gtсgtсcaaa	1080
	aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat catatcatgg gaaaggtgcc агacgcttgс	1140
	actgcctgcg atctggtcaa tgtggatttg gatgactgca tctttgaca ataaatgatt	1200
40	taaatcaggt atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca ctctctctga	1260
	<210> 130	
	<211> 1932	
	<212> ДНК	
	<213> Аденоассоциированный вирус - 2	
45	<400> 130	
	atgccgggggt tttacgagat tgtgattaag gtccccagcg accttgacga gcatctgccc	60
	ggcatttctg acagctttgt gaactgggtg gccgagaagg aatgggagtt gccgccagat	120
	tctgacatgg atctgaatct gattgagcag gcaccсctga ccgtggccga gaagctgcag	180

	cgcgactttc	tgacggaatg	gcgccgtgtg	agtaaggccc	cggaggccct	tttctttgtg	240
	caatttgaga	agggagagag	ctacttccac	atgcacgtgc	tcgtggaaac	caccggggtg	300
	aatccatgg	ttttgggacg	tttcctgagt	cagattcgcg	aaaaactgat	tcagagaatt	360
	taccgcgggg	tcgagccgac	tttgccaaac	tggttcgcg	tcacaaagac	cagaaatggc	420
5	gccggaggcg	ggaacaaggt	ggtggatgag	tgctacatcc	ccaataactt	gctcccaaaa	480
	accagcctg	agctccagtg	ggcgtggact	aatatggaac	agtatttaag	cgctgtttg	540
	aatctcacgg	agcgtaaacg	gttggtggcg	cagcatctga	cgcacgtgtc	gcagacgcag	600
	gagcagaaca	aagagaatca	gaatcccaat	tctgatgcgc	cggatgatcag	atcaaaaact	660
	tcagccaggt	acatggagct	ggtcgggtgg	ctcgtggaca	aggggattac	ctcggagaag	720
10	cagtggatcc	aggaggacca	ggcctcatac	atctccttca	atgcggcctc	caactcgcgg	780
	tcccaaatca	aggctgcctt	ggacaatg	ggaaagatta	tgagcctgac	taaaaccgcc	840
	cccgactacc	tggtgggcca	gcagcccgtg	gaggacat	ccagcaatcg	gatttataaa	900
	atthtggaa	taaacgggta	cgatcccaaa	tatgcggctt	ccgtctttct	gggatggg	960
	acgaaaaagt	tcggcaagag	gaacaccatc	tggctgtttg	ggcctgcaac	taccgggaag	1020
15	accaacatcg	cggaggccat	agcccacact	gtgcccttct	acgggtgctg	aaactggacc	1080
	aatgagaact	ttcccttcaa	cgactgtgtc	gacaagatgg	tgatctgggtg	ggaggagggg	1140
	aagatgaccg	ccaaggctcg	ggagtcggcc	aaagccattc	tcggaggaag	caaggtgcgc	1200
	gtggaccaga	aatgcaagtc	ctcggcccag	atagaccoga	ctcccgtgat	cgtcacctcc	1260
	aacaccaaca	tgtgcgccgt	gattgacggg	aactcaacga	ccttcgaaca	ccagcagccg	1320
20	ttgcaagacc	ggatgttcaa	atthtgaact	accgcctg	tggatcatga	ctthtgggaag	1380
	gtcaccaagc	aggaagtcaa	agactthttc	cgggtgggcaa	aggatcacgt	ggttgagggtg	1440
	gagcatgaat	tctacgtcaa	aaagggtgga	gccaaagaaa	gaccgcctcc	cagtgacgca	1500
	gatataagtg	agcccaaacg	ggtgcgcgag	tcagttgcgc	agccatcgac	gtcagacgcg	1560
	gaagcttcga	tcaactacgc	agacaggtac	caaaacaaat	gttctcgtca	cgtgggcatg	1620
25	aatctgatgc	tgtthtccctg	cagacaatgc	gagagaatga	atcagaattc	aaatatctgc	1680
	ttcactcacg	gacagaaaaga	ctgtthtagag	tgctthtccc	tgtcagaatc	tcaaccctgt	1740
	tctgtcgtca	aaaaggcgta	tcagaaactg	tgctacattc	atcatatcat	gggaaagggtg	1800
	ccagacgctt	gcactgcctg	cgatctggtc	aatgtggatt	tggatgactg	catctthttaa	1860
	caataaatga	thtaaatcag	gtatggctgc	cgatggttat	ctthcagatt	ggctcgagga	1920
30	cactctctct	ga					1932
	<210>	131					
	<211>	1876					
	<212>	ДНК					
	<213>	Искусственная последовательность					
35	<220>						
	<223>	Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид					
	<400>	131					
	cgcagccacc	atggcggggt	tttacgagat	tgtgattaag	gtcccagcgc	accttgacgg	60
	gcatctgccc	ggcatttctg	acagctthtgt	gaaactggggtg	gccgagaagg	aatgggagtt	120
40	gccgccagat	tctgacatgg	atctgaaatct	gattgagcag	gcaccctga	ccgtggccga	180
	gaagctgcag	cgcgactttc	tgacggaatg	gcgccgtgtg	agtaaggccc	cggaggccct	240
	tttctttgtg	caatttgaga	agggagagag	ctacttccac	atgcacgtgc	tcgtggaaac	300
	caccggggtg	aatccatgg	ttttgggacg	tttcctgagt	cagattcgcg	aaaaactgat	360
	tcagagaatt	taccgcggga	tcgagccgac	tttgccaaac	tggttcgcg	tcacaaagac	420
45	cagaaatggc	gccggaggcg	ggaacaaggt	ggtggatgag	tgctacatcc	ccaataactt	480
	gctcccaaaa	accagcctg	agctccagtg	ggcgtggact	aatatggaac	agtatttaag	540
	cgctgtht	aatctcacgg	agcgtaaacg	gttggtggcg	cagcatctga	cgcacgtgtc	600
	gcagacgcag	gagcagaaca	aagagaatca	gaatcccaat	tctgatgcgc	cggatgatcag	660

	atcaaaaact	tcagccaggt	acatggagct	ggtcgggtgg	ctcgtggaca	aggggattac	720
	ctcggagaag	cagtggatcc	aggaggacca	ggcctcatac	atctccttca	atgcggcctc	780
	caactcgcgg	tcccaaatca	aggctgcctt	ggacaatgcg	ggaaagatta	tgagcctgac	840
	taaaaccgcc	cccgactacc	tgttgggcca	gcagcccgtg	gaggacattt	ccagcaatcg	900
5	gatttataaa	atthttggaac	taaacgggta	cgatcccca	tatgctggctt	ccgtctttct	960
	gggatggggc	acgaaaaagt	tcggcaagag	gaacaccatc	tggctgtttg	ggcctgcaac	1020
	taccgggaag	accaacatcg	cggaggccat	agcccacact	gtgcccttct	acgggtgcgt	1080
	aaactggacc	aatgagaact	ttcccttcaa	cgactgtgtc	gacaagatgg	tgatctgggtg	1140
	ggaggagggg	aagatgaccg	ccaaggtcgt	ggagtcggcc	aaagccattc	tcggaggaag	1200
10	caaggtgcgc	gtggaccaga	aatgcaagtc	ctcggcccag	atagaccgca	ctcccgtgat	1260
	cgtcacctcc	aacaccaaca	tgtgcgccgt	gattgacggg	aactcaacga	ccttcgaaca	1320
	ccagcagccg	ttgcaagacc	ggatgttcaa	atthtgaactc	acccgccgtc	tggatcatga	1380
	ctthtgggaag	gtcaccaagc	aggaaagtcaa	agactthtttc	cggtgggcaa	aggatcacgt	1440
	ggttgagggtg	gagcatgaat	tctacgtcaa	aaaggggtgga	gccaagaaaa	gaccgcgcc	1500
15	cagtgacgca	gatataagtg	agcccaaacg	ggtgcgcgag	tcagttgctc	agccatcgac	1560
	gtcagacgcg	gaagcttcga	tcaactacgc	agacaggtac	caaaacaaat	gthctctgta	1620
	cgthggcatg	aatctgatgc	tgtthccctg	cagacaatgc	gagagaatga	atcagaatth	1680
	aaatatctgc	ttcactcacg	gacagaaaaga	ctgtthtagag	tgctthcccg	tgthcagaatc	1740
	tcaaccgctt	tctgtcgtca	aaaagggctg	tcagaaactg	tgctacattc	atcatatcat	1800
20	gggaaagggtg	ccagacgctt	gcaactgcctg	cgatctggtc	aatgtggatt	tggatgactg	1860
	catctthtga	caataa					1876
	<210>	132					
	<211>	1194					
	<212>	ДНК					
25	<213>	Искусственная последовательность					
	<220>						
	<223>	Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид					
	<400>	132					
	atggagctgg	tcgggtggct	cgthggacaag	gggattacct	cggagaagca	gtggatccag	60
30	gaggaccagg	cctcatacat	ctccttcaat	gctggcctcca	actcgcggtc	ccaaatcaag	120
	gctgccttgg	acaatgcggg	aaagattatg	agcctgacta	aaaccgcccc	cgactacctg	180
	gtggggccagc	agcccgthgga	ggacatthtcc	agcaatcgga	thtataaaaat	thtggaaacta	240
	aacgggtacg	atccccaaata	tgcggcttcc	gtctthtctgg	gatggggccac	gaaaaagthc	300
	ggcaagagga	acaccatctg	gctgthtggg	cctgcaacta	ccgggaagac	caacatcgcg	360
35	gaggccatag	cccacactgt	gcccttctac	gggtgctgtaa	actggacca	tgagaactth	420
	cccttcaacg	actgtgtcga	caagatgggtg	atctggthggg	aggaggggaa	gatgaccgcc	480
	aaggthcgtgg	agthcggccaa	agccattctc	ggaggaagca	aggtgctcgt	ggaccagaaa	540
	thcaagthcct	cggcccagat	agaccgact	cccgtgatcg	thcactcca	caaccaatg	600
	thcgcctgthg	thgacgggaa	ctcaacgacc	thcgaacacc	agcagccgtt	gcaagaccgg	660
40	atgthtcaaat	thgaaactcac	ccgcccgtctg	gatcatgact	thtgggaaggt	caaccaagcag	720
	gaagthcaaa	actthtthtccg	gtggggcaaa	gatcacgtgg	thtgaggtgga	gcatgaaatc	780
	thcgtcaaaa	agggtggagc	caagaaaaga	cccgcctcca	gtgacgcaga	tataagthgag	840
	cccaaacggg	thcgcgcgagthc	agthtgcgcag	ccatcgactg	cagacgcgga	agctthcgatc	900
	aactacgcag	accgctacca	aaacaaatgt	thctcgtcacg	thtggcatgaa	thctgatgctg	960
45	thtccctgca	gacaatgcga	gagaatgaa	cagaatthca	atathctgctt	cactcacgga	1020
	cagaaagact	gthttagagthg	ctthtcccgtg	thcagaatctc	aaccgthtthc	thctcgtcaaa	1080
	aaggthcgtatc	agaaactgthg	ctacattcat	catatcatg	gaaaggtgcc	agacgctthg	1140
	actgcctgcg	atctggthcaa	thtggattht	gatgactgca	thtthtgaaca	ataa	1194

<210> 133

<211> 1876

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

5 <220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

<400> 133

```

cgcagccacc atggcgggggt tttacgagat tgtgattaag gtccccagcg accttgacgg      60
gcatctgccc ggcatttctg acagctttgt gaactgggtg gccgagaagg aatgggagtt      120
10 gccgccagat tctgacatgg atctgaatct gattgagcag gcaccctga ccgtggccga
gaagctgcag cgcgactttc tgacggaatg gcgccgtgtg agtaaggccc cggaggccct      240
tttctttgtg caatttgaga agggagagag ctacttccac atgcacgtgc tcgtggaaac      300
caccgggggtg aaatccatgg ttttgggacg tttcctgagt cagattcgcg aaaaactgat      360
tcagagaatt taccgcggga tcgagccgac tttgccaaac tggttcgcgg tcacaaagac      420
15 cagaaatggc gccggaggcg ggaacaagggt ggtggatgag tgctacatcc ccaattactt
gctccccaaa acccagcctg agctccagtg ggcgtggact aatatggaac agtatttaag      540
cgctgtttg aatctcacgg agcgtaaaacg gttggtggcg cagcatctga cgcacgtgtc      600
gcagacgcag gagcagaaca aagagaatca gaatcccaat tctgatgcgc cggtgatcag      660
atcaaaaaact tcagccaggt acatggagct ggtcgggtgg ctctgggaca aggggattac      720
20 ctcggagaag cagtggatcc aggaggacca ggctcatac atctccttca atgcggcctc
caactcgcgg tcccaaatca aggctgcctt ggacaatgcg ggaagatta tgagcctgac      840
taaaaccgcc cccgactacc tggtgggcca gcagcccgtg gaggacattt ccagcaatcg      900
gatttataaa attttggaac taaacgggta cgatcccca taatgcggctt ccgtctttct      960
gggatgggccc acgaaaaagt tcggcaagag gaacaccatc tggctgtttg ggctgcaac     1020
25 taccgggaag ассаасатсг сggaggccat агсссасасг гtgccttct acgggtgcgt     1080
aaactggacc aatgagaact ttcccttcaa cgactgtgtc gacaagatgg tgatctggtg     1140
ggaggagggg aagatgaccg ccaaggtcgt ggagtcggcc aaagccattc tcggaggaag     1200
caaggtgcgc gtggaccaga aatgcaagtc ctcggcccg atagaccga ctcccgtgat     1260
cgtcacctcc aacaccaaca tgtgcgccgt gattgacggg aactcaacga ccttcgaaca     1320
30 ccagcagccg ttgcaagacc ggatgttcaa atttgaactc acccgccgtc tggatcatga     1380
ctttgggaag gtcaccaagc aggaagtcaa agactttttc cggtgggcaa aggatcacgt     1440
ggttgagggtg gagcatgaat tctacgtcaa aaagggtgga gcccaagaaa gaccgcccc     1500
cagtgacgca gatataagtg agcccaaacg ggtgcgcgag tcagttgcgc agccatcgac     1560
gtcagacgcg gaagcttсgа tcaactacgc agacaggtac caaaacaaat gttctctgca     1620
35 cgtgggcatg aatctgatgc tgtttccctg cagacaatgc gagagaatga atcagaattc     1680
aaatatctgc ttcactcacg gacagaaaга ctgtttagag tgctttcccг tgtcagaatc     1740
tcaacccgtt tctgtcgtca aaaaggcgta tcagaaactg tgctacattc atcatatcat     1800
gggaaagggtg ccagacgctt gcactgcctg cgatctggtc aatgtggatt tggatgactg     1860
catctttgaa caataa
1876

```

40 <210> 134

<211> 51

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

45 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид

<400> 134

ctaggccgcc cgggcaaacg ccgggcgctc ggcgacctt ggtcggccg c 51

<210> 135
 <211> 65
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 5 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид
 <400> 135
 ctaggactga ggccgcccgg gcaaaagcccg ggcgtcgggc gacctttggt cgcccgccct 60
 10 cagtc 65
 <210> 136
 <211> 67
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 15 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид
 <400> 136
 ggactgaggc cggccgggca aagcccgggc gtcgggcgac ctttggtcgc ccggcctcag 60
 20 tcctgca 67
 <210> 137
 <211> 41
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 25 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид
 <400> 137
 gtgcgggsga ccaaaggctcg cccgacgccc gggcgcactc a 41
 30 <210> 138
 <211> 56
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 35 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид
 <400> 138
 ggactgaggc cgggsgacca aaggctcgccc gacgcccggg cggcctcagt cctgca 56
 <210> 139
 40 <211> 54
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 45 олигонуклеотид
 <400> 139
 ctaggactga ggccgcccgg gcgtcggggc acctttggtc gcccgccctc agtc 54
 <210> 140

<211> 48
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 5 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид
 <400> 140
 ggactgaggc cgggscgacca aaggctcgccc gacggcctca gtcctgca 48
 <210> 141
 10 <211> 46
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 15 олигонуклеотид
 <400> 141
 ctaggactga ggccgctcggg cgacctttgg tcgcccggcc tcagtc 46
 <210> 142
 <211> 67
 20 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид
 25 <400> 142
 ggactgaggc ccgggscgacc aaaggctcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcgcctcag 60
 tcctgca 67
 <210> 143
 <211> 47
 30 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид
 35 <400> 143
 atacctaggc acgcgtgtta ctagttatta atagtaatca attacgg 47
 <210> 144
 <211> 29
 <212> ДНК
 40 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид
 <400> 144
 45 atacctaggg gccgcacgcg tgttactag 29
 <210> 145
 <211> 42
 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид

5 <400> 145

atacaactcag tgcctgcagg cacgtggtcc ggagatccag ac

42

<210> 146

<211> 3754

<212> ДНК

10 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

<400> 146

	cctaggtgag	cgagcagcgc	cgacagagagg	gagtggccaa	ctccatcaact	aggggttcct	60
15	tgtagttaat	gattaacccg	ccatgctact	tatcgcgcc	gctcaatatt	ggccattagc	120
	catattattc	attggttata	tagcataaat	caatattggc	tattggccat	tgcatagctt	180
	gtatctatat	cataatatgt	acatttatat	tggctcatgt	ccaatatgac	cgccatgttg	240
	gcattgatta	ttgactagtt	attaatagta	atcaattacg	gggtcattag	ttcatagccc	300
	atatatggag	ttccgcgta	cataacttac	ggtaaatggc	ccgcctggct	gaccgcccaa	360
20	cgacccccgc	ccattgacgt	caataatgac	gtatgttccc	atagtaacgc	caatagggac	420
	tttccattga	cgtcaatggg	tggagtattt	acggtaaact	gcccacttgg	cagtacatca	480
	agtgtatcat	atgccaagtc	cgccccctat	tgacgtcaat	gacggtaa	ggcccgcctg	540
	gcattatgcc	cagtacatga	ccttacggga	ctttcctact	tggcagtaca	tctacgtatt	600
	agtcacgcgt	attaccatgg	tcgaggtgag	cccacgctt	tgcttcactc	tccccatctc	660
25	ccccccctcc	ccacccccaa	ttttgtattt	atthattttt	taattatttt	gtgcagcgat	720
	gggggcgggg	gggggggggg	ggcgcgcgcc	aggcggggcg	gggcgggg	aggggcgggg	780
	cggggcgagg	cggagaggtg	cgcggcgagc	caatcagagc	ggcgcgctcc	gaaagtttcc	840
	ttttatggcg	aggcggcggc	ggcggcggcc	ctataaaaag	cgaagcgcgc	ggcggg	900
	agtcgctgcg	acgctgcctt	cgccccgtgc	cccgcctccg	cgccgcctcg	cgccgcccgc	960
30	cccggctctg	actgaccgcg	ttactcccac	agggtgagcgg	gcgggacggc	ccttctcctc	1020
	cgggctgtaa	ttagcgcttg	gtttaatgac	ggcttgtttc	ttttctgtgg	ctgctgaaa	1080
	gccttgaggg	gctccgggag	ggccctttgt	gcgggggga	gcggctcggg	gggtgcgtgc	1140
	gtgtgtgtgt	gcgtggggag	cgccgcgtgc	ggcccgcgt	gcccggcggc	tgtgagcgt	1200
	gcgggcgcg	cgcggggctt	tgtgcgctcc	gcagtggtcg	cgaggggagc	gcggccgggg	1260
35	gcggtgcccc	gcggtgcggg	gggggctgcg	aggggaacaa	aggctgcgtg	cggggtgtgt	1320
	gcgtgggggg	gtgagcaggg	ggtgtggg	cggcggtcgg	gctgtaacc	ccccctgcac	1380
	ccccctcccc	gagttgctga	gcacggcccc	gcttcgggtg	cggggctccg	tacggggcgt	1440
	ggcgcggggc	tcgccgtgcc	ggcggggggg	tggcggcagg	tgggggtgcc	ggcgggggcg	1500
	gggcccctc	gggcccggga	gggctcgggg	gagggg	gcggcccccg	gagcgccggc	1560
40	ggctgtcgag	gcgcggcgag	ccgcagccat	tgcttttat	ggtaatcgtg	cgagagggcg	1620
	cagggacttc	ctttgtccca	aatctgtg	gagccgaaat	ctgggagggc	ccgccgcacc	1680
	ccctctagcg	ggcgcggggc	gaagcggtgc	ggcgccggca	ggaaggaaat	ggcgggggag	1740
	ggccttcgtg	cgtcgccg	ccgccgtccc	cttctccctc	tccagcctcg	gggctgtccg	1800
	cggggggacg	gctgccttcg	ggggggacgg	ggcagggcgg	ggttcggctt	ctggcgtgtg	1860
45	accggcggtc	ctagagcctc	tgctaaccat	gttttagcct	tcttcttttt	cctacagctc	1920
	ctgggcaacg	tgctggttat	tgtgctgtct	catcatttgt	cgacagaatt	cctcgaagat	1980
	ccgaaggggt	tcaagcttgg	cattccggtg	ctgttggtaa	agccagtta	aacgccgcca	2040
	ccatgggtgag	caagggcgag	gagctgttca	ccgggggtgt	gcccacctcg	gtcgagctgg	2100

	acggcgacgt	aaacggccac	aagttcagcg	tgtccggcga	gggcgagggc	gatgccacct	2160
	acggcaagct	gaccctgaag	ttcatctgca	ccaccggcaa	gctgcccgtg	ccctggccca	2220
	ccctcgtgac	caccctgacc	tacggcgtgc	agtgcttcag	ccgctacccc	gaccacatga	2280
	agcagcacga	cttcttcaag	tccgccatgc	ccgaaggcta	cgtccaggag	cgcaccatct	2340
5	tcttcaagga	cgacggcaac	tacaagacc	gcgccgaggt	gaagttcgag	ggcgacaccc	2400
	tggtgaaccg	catcgagctg	aagggcatcg	acttcaagga	ggacggcaac	atcctggggc	2460
	acaagctgga	gtacaactac	aacagccaca	acgtctatat	catggccgac	aagcagaaga	2520
	acggcatcaa	ggtgaacttc	aagatccgcc	acaacatcga	ggacggcagc	gtgcagctcg	2580
	ccgaccacta	ccagcagaac	acccccatcg	gcgacggccc	cgtgctgctg	cccgacaacc	2640
10	actacctgag	caccagatcc	gccctgagca	aagaccccaa	cgagaagcgc	gatcacatgg	2700
	tcttgctgga	gttcgtgacc	gccgccggga	tactctcctg	catggacgag	ctgtacaagt	2760
	aattaattaa	gagcatctta	ccgccattta	ttcccatatt	tgttctgttt	ttcttgattt	2820
	gggtatacat	ttaaagtgtta	ataaaacaaa	atggtggggc	aatcatttac	atTTTTaggg	2880
	atatgtaatt	actagttcag	gtgtattgcc	acaagacaaa	catgttaaga	aactttcccg	2940
15	ttatttacgc	tctgttcctg	ttaatcaacc	tctggattac	aaaatttgtg	aaagattgac	3000
	tgatattcct	aactatgttg	ctccttttac	gctgtgtgga	tatgctgctt	tatagcctct	3060
	gtatctagct	attgcttccc	gtacggcttt	cgttttctcc	tccttgata	aatcctggtt	3120
	gctgtctcct	ttagaggagt	tgtggcccgt	tgtccgtcaa	cgtggcgtgg	tgtgctctgt	3180
	gtttgctgac	gcaacccccca	ctggctgggg	cattgccacc	acctgtcaac	tcctttctgg	3240
20	gactttcgct	ttccccctcc	cgatcgccac	ggcagaactc	atcgccgcct	gccttgcccg	3300
	ctgctggaca	ggggctaggt	tgctggggcac	tgataattcc	gtgggtgttg	ctgtgccttc	3360
	tagttgccag	ccatctgttg	tttgcccctc	ccccgtgcct	tccttgacc	tggaagggtc	3420
	cactcccact	gtcctttcct	aataaaaatga	ggaaattgca	tcgcattgtc	tgagtaggtg	3480
	tcattctatt	ctgggggggtg	gggtggggca	ggacagcaag	ggggaggatt	gggaagacaa	3540
25	tagcaggcat	gctgggggatg	cggtggggctc	tatggctcta	gagcatggct	acgtagataa	3600
	gtagcatggc	gggttaaatca	ttaactacac	ctgcagcagg	aaccctagt	gatggagtgt	3660
	gccactccct	ctctgcgcgc	tcgctcgctc	cctgcaggac	tgaggccggg	cgaccaaagg	3720
	tcgcccagcg	cccgggcggc	ctcagtcctg	cagg			3754
	<210>	147					
30	<211>	8418					
	<212>	ДНК					
	<213>	Искусственная последовательность					
	<220>						
	<223>	Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид					
35	<400>	147					
	ggcagctgcg	cgctcgctcg	ctcacctagg	ccgcccgggc	aaagcccggg	cgtcgggcga	60
	cctttgggtcg	cccggcctag	gtgagcagc	gagcgcgag	agagggagtg	gccaaactcca	120
	tcactagggg	ttccttgtag	ttaatgatta	accgccatg	ctacttatcg	cggccgctca	180
	atattggcca	ttagccatat	tattcattgg	ttatatagca	taaatacaata	ttggctattg	240
40	gccattgcat	acgttgatc	tatatcataa	tatgtacatt	tatattggct	catgtccaat	300
	atgaccgcca	tgttggcatt	gattattgac	tagttattaa	tagtaatcaa	ttacggggtc	360
	attagttcat	agcccatata	tggagtccg	cgttacataa	cttacggtaa	atggcccgc	420
	tggtgaccg	cccaacgacc	cccgccatt	gacgtcaata	atgacgtatg	ttcccatagt	480
	aacgccaata	gggactttcc	attgacgtca	atgggtggag	tatttacggg	aaactgcca	540
45	cttggcagta	catcaagtgt	atcatatgcc	aagtccggcc	cctattgacg	tcaatgacgg	600
	taaattggccc	gcctggcatt	atgcccagta	catgacctta	cgggactttc	ctacttgga	660
	gtacatctac	gtattagtca	tcgctattac	catggctcag	gtgagcccca	cgttctgctt	720
	cactctcccc	atctcccccc	cctccccacc	cccaattttg	tatttattta	ttttttaatt	780

	at t t t t g t g c a	g c g a t g g g g g	c g g g g g g g g g	g g g g g g g c g c	g c g c c a g g c g	g g g c g g g g c g	840
	g g g c g a g g g g	c g g g g c g g g g	c g a g g c g g a g	a g g t g c g g c g	g c a g c c a a t c	a g a g c g g c g c	900
	g c t c c g a a a g	t t t c c t t t t a	t g g c g a g g c g	g c g g c g g c g g	c g g c c c t a t a	a a a a g c g a a g	960
	c g c g c g g c g g	g c g g g a g t c g	c t g c g a c g c t	g c c t t c g c c c	c g t g c c c c g c	t c c g c c g c c g	1020
5	c c t c g c g c c g	c c c g c c c c g g	c t c t g a c t g a	c c g c g t t a c t	c c c a c a g g t g	a g c g g g c g g g	1080
	a c g g c c c t t c	t c c t c c g g g c	t g t a a t t a g c	g c t t g g t t t a	a t g a c g g c t t	g t t t c t t t t c	1140
	t g t g g c t g c g	t g a a a g c c t t	g a g g g g c t c c	g g g a g g g c c c	t t t g t g c g g g	g g g g a g c g g c	1200
	t c g g g g g g t g	c g t g c g t g t g	t g t g t g c g t g	g g g a g c g c c g	c g t g c g g c c c	g c g c t g c c c g	1260
	g c g g c t g t g a	g c g c t g c g g g	c g c g g c g c g g	g g c t t t g t g c	g c t c c g c a g t	g t g c g c g a g g	1320
10	g g a g c g c g g c	c g g g g g c g g t	g c c c c g c g g t	g c g g g g g g g g	c t g c g a g g g g	a a c a a a g g c t	1380
	g c g t g c g g g g	t g t g t g c g t g	g g g g g t g a g	c a g g g g t g t	g g g c g c g g c g	g t c g g g c t g t	1440
	a a c c c c c c c c	t g c a c c c c c c	t c c c c g a g t t	g c t g a g c a c g	g c c c g g c t t c	g g g t g c g g g g	1500
	c t c c g t a c g g	g g c g t g g c g c	g g g g c t c g c c	g t g c c g g g c g	g g g g t g g c g	g c a g g t g g g g	1560
	g t g c c g g g c g	g g g c g g g g c c	g c c t c g g g c c	g g g g a g g g c t	c g g g g a g g g g	g c g c g g c g g c	1620
15	c c c c g g a g c g	c c g g c g g c t g	t c g a g g c g c g	g c g a g c c g c a	g c c a t t g c c t	t t t a t g g t a a	1680
	t c g t g c g a g a	g g g c g c a g g g	a c t t c c t t t g	t c c c a a a t c t	g t g c g g a g c c	g a a a t c t g g g	1740
	a g g c g c c c g c	g c a c c c c c t c	t a g c g g g c g c	g g g g c g a a g c	g g t g c g g c g c	c g g c a g g a a g	1800
	g a a a t g g g c g	g g g a g g g c c t	t c g t g c g t c g	c c g c g c c g c c	g t c c c c t t c t	c c c t c t c c a g	1860
	c c t c g g g g c t	g t c c c g c g g g	g g a c g g c t g c	c t t c g g g g g g	g a c g g g g c a g	g g c g g g g t t c	1920
20	g g c t t c t g g c	g t g t g a c c g g	c g g c t c t a g a	g c c t c t g c t a	a c c a t g t t t t	a g c t t t c t t c	1980
	t t t t t c c t a c	a g c t c c t g g g	c a a c g t g c t g	g t t a t t g t g c	t g t c t c a t c a	t t t g t c g a c a	2040
	g a a t t c c t c g	a a g a t c c g a a	g g g g t t c a a g	c t t g g c a t t c	c g g t a c t g t t	g g t a a a g c c a	2100
	g t t t a a a c g c	c g c c a c c a t g	g t g a g c a a g g	g c g a g g a g c t	g t t c a c c g g g	g t g g t g c c c a	2160
	t c c t g g t c g a	g c t g g a c g g c	g a c g t a a a c g	g c c a c a a g t t	c a g c g t g t c c	g g c g a g g g c g	2220
25	a g g g c g a t g c	c a c c t a c g g c	a a g c t g a c c c	t g a a g t t c a t	c t g c a c c a c c	g g c a a g c t g c	2280
	c c g t g c c c t g	g c c c a c c c t c	g t g a c c a c c c	t g a c c t a c g g	c g t g c a g t g c	t t c a g c c g c t	2340
	a c c c c g a c c a	c a t g a a g c a g	c a c g a c t t c t	t c a a g t c c g c	c a t g c c c g a a	g g c t a c g t c c	2400
	a g g a g c g c a c	c a t c t t c t t c	a a g g a c g a c g	g c a a c t a c a a	g a c c c g c g c c	g a g g t g a a g t	2460
	t c g a g g g c g a	c a c c c t g g t g	a a c c g c a t c g	a g c t g a a g g g	c a t c g a c t t c	a a g g a g g a c g	2520
30	g c a a c a t c c t	g g g g c a c a a g	c t g g a g t a c a	a c t a c a a c a g	c c a c a a c g t c	t a t a t c a t g g	2580
	c c g a c a a g c a	g a a g a a c g g c	a t c a a g g t g a	a c t t c a a g a t	c c g c c a c a a c	a t c g a g g a c g	2640
	g c a g c g t g c a	g c t c g c c g a c	c a c t a c c a g c	a g a a c a c c c c	c a t c g g c g a c	g g c c c c g t g c	2700
	t g c t g c c c g a	c a a c c a c t a c	c t g a g c a c c c	a g t c c g c c c t	g a g c a a a g a c	c c c a a c g a g a	2760
	a g c g c g a t c a	c a t g g t c c t g	c t g g a g t t c g	t g a c c g c c g c	c g g g a t c a c t	c t c g g c a t g g	2820
35	a c g a g c t g t a	c a a g t a a t t a	a t t a a g a g c a	t c t t a c c g c c	a t t t a t t c c c	a t a t t t g t t c	2880
	t g t t t t t c t t	g a t t t g g g t a	t a c a t t t a a a	t g t t a a t a a a	a c a a a a t g g t	g g g g c a a t c a	2940
	t t t a c a t t t t	t a g g g a t a t g	t a a t t a c t a g	t t c a g g t g t a	t t g c c a c a a g	a c a a a c a t g t	3000
	t a a g a a a c t t	t c c c g t t a t t	t a c g c t c t g t	t c c t g t t a a t	c a a c c t c t g g	a t t a c a a a a t	3060
	t t g t g a a a g a	t t g a c t g a t a	t t c t t a a c t a	t g t t g c t c c t	t t t a c g c t g t	g t g g a t a t g c	3120
40	t g c t t t a t a g	c c t c t g t a t c	t a g c t a t t g c	t t c c c g t a c g	g c t t t c g t t t	t c t c c t c c t t	3180
	g t a t a a a t c c	t g g t t g c t g t	c t c t t t t a g a	g g a g t t g t g g	c c c g t t g t c c	g t c a a c g t g g	3240
	c g t g g t g t g c	t c t g t g t t t g	c t g a c g c a a c	c c c c a c t g g c	t g g g g c a t t g	c c a c c a c c t g	3300
	t c a a c t c c t t	t c t g g g a c t t	t c g c t t t c c c	c c t c c c g a t c	g c c a c g g c a g	a a c t c a t c g c	3360
	c g c c t g c c t t	g c c c g c t g c t	g g a c a g g g g c	t a g g t t g c t g	g g c a c t g a t a	a t t c c g t g g t	3420
45	g t t g t c t g t g	c c t t c t a g t t	g c c a g c c a t c	t g t t g t t t g c	c c c t c c c c c g	t g c e t t c e t t	3480
	g a c c c t g g a a	g g t g c c a c t c	c c a c t g t c c t	t t c c t a a t a a	a a t g a g g a a a	t t g c a t c g c a	3540
	t t g t c t g a g t	a g g t g t c a t t	c t a t t c t g g g	g g g t g g g g t g	g g g c a g g a c a	g c a a g g g g g a	3600
	g g a t t g g g a a	g a c a a t a g c a	g g c a t g c t g g	g g a t g c g g t g	g g c t c t a t g g	c t c t a g a g c a	3660

	tggctacgta	gataagtagc	atggcggggtt	aatcattaac	tacacctgca	gcaggaaccc	3720
	ctagtgatgg	agttggccac	tccctctctg	cgcgctcgct	cgctccctgc	aggactgagg	3780
	ccgggcgacc	aaaggtcgcc	cgacgcccgg	gcggcctcag	tcctgcaggg	agcgagcgag	3840
	cgcgagctg	cctgcacggg	cgcgccggta	ccgggagatg	ggggaggcta	actgaaacac	3900
5	ggaaggagac	aataccgga	ggaacccgcg	ctatgacggc	aataaaaaga	cagaataaaa	3960
	cgcacgggtg	ttgggtcgtt	tgttcataaa	cgcggggttc	ggtcccaggg	ctggcactct	4020
	gtcgataccc	caccgagacc	ccattgggac	caatacgccc	gcgtttcttc	cttttcccca	4080
	ccccaacccc	caagttcggg	tgaaggccca	gggctcgcag	ccaacgtcgg	ggcggcaagc	4140
	cctgccatag	ccactacggg	tacgtaggcc	aaccactaga	actatagcta	gagtcctggg	4200
10	cgaaacaaacg	atgctcgcct	tccagaaaac	cgaggatgcg	aaccacttca	tcgggggtca	4260
	gcaccaccgg	caagcgccgc	gacggccgag	gtctaccgat	ctcctgaagc	cagggcagat	4320
	ccgtgcacag	caccttgccg	tagaagaaca	gcaaggccgc	caatgcctga	cgatgcgtgg	4380
	agaccgaaac	cttgcgctcg	ttcgccagcc	aggacagaaa	tgctcgcact	tcgctgctgc	4440
	ccaaggttgc	cgggtgacgc	acaccgtgga	aacggatgaa	ggcacgaacc	cagttgacat	4500
15	aagcctgttc	ggttcgtaaa	ctgtaatgca	agtagcgtat	gcgctcacgc	aactggtcca	4560
	gaaccttgac	cgaacgcagc	ggtggtaacg	gcgcagtggc	ggttttcatg	gcttgttatg	4620
	actgtttttt	tgtacagtct	atgcctcggg	catccaagca	gcaagcgcgt	tacgccgtgg	4680
	gtcgatgttt	gatgttatgg	agcagcaacg	atgttacgca	gcagcaacga	tgttacgcag	4740
	cagggcagtc	gccctaaaac	aaagttaggt	ggctcaagta	tgggcatcat	tcgcacatgt	4800
20	aggctcggcc	ctgaccaagt	caaatccatg	cgggctgctc	ttgatctttt	cggtcgtgag	4860
	ttcggagacg	tagccaccta	ctcccaacat	cagccggact	ccgattacct	cgggaacttg	4920
	ctccgtagta	agacattcat	cgcgcttgct	gccttcgacc	aagaagcggg	tgttggcgct	4980
	ctcgcggctt	acgttctgcc	caggtttgag	cagccgcgta	gtgagatcta	tatctatgat	5040
	ctcgcagctc	ccggcgagca	ccggaggcag	ggcattgcc	ccgcgctcat	caatctcctc	5100
25	aagcatgagg	ccaacgcgct	tggtgcttat	gtgatctacg	tgcaagcaga	ttacggtgac	5160
	gatcccgcag	tggctctcta	tacaaaagttg	ggcatacggg	aagaagtgat	gcactttgat	5220
	atcgacccaa	gtaccgccac	ctaacaattc	gttcaagccg	agatcggctt	cccggccgcg	5280
	gagttgttcg	gtaaattgtc	acaacgccgc	gaatatagtc	ttaccatgc	ccttggccac	5340
	gcccctcttt	aatacgacgg	gcaatttgca	cttcagaaaa	tgaagagttt	gctttagcca	5400
30	taacaaaagt	ccagtatgct	ttttcacagc	ataactggac	tgatttcagt	ttacaactat	5460
	tctgtctagt	ttaagacttt	attgtcatag	tttagatcta	ttttgttcag	tttaagactt	5520
	tattgtccgc	ccacaccgcg	ttacgcaggg	catccattta	ttactcaacc	gtaaccgatt	5580
	ttgccagggt	acgcggctgg	tctgcggtgt	gaaataccgc	acagatgcgt	aaggagaaaa	5640
	taccgcatca	ggcgctcttc	cgcttcctcg	ctcactgact	cgctgcgctc	ggtcgttcgg	5700
35	ctcgcggcgag	cggtatcagc	tcactcaaaag	gcgtaatac	ggttatccac	agaatcaggg	5760
	gataacgcag	gaaagaacat	gtgagcaaaa	ggccagcaaa	aggccaggaa	ccgtaaaaag	5820
	gccgcggttc	tggcggtttt	ccataggctc	cgccccctg	acgagcatca	caaaaatcga	5880
	cgctcaagtc	agaggtggcg	aaacccgaca	ggactataaa	gataccaggc	gtttccccct	5940
	ggaagctccc	tcgtgcgctc	tctgttccg	accctgccgc	ttaccggata	cctgtccgcc	6000
40	tttctccctt	cgggaagcgt	ggcgctttct	caatgctcac	gctgtaggta	tctcagttcg	6060
	gtgtaggtcg	ttcgctccaa	gctgggctgt	gtgcacgaac	cccccgttca	gcccgaccgc	6120
	tgcgcccttat	ccggtaacta	tcgtcttgag	tccaacccgc	taagacacga	cttatcgcca	6180
	ctggcagcag	ccactggtaa	caggattagc	agagcgaggt	atgtaggcgg	tgctacagag	6240
	ttcttgaagt	ggtggcctaa	ctacggctac	actagaagga	cagtatttgg	tatctgcgct	6300
45	ctgctgaagc	cagttacctt	cggaaaaaga	gttggtagct	cttgatccgg	caacaaacc	6360
	accgctggta	gcggtggttt	ttttgtttgc	aagcagcaga	ttacgcgcag	aaaaaaagga	6420
	tctcaagaag	atcctttgat	cttttctacg	gggtctgacg	ctcagtgga	cgaaaactca	6480
	cgттаaggga	ttttgggtcat	gagattatca	aaaaggatct	tcacctagat	ccttttaaat	6540

	taaaaatgaa	gttttaaatc	aatctaaaagt	atatatgagt	aaacttggtc	tgacagttac	6600
	caatgcttaa	tcagtgaggc	acctatctca	gcgatctgtc	tatttcgttc	atccatagtt	6660
	gcctgactcc	ccgtcgtgta	gataactacg	atacgggagg	gcttaccatc	tggccccagt	6720
	gctgcaatga	taccgcgaga	cccacgctca	ccggctccag	atztatcagc	aataaaccag	6780
5	ccagccggaa	gggcccagcg	cagaagtggg	cctgcaactt	tatccgcctc	catccagtct	6840
	attaattggt	gccgggaagc	tagagtaagt	agttcgccag	ttaatagttt	gcgcaacggt	6900
	gttgccattg	ctacaggcat	cgtggtgtca	cgctcgtcgt	ttggtatggc	ttcattcagc	6960
	tccggttccc	aacgatcaag	gcgagttaca	tgatccccca	tgttgtgcaa	aaaagcggtt	7020
	agctccttcg	gtcctccgat	cgttgtcaga	agtaagttag	ccgcagtgtt	atcactcatg	7080
10	gttatggcag	cactgcataa	ttctcttact	gtcatgccat	ccgtaagatg	cttttctgtg	7140
	actggtgagt	actcaaccaa	gtcattctga	gaatagtgtg	tgcggcgacc	gagttgctct	7200
	tgcccggcgt	caatacggga	taataccgcg	ccacatagca	gaactttaa	agtgtcatc	7260
	attggaaac	gttcttcggg	gcgaaaactc	tcaaggatct	taccgctggt	gagatccagt	7320
	tcgatgtaac	ccactcgtgc	acccaactga	tcttcagcat	cttttacttt	caccagcgtt	7380
15	tctgggtgag	caaaaacagg	aaggcaaaa	gccgcaaaaa	agggaataag	ggcgacacgg	7440
	aaatgttgaa	tactcatact	cttccttttt	caatattatt	gaagcattta	tcagggttat	7500
	tgtctcatga	gcggatacat	atthgaatgt	atthtagaaaa	ataaacaat	aggggttccg	7560
	cgcacatttc	cccgaaaagt	gccacctgaa	attgtaaacg	ttaatatttt	gttaaaattc	7620
	gcgttaaatt	tttgtaaatt	cagctcattt	tttaaccaat	aggccgaaat	cggcaaaatc	7680
20	ccttataaat	caaaagaata	gaccgagata	gggttgagtg	ttgttccagt	ttggaacaag	7740
	agtccactat	taaagaacgt	ggactccaac	gtcaaagggc	gaaaaaccgt	ctatcagggc	7800
	gatggcccac	tacgtgaacc	atcacccata	tcaagttttt	tggggtcgag	gtgccgtaaa	7860
	gcactaaatc	ggaaccctaa	agggagcccc	cgatttagag	cttgacgggg	aaagccggcg	7920
	aacgtggcga	gaaaggaagg	gaagaaaagc	aaaggagcgg	gcgctagggc	gctggcaagt	7980
25	gtagcggcca	cgctgcgcgt	aaccaccaca	cccgcgcgcg	ttaatgcgcc	gctacagggc	8040
	gcgtcccatt	cgccattcag	gctgcaaata	agcgttgata	ttcagtcaat	tacaaacatt	8100
	aataacgaag	agatgacaga	aaaattttca	ttctgtgaca	gagaaaaagt	agccgaagat	8160
	gacggtttgt	cacatggagt	tggcaggatg	tttgattaaa	aacataacag	gaagaaaaat	8220
	gccccgctgt	gggcccagaca	aatagttggg	aactgggagg	ggtggaaatg	gagtttttaa	8280
30	ggattattta	gggaagagtg	acaaaataga	tgggaactgg	gtgtagcgtc	gtaagcta	8340
	acgaaaatta	aaaatgacaa	aatagtttgg	aactagattt	cacttatctg	gttcggatct	8400
	cctagtgagc	tccctgca					8418
	<210>	148					
	<211>	225					
35	<212>	ДНК					
	<213>	Искусственная последовательность					
	<220>						
	<223>	Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид					
	<400>	148					
40	tgtgccttct	agttgccagc	catctgttgt	ttgccctcc	cccgtgcctt	ccttgaccct	60
	ggaaggtgcc	actcccactg	tcctttccta	ataaaaatgag	gaaattgcat	cgattgtct	120
	gagtaggtgt	cattctattc	tggggggtgg	ggtggggcag	gacagcaagg	gggaggattg	180
	ggaagacaat	agcaggcatg	ctgggggatgc	ggtgggctct	atggc		225
	<210>	149					
45	<211>	1177					
	<212>	ДНК					
	<213>	Искусственная последовательность					
	<220>						

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

<400> 149

	ggctcagagg	ctcagaggca	cacaggagtt	tctgggctca	ccctgcccc	ttccaacccc	60
	tcagttccca	tcctccagca	gctgtttgtg	tgctgcctct	gaagtccaca	ctgaacaaac	120
5	ttcagcctac	tcatgtccct	aaaatgggca	aacattgcaa	gcagcaaaca	gcaaacacac	180
	agccctccct	gcctgctgac	cttgaggctg	gggcagaggt	cagagacctc	tctgggcccc	240
	tgccacctcc	aacatccact	cgacccttg	gaatttcggt	ggagaggagc	agaggttgtc	300
	ctggcgtggg	ttaggtagtg	tgagagggtc	cgggttcaaa	accacttgct	gggtggggag	360
	tcgtcagtaa	gtggctatgc	cccgaccccc	aagcctgttt	ccccatctgt	acaatggaaa	420
10	tgataaagac	gccccatctga	taggggtttt	gtggcaaata	aacatttggg	ttttttgttt	480
	tgttttgttt	tgttttttga	gatggaggtt	tgctctgtcg	cccaggctgg	agtgcagtga	540
	cacaatctca	tctcaccaca	accttcccct	gcctcagcct	cccaagtagc	tgggattaca	600
	agcatgtgcc	accacacctg	gctaattttc	tatttttagt	agagacgggt	ttctccatgt	660
	tggtcagcct	cagcctccca	agtaactggg	attacaggcc	tgtgccacca	caccgggcta	720
15	atTTTTtcta	TTTTtgacag	ggacgggggt	tcaccatggt	ggtcaggctg	gtctagaggt	780
	accgatctt	gctaccagtg	gaacagccac	taaggattct	gcagtgagag	cagagggcca	840
	gctaagtggg	actctcccag	agactgtctg	actcacgcc	ccccctccac	cttgacaca	900
	ggacgctgtg	gtttctgagc	caggtacaat	gactcctttc	ggtaagtgca	gtggaagctg	960
	tacactgccc	aggcaaagcg	tccgggcagc	gtaggcgggc	gactcagatc	ccagccagtg	1020
20	gacttagccc	ctgtttgctc	ctccgataac	tggggtgacc	ttggttaata	ttcaccagca	1080
	gcctcccccg	ttgcccctct	ggatccactg	cttaaatacg	gacgaggaca	gggccctgtc	1140
	tcctcagctt	caggcaccac	cactgacctg	ggacagt			1177

<210> 150

<211> 1326

25 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

<400> 150

30	ctgcagggcc	cactagtgga	gccgagagta	attcatacaa	aaggagggat	cgcttctgca	60
	aggggagagc	ccagggaccg	tccctaaatt	ctcacagacc	caaatccctg	tagccgcccc	120
	acgacagcgc	gaggagcatg	cgcccagggc	tgagcgcggg	tagatcagag	cacacaagct	180
	cacagtcccc	ggcgggtggg	ggaggggagc	gctgagcggg	ggccagggag	ctggcgcggg	240
	gcaaaactggg	aaagtgggtg	cgtgtgctgg	ctccgccctc	ttcccagagg	tgggggagaa	300
35	cggtatataa	gtgcggtagt	cgccttgac	gttctttttc	gcaacgggtt	tgccgtcaga	360
	acgcaggtga	gtggcggtg	tggcttccgc	gggccccgga	gctggagccc	tgctctgagc	420
	gggcccgggct	gatatgagag	tgtcgtccgc	agggtttagc	tgtgagcatt	cccacttcca	480
	gtggcgggag	gtgccccggg	gagagtgcga	ggcctagcgg	caaccccgta	gcctcgcttc	540
	gtgtccggct	tgaggcctag	cgtggtgtcc	gccgccgctg	gccactccgg	ccgactatg	600
40	cgTTTTttgt	ccttgctgcc	ctcgattgcc	ttccagcagc	atgggctaac	aaagggaggg	660
	tgtggggctc	actcttaagg	agcccatgaa	gcttacgttg	gataggaatg	gaagggcagg	720
	aggggagact	ggggccccgc	cgcttccgga	gcacatgtcc	gacgccacct	ggatggggcg	780
	aggcctgtgg	ctttccgaag	caatcgggag	tgagttagc	ctacctgggc	catgtggccc	840
	tagcactggg	cacgggtctg	cctggcggtg	ccgcgttccc	ttgcctccca	acaagggtga	900
45	ggccgtcccc	cccggcacca	gttgcttgag	cggaaaagatg	gccgctcccc	gggccctggt	960
	gcaaggagct	caaaatggag	gacgcggcag	cccgggtggag	cgggaggggtg	agtcacccac	1020
	acaaaggaag	agggccttgc	ccctcgccgg	ccgctgcttc	ctgtgacccc	gtggctctatc	1080
	ggccgcatag	tcacctcggg	cttctcttga	gcaccgctcg	tcgaggcggg	gggaggggat	1140

	ctaagggcgt	tggagtttgt	tcacatttgg	tgggtggaga	ctagtcaggc	cagcctggcg	1200
	ctggaagtca	ttcttggaat	ttgccccttt	gagtttggag	cgaggcta	tctcaagcct	1260
	cttagcgggt	caaaggtatt	ttctaaaccc	gtttccagg	gttgtgaaag	ccaccgctaa	1320
	ttcaaa						1326
5	<210>	151					
	<211>	573					
	<212>	ДНК					
	<213>	Mus musculus					
	<400>	151					
10	gtaagagttt	tatgtttttt	catctctgct	tgtatttttc	tagtaatgga	agcctgggat	60
	tttaaaatag	ttaaattttc	cttttagtgct	gatttctaga	ttattattac	tgttgttggt	120
	gttattattg	tcattatttg	catctgagaa	cccttaggtg	gttatattat	tgatatattt	180
	ttggatctct	tgatgacaat	aatgggggat	tttgaaagct	tagctttaa	tttcttttaa	240
	ttaaaaaaa	atgctaggca	gaatgactca	aattacgttg	gatacagttg	aatttattac	300
15	ggctctcatag	ggcctgcctg	ctcgaccatg	ctatactaaa	aattaaaagt	gtgtgttact	360
	aattttataa	atggagtttc	catttatatt	tacctttatt	tcttatttac	cattgtctta	420
	gtagatatatt	acaaacatga	cagaaacact	aaatcttgag	tttgaatgca	cagatataaa	480
	cacttaacgg	gttttaaaaa	taataatggt	ggtgaaaaaa	tataactttg	agtgtagcag	540
	agaggaacca	ttgccacctt	cagattttcc	tgt			573
20	<210>	152					
	<211>	1993					
	<212>	ДНК					
	<213>	Mus musculus					
	<400>	152					
25	acgatcggga	actggcatct	tcagggagta	gcttaggtca	gtgaagagaa	gaacaaaaag	60
	cagcatatta	cagttagttg	tcttcatcaa	tctttaaata	tgttgtgtgg	ttttctctc	120
	cctgtttcca	cagacaagag	tgagatcgcc	catcggata	atgatttggg	agaacaacat	180
	ttcaaaggcc	tgtaagttat	aatgctgaaa	gccacttaa	tatttctggg	agtattagtt	240
	aaagttttta	aacacctttt	tccaccttga	gtgtgagaat	tgtagagcag	tgctgtccag	300
30	tagaaatgtg	tgcaatgaca	gaaagactgt	ggatctgtgc	tgagcaatgt	ggcagccaga	360
	gatcacaagg	ctatcaagca	ctttgcacat	ggcaagtgt	actgagaagc	acacattcaa	420
	ataatagtta	attttaattg	aatgtatcta	gccatgtgtg	gctagtagct	cctttcctgg	480
	agagagaatc	tggagcccac	atctaacttg	ttaagtctgg	aatcttattt	tttatttctg	540
	gaaaggtcta	tgaactatag	ttttgggggc	agctcactta	ctaactttta	atgcaataag	600
35	atctcatggg	atcttgagaa	cattattttg	tctctttgta	gtactgaaac	cttatacatg	660
	tgaagtaagg	ggtctatact	taagtcacat	ctccaacctt	agtaatgttt	taatgtagta	720
	aaaaaatgag	taattaattt	attttttagaa	ggtcaatagt	atcatgtatt	caaataaca	780
	gaggtatatg	gtagaaaag	aaacaattca	aaggacttat	ataatatcta	gccttgacaa	840
	tgaataaatt	tagagagtag	tttgctgtgt	tgctcatgt	tcataaatct	attgacacat	900
40	atgtgcatct	gcacttcagc	atggtagaag	tccatattcc	tttgcttgg	aaggcaggtg	960
	ttcccattac	gcctcagaga	atagctgacg	ggaagaggct	ttctagatag	ttgtatgaaa	1020
	gatatacaaa	atctcgcagg	tatacacagg	catgatttgc	tggttgggag	agccacttgc	1080
	ctcactactga	ggtttttgtg	tctgcttttc	agagtcctga	ttgccttttc	ccagtatctc	1140
	cagaaatgct	catacgatga	gcatgccaaa	ttagtgcagg	aagtaacaga	ctttgcaaag	1200
45	acgtgtgttg	ccgatgagtc	tgccgccaac	tgtgacaaat	cccttgtgag	taccttctga	1260
	ttttgtggat	ctactttcct	gctttctgga	actctgtttc	aaagccaatc	atgactccat	1320
	cacttaaggc	cccgggaaca	ctgtggcaga	gggcagcaga	gagattgata	aagccaggtt	1380
	gatgggaatt	ttctgtggga	ctccatttca	tagtaattgc	agaagctaca	atacactcaa	1440

RU 2 814 137 C2

	aaagtctcac	cacatgactg	cccaaatggg	agcttgacag	tgacagtgac	agtagatatg	1500
	ccaagtgga	tgagggaaag	accacaagag	ctaaaccctg	taaaaagaac	tgtaggcaac	1560
	taaggaatgc	agagagaaga	agttgccttg	gaagagcata	ccaactgcct	ctccaatacc	1620
	aatggtcatc	cctaaaaacat	acgtatgaat	aacatgcaga	ctaagcaggc	tacatttagg	1680
5	aatatacatg	tatttacata	aatgtatatg	catgtaacaa	caatgaatga	aaactgaggt	1740
	catggatctg	aaagagagca	agggggctta	catgagaggg	tttgaggga	ggggttggag	1800
	ggagggaggt	attattcttt	agttttacag	ggaacgtagt	aaaaacatag	gcttctccca	1860
	aaggagcaga	gccccatgag	agctgtgcaa	ggttccccag	cttgatttta	cctgctcctc	1920
	aaattccctt	gatttgtttt	tattataatg	actttactcc	tagcttttag	tgtcagatag	1980
10	aaaacatgga	agg					1993
	<210>	153					
	<211>	1350					
	<212>	ДНК					
	<213>	Homo sapiens					
15	<400>	153					
	taggaggctg	aggcaggagg	atcgcttgag	cccaggagtt	cgagaccagc	ctgggcaaca	60
	tagtgtgatc	ttgtatctat	aaaaataaac	aaaattagct	tgggtgtggtg	gcgcctgtag	120
	tccccagcca	cttgaggggg	tgaggtgaga	ggattgcttg	agcccgggat	ggfccaggct	180
	gcagtgagcc	atgatcgtgc	cactgcactc	cagcctgggc	gacagagtga	gaccctgtct	240
20	cacaacaaca	acaacaacaa	caaaaaggct	gagctgcacc	atgcttgacc	cagtttctta	300
	aaattgttgt	caaagcttca	ttcactccat	ggtgctatag	agcacaagat	tttatttggt	360
	gagatggtgc	tttcatgaat	tcccccaaca	gagccaagct	ctccatctag	tggacagga	420
	agctagcagc	aaaccttccc	ttcactacaa	aacttcattg	cttggccaaa	aagagagtta	480
	attcaatgta	gacatctatg	taggcaatta	aaaacctatt	gatgtataaa	acagtttgca	540
25	ttcatggagg	gcaactaaat	acattctagg	actttataaa	agatcacttt	ttatztatgc	600
	acaggggtgga	acaagatgga	ttatcaagtg	tcaagtccaa	tctatgacat	caattattat	660
	acatcggagc	cctgccaaaa	aatcaatgtg	aagcaaatcg	cagcccgcct	cctgcctccg	720
	ctctactcac	tgggtgttcat	ctttggtttt	gtgggcaaca	tgctggtcat	cctcatcctg	780
	ataaactgca	aaaggctgaa	gagcatgact	gacatctacc	tgctcaacct	ggccatctct	840
30	gacctgtttt	tccttcttac	tgtccccttc	tgggctcact	atgctgccgc	ccagtgggac	900
	tttgaaaata	caatgtgtca	actcttgaca	gggctctatt	ttataggctt	cttctctgga	960
	atcttcttca	tcatcctcct	gacaatcgat	aggtacctgg	ctgtcgtcca	tgctgtgttt	1020
	gctttaaag	ccaggacggt	cacctttggg	gtggtgacaa	gtgtgatcac	ttgggtgggtg	1080
	gctgtgtttg	cgtctctccc	aggaatcatc	tttaccagat	ctcaaaaaga	aggtcttcat	1140
35	tacacctgca	gctctcattt	tccatacagt	cagtatcaat	tctggaagaa	ttccagaca	1200
	ttaaagatag	tcatcttggg	gctggtcctg	ccgctgcttg	tcatggtcat	ctgctactcg	1260
	ggaatcctaa	aaactctgct	tcggtgtcga	aatgagaaga	agaggcacag	ggctgtgagg	1320
	cttatcttca	ccatcatgat	tgtttatttt				1350
	<210>	154					
40	<211>	1223					
	<212>	ДНК					
	<213>	Homo sapiens					
	<400>	154					
45	tgacagagac	tcttgggatg	acgcactgct	gcatcaacc	catcatctat	gcctttgtcg	60
	gggagaagtt	cagaaactac	ctcttagtct	tcttccaaaa	gcacattgcc	aaacgcttct	120
	gcaaatgctg	ttctattttc	cagcaagagg	ctcccagcgc	agcaagctca	gtttacacc	180
	gatccactgg	ggagcaggaa	atatctgtgg	gcttgtgaca	cggactcaag	ttggctgggtg	240
	accagtcag	agttgtgcac	atggcttagt	tttcatacac	agcctgggct	gggggtgggg	300

	tgggagaggt cttttttaa	aggaagttac	tgttatagag	ggtctaagat	tcatccattt	360	
	atttggcatc tgtttaaagt	agattagatc	ttttaagccc	atcaattata	gaaagccaaa	420	
	tcaaaatatg ttgatgaaaa	atagcaacct	ttttatctcc	ccttcacatg	catcaagtta	480	
	ttgacaaaact ctcccttcac	tccgaaaagt	ccttatgtat	atttaaaaga	aagcctcaga	540	
5	gaattgctga ttcttgagtt	tagtgatctg	aacagaaata	ccaaaattat	ttcagaaatg	600	
	tacaactttt tacctagtac	aaggcaacat	ataggttgta	aatgtgttta	aaacagggtct	660	
	ttgtcttgct atggggagaa	aagacatgaa	tatgattagt	aaagaaatga	cacttttcat	720	
	gtgtgatttc ccctccaagg	tatggttaat	aagtttctact	gacttagaac	caggcgagag	780	
	acttgtggcc tgggagagct	ggggaagctt	cttaaagag	aaggaatttg	agttggatca	840	
10	tctattgctg gcaaagacag	aagcctcact	gcaagcactg	catgggcaag	cttggctgta	900	
	gaaggagaca gagctggttg	ggaagacatg	gggaggaagg	acaaggctag	atcatgaaga	960	
	accttgacgg cattgctccg	tctaagtcat	gagctgagca	gggagatcct	ggttgggtgtt	1020	
	gcagaaggtt tactctgtgg	ccaaaggagg	gtcaggaagg	atgagcattt	agggcaagga	1080	
	gaccaccaac agccctcagg	tcagggtgag	gatggcctct	gctaagctca	aggcgtgagg	1140	
15	atgggaagga gggaggtatt	cgtaaggatg	ggaaggaggg	aggtattcgt	gcagcatatg	1200	
	aggatgcaga gtcagcagaa	ctg				1223	
	<210>	155					
	<211>	215					
	<212>	ДНК					
20	<213>	Искусственная последовательность					
	<220>						
	<223>	Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид					
	<400>	155					
	gaacgctgac gtcacaaacc	cgctccaagg	aatcgcgggc	ccagtgtcac	taggcgggaa	60	
25	сасссacgc gcgtgcgcc	tggcaggaag	atggctgtga	gggacagggg	agtggcgccc	120	
	tgcaatat	gcatgtcgct	atgtgttctg	ggaatcacc	ataaacgtga	aatgtctttg	180
	gatttgggaa	tcttataagt	tctgtatgag	accac		215	
	<210>	156					
	<211>	141					
	<212>	ДНК					
30	<213>	Искусственная последовательность					
	<220>						
	<223>	Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид					
	<400>	156					
35	cctgcaggca gctgcgcgct	cgctcgctca	cctaggccgc	ccgggcaaag	cccgggcgtc	60	
	gggagacctt tggctgcccc	gcctagggtga	gсgagсgagс	gсgсagagag	ggagtggcca	120	
	actccatcac	taggggttcc	t			141	
	<210>	157					
	<211>	19					
	<212>	ДНК					
40	<213>	Искусственная последовательность					
	<220>						
	<223>	Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид					
45	<400>	157					
	gсgсgctсgс	tcgctcacc				19	
	<210>	158					
	<211>	22					

<212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 5 олигонуклеотид
 <400> 158
 ctaggtgagc gacsgagcgc gc 22
 <210> 159
 <211> 75
 10 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид
 15 <400> 159
 cctgcaggac tgaggccgsc cgggcaaac csgggcgctcg ggcgacctt ggtcgcccgg 60
 cctcagtcct gcagg 75
 <210> 160
 <211> 130
 20 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 160
 25 aggaaccsct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagt 60
 gcgggscgacc aaaggtcgcс cгacgcccgg gcgcactcag tgagcgagcg agcgcgсagc 120
 tgcctgcagg 130
 <210> 161
 <211> 142
 30 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 161
 35 cctgcaggca gctgcgсgct cgctcgctcc ctaggactga ggccgcccgg gcgtcgggсg 60
 acctttggtc gcccgcctc agtcctaggg агсgagсgag cгсgсagаgа gggagtggсс 120
 aactccatca ctaggggttc ct 142
 <210> 162
 <211> 80
 40 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид
 45 <400> 162
 gcgсgctсgс tcgctcactg agtgсgggсg accaaaggtc gcccгacгсс cgggсgсact 60
 сagtгagсгa гсgagсгсгс 80
 <210> 163

	<211> 21	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
5	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид	
	<400> 163	
	gcgсgctcgc tcgctcactg a	21
	<210> 164	
10	<211> 18	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
15	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид	
	<400> 164	
	gtgagcagc gagcgcgc	18
	<210> 165	
	<211> 89	
20	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид	
25	<400> 165	
	gcgсgctcgc tcgctcactg aggccgcccг ggcaaagccc gggcgtcggg cgactttgtc	60
	gcccgcctc agtgagcag cгagcgcgc	89
	<210> 166	
	<211> 89	
30	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид	
35	<400> 166	
	gcgсgctcgc tcgctcactg aggccgggcг acaaagtcgc ccgacgcccг ggctttgccc	60
	gggcgcctc agtgagcag cгagcgcgc	89
	<210> 167	
	<211> 87	
40	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид	
45	<400> 167	
	gcgсgctcgc tcgctcactg aggccgcccг ggcaaagccc gggcgtcggg cgattttcgc	60
	ccgcctcag tgagcagcг agcgcgc	87
	<210> 168	

<211> 87
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 5 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид
 <400> 168
 gcgcgctcgc tcgctcaactg aggccgggscg aaaatcgccc gacgcccggg ctttgcccgg 60
 gcggcctcag tgagcgcgag agcgcgc 87
 10 <210> 169
 <211> 85
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 15 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид
 <400> 169
 gcgcgctcgc tcgctcaactg aggccgcccg ggcaaacgccc gggcgtcggg cgtttcgccc 60
 ggcctcagtg agcgcgcgag cgcgc 85
 20 <210> 170
 <211> 85
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 25 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид
 <400> 170
 gcgcgctcgc tcgctcaactg aggccgggscg aaacgcccga cccccgggct ttgcccgggc 60
 ggcctcagtg agcgcgcgag cgcgc 85
 30 <210> 171
 <211> 89
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 35 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид
 <400> 171
 gcgcgctcgc tcgctcaactg aggccgcccg ggaaacccgg gcgtcgggscg acctttggtc 60
 gcccggcctc agtgagcgcg cgcgcgcg 89
 40 <210> 172
 <211> 89
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 45 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид
 <400> 172
 gcgcgctcgc tcgctcaactg aggccgggscg accaaaggtc gcccgcgcgc cgggtttccc 60

	gggcggcctc agtgagcag cagcgcgc	89
	<210> 173	
	<211> 87	
	<212> ДНК	
5	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид	
	<400> 173	
10	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg gaaaccgggc gtcgggagac ctttggtcgc	60
	ccggcctcag tgagcagcgc agcgcgc	87
	<210> 174	
	<211> 87	
	<212> ДНК	
15	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид	
	<400> 174	
20	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggag ассааaggtc gcccgagcgc cggtttcggg	60
	ggcctcagtg tgagcagcgc agcgcgc	87
	<210> 175	
	<211> 85	
	<212> ДНК	
25	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид	
	<400> 175	
30	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg aaacgggagc cgggagacct ttggtcgccc	60
	ggcctcagtg agcagcagcgc gcgcgc	85
	<210> 176	
	<211> 85	
	<212> ДНК	
35	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид	
	<400> 176	
40	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggag ассааaggtc gcccgagcgc cgtttcgggc	60
	ggcctcagtg agcagcagcgc gcgcgc	85
	<210> 177	
	<211> 83	
	<212> ДНК	
45	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид	

<400> 177
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccc aagggcgctcg ggcgaccttt ggtcgcccgg 60
 cctcagtgag cgagcgagcg cgc 83
 <210> 178
 5 <211> 83
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 10 олигонуклеотид
 <400> 178
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg ассаааggtc gcccgacgcc ctttgggagg 60
 cctcagtgag cgagcgagcg cgc 83
 <210> 179
 15 <211> 81
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 20 олигонуклеотид
 <400> 179
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgссаа aggcgctcggg cgacctttgg tcgcccggcc 60
 tcagtgagcg агсgаgсgсg с 81
 <210> 180
 25 <211> 81
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 30 олигонуклеотид
 <400> 180
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg ассаааggtc gcccgacgcc tttggcgggc 60
 tcagtgagcg агсgаgсgсg с 81
 <210> 181
 35 <211> 79
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 40 олигонуклеотид
 <400> 181
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgсааа gcgtcgggcg acctttggtc gcccggcctc 60
 agtgagcgag cgagcgcgcg 79
 <210> 182
 45 <211> 79
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид
 <400> 182
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgct ttgcggcctc 60
 5 agtgagcagc cagcgcgcgc 79
 <210> 183
 <211> 81
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 10 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид
 <400> 183
 ctgcgcgctc gctcgcctcac tgaggccgaa acgtcgggcg acctttggtc gcccggcctc 60
 15 agtgagcagc cagcgcgcgca g 81
 <210> 184
 <211> 81
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 20 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид
 <400> 184
 ctgcgcgctc gctcgcctcac tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccgacg tttcggcctc 60
 25 agtgagcagc cagcgcgcgca g 81
 <210> 185
 <211> 72
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 30 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид
 <400> 185
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacggc ctcagtgagc 60
 35 gagcagcgcgc gc 72
 <210> 186
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 40 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид
 <400> 186
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgcc cgggcggcct 60
 45 cagtgagcga gcagcgcgcgc 80
 <210> 187
 <211> 79
 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид

5 <400> 187
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggcgccccg gcgctcggcg acctttggtc gcccggcctc 60
 agtgagcag cagcgcgc 79
 <210> 188
 <211> 48

10 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид

15 <400> 188
 ggagtcaaaag ttctgtttgc cctgatctgc atcgctgtgg ccgaggcc 48
 <210> 189
 <211> 99
 <212> ДНК

20 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид

25 <400> 189
 attcatacca acttgaagaa aaagttcagc ctcttcatcc tggctcttct cctgttcgca 60
 gtcactctgtg tttggaagaa agggagcgcac tatgaggcc 99
 <210> 190
 <211> 588
 <212> ДНК

30 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

<400> 190
 gccctctcc ctccccccc cctaacgtta ctggccgaag ccgcttgga taaggccggt 60
 35 gtgcgctttgt ctatatgtta ttttccacca tattgccgtc ttttggaat gtgagggccc 120
 ggaaacctgg cctgtcttc ttgacgagca ttctagggg tctttcccct ctgcctaaag 180
 gaatgcaagg tctgttgaat gtcgtgaagg aagcagttcc tctggaagct tcttgaagac 240
 aaacaacgtc tgtagcgacc ctttgcaggc agcggaaacc cccacctggc gacaggtgcc 300
 tctgcggcca aaagccacgt gtataagata cacctgcaaa ggcggcaca cccagtgcc 360
 40 acgttgtgag ttggatagtt gtggaagag tcaaatggct ctctcaagc gtattcaaca 420
 aggggctgaa ggatgccag aaggtaaccc attgtatggg atctgatctg gggcctcggg 480
 gcacatgctt tacatgtggt tagtcgaggt taaaaaacg tctaggcccc ccgaaccacg 540
 gggacgtggg tttcctttga aaaacacgat gataatatgg ccacaacc 588
 <210> 191

45 <211> 225
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

<400> 191

	ccgtctgtct	gcacatttcg	tagagcgagt	gttccgatac	tctaatctcc	ctaggcaagg	60
	ttcatatttg	tgtaggttac	ttattctcct	tttgttgact	aagtcaataa	tcagaatcag	120
5	caggtttgga	gtcagcttgg	cagggatcag	cagcctgggt	tggaaggagg	gggtataaaa	180
	gccccttcac	caggagaagc	cgtcacacag	atccacaagc	tcctg		225

<210> 192

<211> 7551

<212> ДНК

10 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

<400> 192

	aaagtagccg	aagatgacgg	tttgtcacat	ggagttggca	ggatgtttga	ttaaaaacat	60
15	aacaggaaga	aaaatgcccc	gctgtgggcg	gacaaaatag	ttgggaactg	ggaggggtgg	120
	aaatggagtt	tttaaggatt	atntagggaa	gagtgacaaa	atagatggga	actgggtgta	180
	gcgtcgtaag	ctaatacga	aattaaat	gacaaaatag	tttggaaacta	gatttcactt	240
	atctggttcg	gatctcctag	gcctgcaggc	agctgcgcgc	tcgctcgctc	actgaggccg	300
	cccgggcaaa	gcccgggctg	cgggcgacct	ttggtcgccc	ggcctcagtg	agcgagcgag	360
20	cgcgcagaga	gggagtggcc	aactccatca	ctaggggttc	cttgtagtta	atgattaacc	420
	cgccatgcta	cttatcgctg	ccgcccgggg	aggctgctgg	tgaatattaa	ccaaggtcac	480
	cccagttatc	ggaggagcaa	acaggggcta	agtccacacg	cgtaggtaccg	tctgtctgca	540
	catttcgtag	agcgagtgtt	ccgatactct	aatctccccta	ggcaaggttc	atatttgtgt	600
	aggttactta	ttctcctttt	gttgactaag	tcaataatca	gaatcagcag	gtttggagtc	660
25	agcttggcag	ggatcagcag	cctgggttgg	aaggaggggg	tataaaagcc	ccttcaccag	720
	gagaagccgt	cacacagatc	cacaagctcc	tgaagaggtg	agggtttaag	ggatggttgg	780
	ttggtggggg	attaatgttt	aattacctgg	agcacctgcc	tgaaatcact	ttttttcagg	840
	ttggtttaaa	ccgcagccac	catgagcacc	gccgtgctgg	aaaatcctgg	cctgggcaga	900
	aagctgagcg	acttcggcca	agagacaagc	tacatcgagg	acaactgcaa	ccagaacggc	960
30	gccatcagcc	tgatcttcag	cctgaaaaga	gaagtgggcg	ccctggccaa	ggtgctgaga	1020
	ctgttcgaag	agaacgacgt	gaacctgaca	cacatcgaga	gcagaccag	cagactgaag	1080
	aaggacgagt	acgagttctt	caccacactg	gacaagcgga	gcctgcctgc	tctgaccaac	1140
	atcatcaaga	tcctgcggca	cgacatcggc	gccacagtgc	acgaactgag	ccgggacaag	1200
	aaaaaggaca	ccgtgccatg	gttccccaga	accatccaag	agctggacag	attcgccaac	1260
35	cagatcctga	gctatggcgc	cgagctggac	gctgatcacc	ctggctttaa	ggaccccgtg	1320
	taccgggcca	gaagaaagca	gtttgccgat	atcgctaca	actaccggca	cggccagcct	1380
	attcctcggg	tcgagtacat	ggaagaggaa	aagaaaacct	ggggcacctg	gttcaagacc	1440
	ctgaagtccc	tgtacaagac	ccacgcctgc	tacgagtaca	accacatctt	cccactgctc	1500
	gaaaagtact	gcggcttcca	cgaggacaat	atccctcagc	ttgaggacgt	gtcccagttc	1560
40	ctgcagacct	gcaccggcct	tagactgagg	ccagttgccg	gactgctgag	cagcagagat	1620
	tttctcggcg	gcctggcctt	cagagtgttc	caactgtacc	agtacatcag	acacggcagc	1680
	aagcccatgt	acaccctga	gcctgatatc	tgccacgagc	tgctgggaca	tgtgccctctg	1740
	ttcagcgata	gaagcttcgc	ccagttcagc	caagagatcg	gactggcttc	tctgggagcc	1800
	cctgacgagt	acattgagaa	gctggccacc	atctactggt	tcaccgtgga	attcggcctg	1860
45	tgcaagcagg	gcgacagcat	caaagcttat	ggcgctggcc	tgctgtctag	cttcggcgag	1920
	ctgcagtact	gtctgagcga	gaagcctaag	ctgctgcccc	tggaaactgga	aaagaccgcc	1980
	atccagaact	acaccgtgac	cgagttccag	cctctgtact	acgtggccga	gagcttcaac	2040
	gacgccaaaag	aaaaagtgcg	gaacttcgcc	gccaccattc	ctcggccttt	cagcgtcaga	2100

	tacgaccctt	acacacagcg	gatcgagggtg	ctggacaaca	cacagcagct	gaaaattctg	2160
	gccgactcca	tcaacagcga	gatcggcatc	ctgtgcagcg	cctgcagaa	aatcaagtga	2220
	tagttaatta	agagcatctt	accgccattt	attcccata	ttgttctgtt	tttcttgatt	2280
	tgggtataca	tttaaatggt	aataaaaaca	aatgggtggg	caatcattta	catttttagg	2340
5	gatatgtaat	tactagttca	ggtgtattgc	cacaagacaa	acatgttaag	aaactttccc	2400
	gttattttacg	ctctgttcct	gttaatcaac	ctctggatta	caaaatttgt	gaaagattga	2460
	ctgatattct	taactatggt	gctcctttta	cgctgtgtgg	atatgctgct	ttatagcctc	2520
	tgtatctagc	tattgcttcc	cgtagcgctt	tcgttttctc	ctccttgtat	aaatcctggt	2580
	tgctgtctct	tttagaggag	ttgtggcccg	ttgtccgtca	acgtggcgtg	gtgtgctctg	2640
10	tgtttgctga	cgcaaccccc	actggctggg	gcattgccac	cacctgtcaa	ctcctttctg	2700
	ggactttcgc	tttccccctc	ccgatcgcca	cggcagaact	catcgccgcc	tgcttgccc	2760
	gctgctggac	aggggctagg	ttgctgggca	ctgataattc	cgtaggtgtg	tctgtgcctt	2820
	ctagttgcca	gccatctggt	gtttgcccct	ccccgtgcc	ttccttgacc	ctggaagggtg	2880
	ccactcccac	tgtcctttcc	taataaaatg	aggaaattgc	atcgcatgtt	ctgagtaggt	2940
15	gtcattctat	tctggggggg	ggggtggggc	aggacagcaa	gggggaggat	tgggaagaca	3000
	atagcaggca	tgctggggat	gcggtgggct	ctatggctct	agagcatggc	tacgtagata	3060
	agtagcatgg	cggtttaatc	attaactaca	cctgcaggag	gaaccctag	tgatggagtt	3120
	ggccactccc	tctctgcgcg	ctcgtctgct	caactgaggc	ggcgaccaa	aggtcgcccg	3180
	acgcccgggc	ggcctcagtg	agcgagcgag	cgcgagctg	cctgcagggg	cgcgctcga	3240
20	gccatggtgc	tagcagctga	tgcatagcat	gcggtaccgg	gagatggggg	aggctaactg	3300
	aaacacggaa	ggagacaata	ccggaaggaa	cccgcgctat	gacggcaata	aaaagacaga	3360
	ataaaacgca	cggtgtttgg	gtcgtttgtt	cataaacgcg	gggttcggtc	ccagggctgg	3420
	cactctgtcg	ataccccacc	gagaccccat	tgggaccaat	acgcccgcgt	ttcttctttt	3480
	tccccacccc	aaccccccaag	ttcgggtgaa	ggcccagggc	tcgcagccaa	cgctggggcg	3540
25	gcaagccctg	ccatagccac	tacgggtacg	taggccaacc	actagaacta	tagctagagt	3600
	cctgggcgaa	caaacgatgc	tcgccttcca	gaaaaccgag	gatgcgaacc	acttcatccg	3660
	gggtcagcac	caccggcaag	cgccgcgacg	gccgaggctt	accgatctcc	tgaagccagg	3720
	gcagatccgt	gcacagcacc	ttgccgtaga	agaacagcaa	ggccgccaat	gcctgacgat	3780
	gcgtggagac	cgaaaccttg	cgctcgttcg	ccagccagga	cagaaatgcc	tcgacttcgc	3840
30	tgctgcccga	ggttgcccgg	tgacgcacac	cgtggaaacg	gatgaaggca	cgaaccaggt	3900
	tgacataagc	ctgttcgggt	cgtaaactgt	aatgcaagta	gcgtatgctc	tcacgcaact	3960
	ggtccagAAC	cttgaccgaa	cgagcgggtg	gtaacggcgc	agtggcgggt	ttcatggctt	4020
	gttatgactg	tttttttgta	cagtctatgc	ctcgggcatc	caagcagcaa	gcgcttacg	4080
	ccgtgggtcg	atgtttgatg	ttatggagca	gcaacgatgt	tacgcagcag	caacgatgtt	4140
35	acgcagcagg	gcagtcgccc	taaaacaaaag	ttaggtggct	caagtatggg	catcattcgc	4200
	acatgtaggc	tcggccctga	ccaagtcaaa	tccatgcggg	ctgctcttga	ttttttcggt	4260
	cgtaggttcg	gagacgtagc	cacctactcc	caacatcagc	cggactccga	ttacctcggg	4320
	aacttgctcc	gtagtaagac	attcatcgcg	cttgctgcct	tcgaccaaga	agcggttggt	4380
	ggcgtctctg	cggtttacgt	tctgcccagg	tttgagcagc	cgctagtga	gatctatatc	4440
40	tatgatctcg	cagtctccgg	cgagcaccgg	aggcagggca	ttgccaccgc	gctcatcaat	4500
	ctcctcaagc	atgaggccaa	cgcgcttggg	gcttatgtga	tctacgtgca	agcagattac	4560
	ggtgacgatc	ccgcagtggc	tctctataca	aagtggggca	tacgggaaga	agtgatgcac	4620
	tttgatatacg	accCaagtac	cgccaccta	caattcgttc	aagccgagat	cggcttcccg	4680
	gccgcggagt	tgttcggtaa	attgtcacia	cgccgcgaat	atagtcttta	ccatgccctt	4740
45	ggccacgccc	ctctttaata	cgacgggcaa	tttgcacttc	agaaaatgaa	gagtttgctt	4800
	tagccataac	aaaagtccag	tatgcttttt	cacagcataa	ctggactgat	ttcagtttac	4860
	aactattctg	tctagtttaa	gactttattg	tcatagttaa	gatctatttt	gttcagttta	4920
	agactttatt	gtccgcccac	acccgcttac	gcagggcatc	cattttattac	tcaaccgtaa	4980

ccgattttgc caggttacgc ggctggctctg cgggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg 5040
 agaaaataacc gcatcaggcg ctcttccgct tcctcgcctca ctgactcgcct gcgctcggtc 5100
 gttcggctgc ggcgagcggg atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa 5160
 tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaaggcc agcaaaaaggc caggaaccgt 5220
 5 aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa 5280
 aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt 5340
 cccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgacct tgccgcttac cggatacctg 5400
 tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcaat gctcacgctg taggtatctc 5460
 agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc 5520
 10 gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggttaag acacgactta 5580
 tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatagt aggcgggtgct 5640
 acagagttct tgaagtggg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttgggtatc 5700
 tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa 5760
 caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa 5820
 15 aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa 5880
 aactcacggt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt 5940
 ttaaattaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac 6000
 agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc 6060
 atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggcct accatctggc 6120
 20 cccagtgcct caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata 6180
 aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtggtcctg caactttatc cgctccatc 6240
 cagtctatta attggtgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgcg 6300
 aacgttggtg ccattgctac aggcatcgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca 6360
 ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatggt gtgcaaaaaa 6420
 25 gcggttagct ccttcggtcc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca 6480
 ctcatggtta tggcagcact gcataattct ctactgtca tgccatccgt aagatgcttt 6540
 tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgatgcg gcgaccgagt 6600
 tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac ttaaaagtg 6660
 ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga 6720
 30 tccagttcga tgtaaccac tcgtgcacc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc 6780
 agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg caaaaaagg aataaggcg 6840
 acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag 6900
 ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg 6960
 gttccgcgca catttccccg aaaagtgcc cctgaaattg taaacgttaa tattttgtta 7020
 35 aaattcgcgt taaatttttg ttaaatcagc tcatttttta accaataggc cgaaatcggc 7080
 aaaatccctt ataaatcaaa agaatagacc gagatagggt tgagtgttgt tccagtttg 7140
 aacaagagtc cactattaa gaacgtggac tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat 7200
 cagggcgatg gccactacg tgaaccatca ccctaataca gttttttggg gtcgaggtgc 7260
 cgtaaagcac taaatcggaa ccctaaaggg agccccgat ttagagcttg acggggaaag 7320
 40 ccggcgaacg tggcgagaaa ggaagggaag aaagcgaag gagcgggcgc tagggcgctg 7380
 gcaagtgtag cggtcacgct gcgcgtaacc accacacccc ccgcgcttaa tgcgccgcta 7440
 cagggcgcgct cccattcggc attcaggctg caaataagcg ttgatattca gtcaattaca 7500
 aacattaata acgaagagat gacagaaaaa ttttcattct gtgacagaga a 7551
 <210> 193
 45 <211> 7780
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 <400> 193

	ggccggcccc	tgacggcagc	tgcgcgctcg	ctcgctcact	gaggccgccc	gggcaaagcc	60
	cgggcgctcg	gcgacctttg	gtcgccccgc	ctcagtgagc	gagcgagcgc	gcagagaggg	120
5	agtggccaac	tccatcacta	ggggttcctt	gtagttaatg	attaacccgc	catgctactt	180
	atctacgtag	ccatgctcta	gacgggggag	gctgctgggt	aatattaacc	aaggtcaccc	240
	cagttatcgg	aggagcaaac	aggggctaag	tccacacgcg	tggtaccgtc	tgtctgcaca	300
	tttcgtagag	cgagtgttcc	gatactctaa	tctccctagc	caaggttcat	atttgtgtag	360
	gttacttatt	ctccttttgt	tgactaagtc	aataatcaga	atcagcaggt	ttggagtcag	420
10	cttggcaggg	atcagcagcc	tggtttggaa	ggagggggta	taaaagcccc	ttcaccagga	480
	gaagccgtca	cacagatcca	caagctcctg	aagaggtaa	ggtttaaggg	atggtttggt	540
	ggtgggggat	taatgtttaa	ttacctggag	cacctgcctg	aatcactttt	ttttcaggtt	600
	ggtttaaacg	ccgccaccat	gtccactgcg	gtcctggaaa	accaggctt	gggcaggaaa	660
	ctctctgact	ttggacagga	aacaagctat	attgaagaca	actgcaatca	aaatggtgcc	720
15	atatcactga	tcttctcact	caaagaagaa	gttgggtgcat	tggccaaagt	attgcgctta	780
	tttgaggaga	atgatgtaaa	cctgaccac	attgaatcta	gaccttctcg	tttaaagaaa	840
	gatgagtatg	aatttttcac	ccatttggat	aaacgtagcc	tgctgctct	gacaaacatc	900
	atcaagatct	tgaggcatga	cattggtgcc	actgtccatg	agctttcacg	agataagaag	960
	aaagacacag	tgccctgggt	cccaagaacc	attcaagagc	tggacagatt	tgccaatcag	1020
20	attctcagct	atggagcggg	actggatgct	gaccaccctg	gttttaaaga	tcctgtgtac	1080
	cgtgcaagac	ggaagcagtt	tgctgacatt	gcctacaact	accgccatgg	gcagcccatc	1140
	cctcgagtgg	aatacatgga	ggaagaaaag	aaaacatggg	gcacagtgtt	caagactctg	1200
	aagtccttgt	ataaaaccca	tgcttgctat	gagtacaatc	acatttttcc	acttcttgaa	1260
	aagtactgtg	gcttccatga	agataacatt	cccagctgg	aagacgtttc	tcagttcctg	1320
25	cagacttgca	ctggtttccg	cctccgacct	gtggctggcc	tgctttctc	tcgggatttc	1380
	ttgggtggcc	tgcccttccg	agtcttccac	tgcacacagt	acatcagaca	tggatccaag	1440
	cccattgtata	ccccgaacc	tgacatctgc	catgagctgt	tgggacatgt	gcccttgttt	1500
	tcagatcgca	gctttgcccc	gttttcccag	gaaattggcc	ttgcctctct	gggtgcacct	1560
	gatgaataca	ttgaaaagct	cgccacaatt	tactggttta	ctgtggagtt	tgggctctgc	1620
30	aaacaaggag	actccataaa	ggcatatggt	gctgggctcc	tgtcatcctt	tggatgaatta	1680
	cagtactgct	tatcagagaa	gcaaagctt	ctccccctgg	agctggagaa	gacagccatc	1740
	caaaattaca	ctgtcacgga	gttccagccc	ctctattacg	tggcagagag	ttttaatgat	1800
	gccaaggaga	aagtaaggaa	ctttgctgcc	acaatacctc	ggcccttctc	agttcgctac	1860
	gaccataca	cccaaaggat	tgaggctctg	gacaataccc	agcagcttaa	gattttggct	1920
35	gattccatta	acagtgaaat	tggaatcctt	tgcaagtgcc	tccagaaaat	aaagtaatta	1980
	attaagagca	tcttaccgcc	atltattccc	atatttgttc	tgtttttctt	gatttgggta	2040
	tacatttaaa	tgtaataaaa	acaaaatggt	ggggcaatca	tttacatttt	tagggatag	2100
	taattactag	ttcaggtgta	ttgccacaag	acaacatgt	taagaaactt	tcccgttatt	2160
	tacgctctgt	tcctgttaat	caacctctgg	attacaaaat	ttgtgaaaga	ttgactgata	2220
40	ttcttaacta	tgttgctcct	tttacgctgt	gtggatatgc	tgctttatag	cctctgtatc	2280
	tagctattgc	ttcccgtacg	gctttcgttt	tctcctcctt	gtataaatcc	tggttgctgt	2340
	ctcttttaga	ggagttgtgg	cccgttgtcc	gtcaacgtgg	cgtggtgtgc	tctgtgtttg	2400
	ctgacgcaac	ccccactggc	tggggcattg	ccaccacctg	tcaactcctt	tctgggactt	2460
	tcgctttccc	cctcccgatc	gccacggcag	aactcatcgc	cgctgcctt	gcccgtgct	2520
45	ggacaggggc	taggttgctg	ggcactgata	attccgtggg	gttgtctgtg	ccttctagtt	2580
	gccagccatc	tgttgtttgc	ccctcccccg	tgcttctcct	gacctggaa	ggtgccactc	2640
	ccactgtcct	ttcctaataa	aatgaggaaa	ttgcatcgca	ttgtctgagt	aggtgtcatt	2700
	ctattctggg	gggtgggggtg	gggcaggaca	gcaaggggga	ggattgggaa	gacaatagca	2760

	ggcatgctgg	ggatgcggtg	ggctctatgg	ctctagagca	tggctacgta	gataagtagc	2820
	atggcggggtt	aatcattaac	tacacctgca	ggaggaaccc	ctagtgatgg	agttggccac	2880
	tcctctctcg	cgcgctcgct	cgctcactga	ggccgggcga	ccaaaggtcg	cccgacgccc	2940
	gggcggcctc	agtgagcgag	cgagcgcgca	gctgcctgca	ggggcgcgcc	tcgaggcatg	3000
5	cggtaccaag	cttgtcgaga	agtactagag	gatcataatc	agccatacca	catttgtaga	3060
	ggttttactt	gctttaaaaa	acctcccaca	cctccccctg	aacctgaaac	ataaaatgaa	3120
	tgcaattggt	gttgtaact	tgtttattgc	agcttataat	ggttacaaat	aaagcaatag	3180
	catcacaat	ttcacaaata	aagcattttt	ttcactgcat	tctagtgtg	gtttgtccaa	3240
	actcatcaat	gtatcttata	atgtctggat	ctgatcactg	atatcgccca	ggagatccga	3300
10	accagataag	tgaaatctag	ttccaaaacta	ttttgtcatt	tttaattttc	gtattagctt	3360
	acgacgctac	accagttcc	catctatttt	gtcactcttc	cctaaataat	ccttaaaaac	3420
	tccatttcca	cccctcccag	ttcccaacta	ttttgtccgc	ccacagcggg	gcatttttct	3480
	tctgttatg	tttttaata	aacatcctgc	caactccatg	tgacaaaccg	tcatcttcgg	3540
	ctactttttc	tctgtcacag	aatgaaaatt	tttctgtcat	ctcttcggtta	ttaatgtttg	3600
15	taattgactg	aatatcaacg	cttatttgca	gcctgaatgg	cgaatgggac	gcgccctgta	3660
	gcggcgcatt	aagcgcggcg	ggtgtggtgg	ttacgcgcag	cgtagccgct	acacttgcca	3720
	gcgccctagc	gcccgcctct	ttcgccttct	tcccttcctt	tctcgccacg	ttcgccgget	3780
	ttccccgtca	agctctaaat	cgggggctcc	ctttagggtt	ccgatttagt	gctttacggc	3840
	acctcgaccc	caaaaaactt	gattaggggtg	atggttcacg	tagtggggcca	tcgccctgat	3900
20	agacggtttt	tcgccctttg	acgttgagat	ccacgttctt	taatagtgga	ctcttgttcc	3960
	aaactggaac	aacactcaac	cctatctcgg	tctattcttt	tgatttataa	gggattttgc	4020
	cgatttcggc	ctattggtta	aaaaatgagc	tgatttaaca	aaaatttaac	gcgaatttta	4080
	acaaaatatt	aacgtttaca	atttcaggtg	gcacttttctg	gggaaatgtg	cgcggaaccc	4140
	ctatttgttt	atttttctaa	atacattcaa	atatgtatcc	gctcatgaga	caataaccct	4200
25	gataaatgct	tcaataatat	tgaaaaagga	agagtatgag	tattcaacat	ttccgtgtcg	4260
	cccttattcc	cttttttgcg	gcattttgcc	ttcctgtttt	tgctcaccca	gaaacgctgg	4320
	tgaaagtaaa	agatgctgaa	gatcagttgg	gtgcacgagt	gggttacatc	gaactggatc	4380
	tcaacagcgg	taagatcctt	gagagttttc	gccccgaaga	acgttttcca	atgatgagca	4440
	cttttaaagt	tctgctatgt	ggcgcggtat	tatcccgtat	tgacgccggg	caagagcaac	4500
30	tcggtcgcgg	catacactat	tctcagaatg	acttggttga	gtactacca	gtcacagaaa	4560
	agcatcttac	ggatggcatg	acagtaagag	aattatgcag	tgctgccata	accatgagtg	4620
	ataacactgc	ggccaactta	cttctgacaa	cgatcggagg	accgaaggag	ctaaccgctt	4680
	ttttgcacaa	catgggggat	catgtaactc	gccttgatcg	ttgggaaccg	gagctgaatg	4740
	aagccatacc	aaacgacgag	cgtagacacca	cgatgcctgt	agcaatggca	acaacgttgc	4800
35	gcaaaactatt	aactggcga	ctacttactc	tagcttcccg	gcaacaatta	atagactgga	4860
	tggaggcggg	taaagttgca	ggaccacttc	tgcgctcggc	ccttccggct	ggctggttta	4920
	ttgctgataa	atctggagcc	ggtgagcgtg	ggtctcgcgg	tatcattgca	gcactggggc	4980
	cagatggtaa	gccctcccgt	atcgtagtta	tctacacgac	ggggagtcag	gcaactatgg	5040
	atgaacgaaa	tagacagatc	gctgagatag	gtgcctcact	gattaagcat	tggttaactgt	5100
40	cagaccaagt	ttactcatat	atactttaga	ttgatttaaa	acttcatttt	taatttaaaa	5160
	ggatctagggt	gaagatcctt	tttgataatc	tcatgaccaa	aatcccttaa	cgtgagtttt	5220
	cgttccactg	agcgtcagac	cccgtagaaa	agatcaaagg	atcttcttga	gatccttttt	5280
	ttctgcgcgt	aatctgctgc	ttgcaaaaca	aaaaaccacc	gctaccagcg	gtggtttggt	5340
	tgccggatca	agagctacca	actctttttc	cgaaggtaac	tggcttcagc	agagcgcaga	5400
45	taccaataac	tgctcttcta	gtgtagccgt	agttaggcca	ccacttcaag	aactctgtag	5460
	caccgcctac	atacctcgct	ctgctaatac	tgttaccagt	ggctgctgcc	agtggcgata	5520
	agtcgtgtct	taccgggttg	gactcaagac	gatagttacc	ggataaggcg	cagcggctcg	5580
	gctgaacggg	gggttcgtgc	acacagccca	gcttgagcgc	aacgacctac	accgaactga	5640

	gataacctaca	gcggtgagcat	tgagaaaagcg	ccacgcttcc	cgaagggaga	aaggcggaca	5700
	ggtatccggt	aagcggcag	gtcggaacag	gagagcgac	gagggagctt	ccaggggaa	5760
	acgctggta	tctttatagt	cctgtcgggt	ttcgccacct	ctgacttgag	cgtcgatttt	5820
	tgtgatgctc	gtcagggggg	cggagcctat	ggaaaaacgc	cagcaacgcg	gcctttttac	5880
5	ggttcctggc	cttttgctgg	ccttttgctc	acatgttctt	tcttgcgta	ttccctgatt	5940
	ctgtggataa	ccgtattacc	gcctttgagt	gagctgatac	cgctcgccgc	agccgaacga	6000
	ccgagcgcag	cgagtcagt	agcgaggaag	cggaagagcg	cctgatgagg	tattttctcc	6060
	ttacgcatct	gtgcggtatt	tcacaccgca	gaccagccgc	gtaacctggc	aaaatcggtt	6120
	acggttgagt	aataaatgga	tgccctgcgt	aagcgggtgt	gggcggaca	taaagtctta	6180
10	aactgaacaa	aatagatcta	aactatgaca	ataaagtctt	aaactagaca	gaatagttgt	6240
	aaactgaaat	cagtccagtt	atgctgtgaa	aaagcatact	ggacttttgt	tatggctaaa	6300
	gcaaaactctt	cattttctga	agtgcaaaatt	gcccgtcgta	ttaaagaggg	gcgtggccaa	6360
	gggcatggta	aagactatat	tcgcggcggt	gtgacaattt	accgaacaac	tccgcgcccg	6420
	ggaagccgat	ctcggcttga	acgaattggt	aggtggcggt	acttgggtcg	atatcaaagt	6480
15	gcatcacttc	ttcccgtatg	cccaactttg	tatagagagc	caactgaggc	tcgtcacctg	6540
	aatctgcttg	cacgtagatc	acataagcac	caagcgcggt	ggcctcatgc	ttgaggagat	6600
	tgatgagcgc	ggtggcaatg	ccctgcctcc	ggtgctcgcc	ggagactgag	agatcataga	6660
	tatagatctc	actacgcggc	tgctcaaacc	tgggcagaac	gtaagccgag	agagcgccaa	6720
	caaccgcttc	ttggtcgaag	gcagcaagcg	cgatgaatgt	cttactacgg	agcaagttcc	6780
20	cgaggtaatc	ggagtccggc	tgatgttggg	agtaggtggc	tacgtctccg	aactcacgac	6840
	cgaaaagatc	aagagcagcc	cgcatggatt	tgacttggtc	agggccgagc	ctacatgtgc	6900
	gaatgatgcc	catacttgag	ccacctaact	ttgttttagg	gagactgccc	tgctgcgtaa	6960
	catcgttgct	gctgcgtaac	atcgttgctg	ctccataaca	tcaaaccatc	accacggcg	7020
	taacgcgctt	gctgcttggg	tgcccagggc	atagactgta	caaaaaaaca	gtcataacaa	7080
25	gccatgaaaa	ccgccactgc	gccgttacca	ccgctgcggt	cggcaaggt	tctggaccag	7140
	ttgctgagc	gcatacgtca	cttgcattac	agtttacgaa	ccgaacaggc	ttatgtcaac	7200
	tgggttcgtg	ccttcatccg	tttccacggt	gtgctgacc	cggcaacctt	gggagcagc	7260
	gaagtgcagg	catttctgtc	ctggctggcg	aacgagcgca	aggtttcggg	ctccacgcat	7320
	cgtcaggcat	tggcggcctt	gctgttcttc	tacggcaagg	tgctgtgcac	ggatctgccc	7380
30	tggcttcagg	agatcggaag	acctcggccg	tcgcggcgct	tgccgggtgg	gctgaccccg	7440
	gatgaagtgg	ttcgcaccc	cggttttctg	gaaggcgagc	atcgtttgtt	cgcccaggac	7500
	tctagctata	gttctagtgg	ttggctacgt	atactccgga	atattaatag	atcatggaga	7560
	taattaaat	gataaccatc	tcgcaaataa	ataagtattt	tactgttttc	gtaacagttt	7620
	tgtaataaaa	aaacctataa	atattccgga	ttattcatac	cgtcccacca	tcgggagcgg	7680
35	atctcggctc	gaaaccatgt	cgctactacca	tcaccatcac	catcacgatt	acgatatccc	7740
	aacgaccgaa	aacctgtatt	ttcagggcgc	catgggatcc			7780
	<210>	194					
	<211>	7780					
	<212>	ДНК					
40	<213>	Искусственная последовательность					
	<220>						
	<223>	Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид					
	<400>	194					
	ggccggcccc	tgagggcagc	tgccgctcgc	ctcgcctcact	gagggccccc	gggcaagacc	60
45	cgggcgtcgg	gscacctttg	gtcggcccggc	ctcagtgagc	gagcagcgcg	gcagagaggg	120
	agtgggccaa	tccatcacta	ggggttcctt	gtagttaatg	attaaccgca	catgctactt	180
	atctacgtag	ccatgctcta	gacgggggag	gctgctgggt	aatattaacc	aaggtcacc	240
	cagttatcgg	aggagcaaac	aggggctaag	tccacacgcg	tgggtaccgct	tgtctgcaca	300

	tttcgtagag	cgagtgttcc	gataactctaa	tctccctag	caaggttcat	atttgtgtag	360
	gttacttatt	ctccttttgt	tgactaagtc	aataatcaga	atcagcaggt	ttggagtcag	420
	cttggcaggg	atcagcagcc	tgggttgaa	ggaggggta	taaaagcccc	ttcaccagga	480
	gaagccgtca	cacagatcca	caagctcctg	aagaggtaa	ggtttaaggg	atggttggtt	540
5	ggtggggat	taatgttaa	ttacctggag	cacctgcctg	aatcacttt	ttttcaggtt	600
	ggtttaaacg	ccgccacat	gagtacagct	gtgcttga	atcctggcct	gggcaggaag	660
	cttagtgact	ttggccagga	aacatcttat	attgaagaca	actgcaacca	gaatgggtcc	720
	atctctctta	tcttctccct	gaaagaagag	gtgggagccc	tggcaaaggt	tttaaggctc	780
	tttgaggaga	atgatgtgaa	tttgacacac	attgagtcca	ggccttctag	actcaagaaa	840
10	gatgaatatg	agttcttcac	ccacctggac	aagaggagtc	tcctgctct	gaccaacatt	900
	atcaagatct	tgagacatga	tataggagct	acagtgcag	aactttcaag	ggataaaaag	960
	aaggacactg	tcccctggtt	tcccagaact	atccaagaat	tagacaggtt	tgccaatcag	1020
	atcctgagct	atggtgcaga	attagatgca	gaccaccctg	ggtttaaaga	cctgtgtat	1080
	agagccagaa	gaaagcagtt	tgctgacatt	gcatacaact	acaggcatgg	gcagcccatt	1140
15	cctaggggtg	agtacatgga	ggaagaaaa	aagacctggg	gcacagtttt	caagaccctg	1200
	aagagccttt	acaagacaca	tgctgctat	gaatataacc	atatatttcc	attggtggag	1260
	aaatactgtg	gatttcatga	agataacatc	cccagctgg	aggatgttag	tcagtttctg	1320
	cagacctgca	caggctttag	actgaggcca	gttgaggac	tgctaagttc	tagggacttc	1380
	ctgggtgggc	tagccttcag	agtgttcac	tgtaccat	atataaggca	tgatccaag	1440
20	cccatgtaca	cccctgagcc	tgatatctgc	catgagctat	tgggcatgt	cccctattt	1500
	tctgacagaa	gctttgccca	gttctcccag	gagattggat	tagcctctct	gggagctcct	1560
	gatgagtaca	ttgagaagtt	agcaaccatc	tactggttca	ctgtggaatt	tgccctttgc	1620
	aaacaagggg	atagtataaa	ggcttatgga	gcaggtctgc	ttagcagttt	tgagagctg	1680
	cagtactgcc	tgtcagaaaa	gccaaaagctc	ctaccattag	aactagaaaa	gactgccatc	1740
25	cagaactata	cagtcactga	attccagcct	ctctactatg	tggctgagtc	ttcaatgat	1800
	gccaaaggaga	aggtgagaaa	ttttgcagcc	accattccca	ggccttctc	tgtagatat	1860
	gaccctaca	ctcagaggat	tgaggtcctg	gacaataccc	agcaactaaa	aattctggct	1920
	gattccatta	attctgaaat	tggtatcctc	tgctctgctc	tccagaagat	taaatgatta	1980
	attaagagca	tcttaccgcc	atattattccc	atatttgttc	tgtttttctt	gatttgggta	2040
30	tacatttaaa	tgtaataaaa	acaaaatggt	ggggcaatca	tttacatttt	tagggatag	2100
	taattactag	ttcaggtgta	ttgccacaag	acaaacatgt	taagaaactt	tcccgttatt	2160
	tacgctctgt	tcctgttaat	caacctctgg	attacaaaat	ttgtgaaaga	ttgactgata	2220
	ttcttaacta	tgttgctcct	tttacgctgt	gtggatatgc	tgctttatag	cctctgtatc	2280
	tagctattgc	ttcccgtacg	gctttcgttt	tctcctcctt	gtataaatcc	tggttctgt	2340
35	ctcttttaga	ggagtgtg	cccgttgtcc	gtcaacgtgg	cgtggtgtgc	tctgtgttg	2400
	ctgacgcaac	cccactggc	tggggcattg	ccaccacctg	tcaactcctt	tctgggactt	2460
	tcgctttccc	cctcccgatc	gccacggcag	aactcatcgc	cgctgcctt	gcccgtgct	2520
	ggacaggggc	taggttgctg	ggcactgata	attccgtggt	gttgtctgtg	ccttctagtt	2580
	gccagccatc	tggtgtttgc	ccctcccccg	tgcttccctt	gacctggaa	ggtgccactc	2640
40	ccactgtcct	ttcctaataa	aatgaggaaa	ttgcatcgca	ttgtctgagt	agggtgcatt	2700
	ctattctggg	gggtgggggtg	gggcaggaca	gcaaggggga	ggattgggaa	gacaatagca	2760
	ggcatgctgg	ggatgcgggtg	ggctctatgg	ctctagagca	tggctacgta	gataagtagc	2820
	atggcgggtt	aatcattaac	tacacctgca	ggaggaaccc	ctagtgatgg	agttggccac	2880
	tcctctctg	cgcgctcgct	cgctcactga	ggccgggcca	caaaggtcg	cccgcgccc	2940
45	gggcggcctc	agtgagcgag	cgagcgcgca	gctgcctgca	ggggcgcgcc	tcgaggcatg	3000
	cggtaccaag	cttgtcgaga	agtactagag	gatcataatc	agccatacca	cattttaga	3060
	ggttttactt	gctttaaaaa	acctcccaca	cctccccctg	aacctgaaac	ataaaatgaa	3120
	tgcaattggt	ggtgttaact	tgtttattgc	agcttataat	ggttacaat	aaagcaatag	3180

	catcacaat	ttcacaata	aagcattttt	ttcactgcat	tctagttgtg	gtttgtccaa	3240
	actcatcaat	gtatcttatc	atgtctggat	ctgatcactg	atatcgccta	ggagatccga	3300
	accagataag	tgaaatctag	ttccaaacta	ttttgtcatt	tttaattttc	gtattagctt	3360
	acgacgctac	acccagttcc	catctatttt	gtcactcttc	cctaaataat	ccttaaaaac	3420
5	tccattttcca	cccctcccag	ttcccaacta	ttttgtccgc	ccacagcggg	gcatttttct	3480
	tctgtttatg	tttttaataca	aacatcctgc	caactccatg	tgacaaaaccg	tcatcttcgg	3540
	ctactttttc	tctgtcacag	aatgaaaatt	tttctgtcat	ctcttcgtta	ttaatgtttg	3600
	taattgactg	aatatcaacg	cttatttgca	gcctgaatgg	cgaatgggac	gcgccctgta	3660
	gcggcgcatt	aagcgcggcg	gggtgtggtg	ttacgcgcag	cgtgaccgct	acacttgcca	3720
10	gcgccctagc	gcccgcctct	ttcgcctttct	tcccttcctt	tctcgccacg	ttcgccggct	3780
	ttccccgtca	agctctaaat	cgggggctcc	ctttaggggtt	ccgatttagt	gctttacggc	3840
	acctcgaccc	caaaaaactt	gattaggggtg	atggttcacg	tagtgggcca	tcgccctgat	3900
	agacggtttt	tcgccctttg	acgttgagat	ccacgttctt	taatagtgga	ctcttgttcc	3960
	aaactggaac	aacactcaac	cctatctcgg	tctattcttt	tgatttataa	gggattttgc	4020
15	cgattttcggc	ctattgggta	aaaaatgagc	tgatttaaca	aaaatttaac	gcgaatttta	4080
	acaaaatatt	aacgtttaca	atttcaggtg	gcactttttcg	gggaaatgtg	cgcggaaccc	4140
	ctatttgttt	atttttctaa	atacattcaa	atatgtatcc	gctcatgaga	caataaccct	4200
	gataaatgct	tcaataatat	tgaaaaagga	agagtatgag	tattcaacat	ttccgtgtcg	4260
	cccttattcc	cttttttgcg	gcattttgcc	ttcctgtttt	tgctcaccca	gaaacgctgg	4320
20	tgaaagtaaa	agatgctgaa	gatcagttgg	gtgcacgagt	gggttacatc	gaactggatc	4380
	tcaacagcgg	taagatcctt	gagagttttc	gccccgaaga	acgtttttcca	atgatgagca	4440
	cttttaaagt	tctgctatgt	ggcgcggtat	tatcccgtat	tgacgccggg	caagagcaac	4500
	tcggtcgccg	catacactat	tctcagaatg	acttggttga	gtactcacca	gtcacagaaa	4560
	agcatcttac	ggatggcatg	acagtaagag	aattatgcag	tgctgccata	acctgagtg	4620
25	ataaactgct	ggccaactta	cttctgacaa	cgatcggagg	accgaaggag	ctaaccgctt	4680
	ttttgcacaa	catgggggat	catgtaactc	gccttgatcg	ttgggaaccg	gagctgaatg	4740
	aagccatacc	aaacgacgag	cgtgacacca	cgatgcctgt	agcaatggca	acaacgttgc	4800
	gcaaaactatt	aactggcgaa	ctacttactc	tagcttcccg	gcaacaatta	atagactgga	4860
	tggaggcgga	taaagttgca	ggaccacttc	tgcgctcggc	ccttccggct	ggctggttta	4920
30	ttgctgataa	atctggagcc	ggtagcgtg	ggtctcgcgg	tatcattgca	gcactggggc	4980
	cagatggtaa	gccctcccgt	atcgtagtta	tctacacgac	ggggagttag	gcaactatgg	5040
	atgaacgaaa	tagacagatc	gctgagatag	gtgcctcact	gattaagcat	tggttaactgt	5100
	cagaccaagt	ttactcatat	atactttaga	ttgatttaaa	acttcatttt	taatttaaaa	5160
	ggatctaggt	gaagatcctt	tttgataatc	tcatgaccaa	aatcccttaa	cgtgagtttt	5220
35	cgttccactg	agcgtcagac	cccgtagaaa	agatcaaagg	atcttcttga	gatccttttt	5280
	ttctgcgcgt	aatctgctgc	ttgcaaaaaa	aaaaaccacc	gctaccagcg	gtggtttggt	5340
	tgccggatca	agagctacca	actctttttc	cgaaggtaac	tggcttcagc	agagcgcaga	5400
	taccaaatac	tgtccttcta	gtgtagccgt	agttaggcca	ccacttcaag	aactctgtag	5460
	caccgcctac	atacctcgct	ctgctaatac	tgttaccagt	ggctgctgcc	agtggcgata	5520
40	agtcgtgtct	taccgggttg	gactcaagac	gatagttacc	ggataaggcg	cagcggtcgg	5580
	gctgaacggg	gggttcgtgc	acacagccca	gcttgagcgc	aacgacctac	accgaactga	5640
	gatacctaca	gcgtgagcat	tgagaaagcg	ccacgcttcc	cgaagggaga	aaggcggaca	5700
	ggtatccggt	aagcggcagg	gtcggaacag	gagagcgcac	gagggagctt	ccagggggaa	5760
	acgcctggta	tctttatagt	cctgtcgggt	ttcgccacct	ctgacttgag	cgctgatttt	5820
45	tgtgatgctc	gtcagggggg	cggagcctat	ggaaaaacgc	cagcaacgcg	gcctttttac	5880
	ggttcctggc	cttttgctgg	ccttttgctc	acatgttctt	tctgctgta	tcccctgatt	5940
	ctgtggataa	ccgtattacc	gcctttgagt	gagctgatac	cgctcggcgc	agccgaacga	6000
	ccgagcgcag	cgagtcagtg	agcgaggaaag	cggaagagcg	cctgatgcgg	tattttctcc	6060

RU 2 814 137 C2

ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca gaccagccgc gtaacctggc aaaatcggtt 6120
 acggttgagt aataaatgga tgccctgcgt aagcgggtgt gggcggacaa taaagtctta 6180
 aactgaacaa aatagatcta aactatgaca ataaagtctt aaactagaca gaatagttgt 6240
 aaactgaaat cagtccagtt atgctgtgaa aaagcatact ggacttttgt tatggctaaa 6300
 5 gcaaactctt cattttctga agtgcaaatt gcccgtcgta ttaaagaggg gcgtggccaa 6360
 gggcatggta aagactatat tcgcggcggt gtgacaattt accgaacaac tccgcggccg 6420
 ggaagccgat ctcggttga acgaattgtt aggtggcggt acttgggtcg atatcaaagt 6480
 gcataccttc ttcccgtatg cccaactttg tatagagagc cactgcggga tcgtcacctg 6540
 aatctgcttg cacgtagatc acataagcac caagcgcggt ggctcatgc ttgaggagat 6600
 10 tgatgagcgc ggtggcaatg ccctgcctcc ggtgctcgcc ggagactgcg agatcataga 6660
 tatagatctc actacgcggc tgctcaaacc tgggcagaac gtaagccgcg agagcgccaa 6720
 caaccgcttc ttggtcgaag gcagcaagcg cgatgaatgt cttactacgg agcaagttcc 6780
 cgaggtaatc ggagtccggc tgatgttggg agtaggtggc tacgtctccg aactcacgac 6840
 cgaaaagatc aagagcagcc cgcattggatt tgacttggtc agggccgagc ctacatgtgc 6900
 15 gaatgatgcc catacttgag ccacctaaact ttgttttagg gcgactgcc tgctgcgtaa 6960
 catcgttgct gctgcgtaac atcgttggctg ctccataaca tcaaactcg acccacggcg 7020
 taacgcgctt gctgcttggg tgcccagggc atagactgta caaaaaaca gtcataacaa 7080
 gccatgaaaa ccgccactgc gccgttacca ccgctgcggt cggtaaggt tctggaccag 7140
 ttgcgtgagc gcatacgtc cttgcattac agtttacgaa ccgaacaggc ttatgtcaac 7200
 20 tgggttcgtg cttcatccg tttccacggt gtgcgtcacc cggcaacctt gggcagcagc 7260
 gaagtcgagg catttctgtc ctggctggcg aacgagcgca aggtttcggg ctccacgcat 7320
 cgtcaggcat tggcggcctt gctgttcttc tacggcaagg tgctgtgcac ggatctgcc 7380
 tggcttcagg agatcggaag acctcggccg tcgcggcgct tgccggtggt gctgaccccg 7440
 gatgaagtgg ttcgcatcct cggttttctg gaaggcgagc atcgtttggt cgcccaggac 7500
 25 tctagctata gttctagtgg ttggctacgt atactccgga atattaatag atcatggaga 7560
 taattaaaat gataaccatc tcgcaaataa ataagtattt tactgttttc gtaacagttt 7620
 tgtaataaaa aaacctataa atattccgga ttattcatac cgtcccacca tcgggcgagg 7680
 atctcgggtcc gaaaccatgt cgtactacca tcaccatcac catcacgatt acgatatccc 7740
 aacgaccgaa aacctgtatt ttcagggcgc catgggatcc 7780

30 <210> 195
 <211> 450
 <212> BEJOK
 <213> Homo sapiens
 <400> 195

35 Met Ser Thr Ala Val Leu Glu Asn Pro Gly Leu Gly Arg Lys Leu Ser
 1 5 10 15
 Asp Phe Gly Gln Glu Thr Ser Tyr Ile Glu Asp Asn Cys Asn Gln Asn
 20 25 30
 Gly Ala Ile Ser Leu Ile Phe Ser Leu Lys Glu Glu Val Gly Ala Leu
 35 40 45
 40 Ala Lys Val Leu Arg Leu Phe Glu Glu Asn Asp Val Asn Leu Thr His
 50 55 60
 Ile Glu Ser Arg Pro Ser Arg Leu Lys Lys Asp Glu Tyr Glu Phe Phe
 65 70 75 80
 45 Thr His Leu Asp Lys Arg Ser Leu Pro Ala Leu Thr Asn Ile Ile Lys
 85 90 95
 Ile Leu Arg His Asp Ile Gly Ala Thr Val His Glu Leu Ser Arg Asp
 100 105 110

RU 2814137 C2

Lys Lys Lys Asp Thr Val Pro Trp Phe Pro Arg Thr Ile Gln Glu Leu
 115 120 125
 Asp Arg Phe Ala Asn Gln Ile Leu Ser Tyr Gly Ala Glu Leu Asp Ala
 130 135 140
 5 Asp His Pro Gly Phe Lys Asp Pro Val Tyr Arg Ala Arg Arg Lys Gln
 145 150 155 160
 Phe Ala Asp Ile Ala Tyr Asn Tyr Arg His Gly Gln Pro Ile Pro Arg
 165 170 175
 Val Glu Tyr Met Glu Glu Glu Lys Lys Thr Trp Gly Thr Val Phe Lys
 10 180 185 190
 Thr Leu Lys Ser Leu Tyr Lys Thr His Ala Cys Tyr Glu Tyr Asn His
 195 200 205
 Ile Phe Pro Leu Leu Glu Lys Tyr Cys Gly Phe His Glu Asp Asn Ile
 210 215 220
 15 Pro Gln Leu Glu Asp Val Ser Gln Phe Leu Gln Thr Cys Thr Gly Phe
 225 230 235 240
 Arg Leu Arg Pro Val Ala Gly Leu Leu Ser Ser Arg Asp Phe Leu Gly
 245 250 255
 Gly Leu Ala Phe Arg Val Phe His Cys Thr Gln Tyr Ile Arg His Gly
 20 260 265 270
 Ser Lys Pro Met Tyr Thr Pro Glu Pro Asp Ile Cys His Glu Leu Leu
 275 280 285
 Gly His Val Pro Leu Phe Ser Asp Arg Ser Phe Ala Gln Phe Ser Gln
 290 295 300
 25 Glu Ile Gly Leu Ala Ser Leu Gly Ala Pro Asp Glu Tyr Ile Glu Lys
 305 310 315 320
 Leu Ala Thr Ile Tyr Trp Phe Thr Val Glu Phe Gly Leu Cys Lys Gln
 325 330 335
 Gly Asp Ser Ile Lys Ala Tyr Gly Ala Gly Leu Leu Ser Ser Phe Gly
 30 340 345 350
 Glu Leu Gln Tyr Cys Leu Ser Glu Lys Pro Lys Leu Leu Pro Leu Glu
 355 360 365
 Leu Glu Lys Thr Ala Ile Gln Asn Tyr Thr Val Thr Glu Phe Gln Pro
 370 375 380
 35 Leu Tyr Tyr Val Ala Glu Ser Phe Asn Asp Ala Lys Glu Lys Val Arg
 385 390 395 400
 Asn Phe Ala Ala Thr Ile Pro Arg Pro Phe Ser Val Arg Tyr Asp Pro
 405 410 415
 Tyr Thr Gln Arg Ile Glu Val Leu Asp Asn Thr Gln Gln Leu Lys Ile
 40 420 425 430
 Leu Ala Asp Ser Ile Asn Ser Glu Ile Gly Ile Leu Cys Ser Ala Leu
 435 440 445
 Gln Lys
 450
 45 <210> 196
 <400> 196
 000
 <210> 197

<400> 197
000
<210> 198
<400> 198
5 000
<210> 199
<400> 199
000
<210> 200
10 <400> 200
000
<210> 201
<400> 201
000
15 <210> 202
<400> 202
000
<210> 203
<400> 203
20 000
<210> 204
<400> 204
000
<210> 205
25 <400> 205
000
<210> 206
<400> 206
000
30 <210> 207
<400> 207
000
<210> 208
<400> 208
35 000
<210> 209
<400> 209
000
<210> 210
40 <400> 210
000
<210> 211
<400> 211
000
45 <210> 212
<400> 212
000
<210> 213

<400> 213
000
<210> 214
<400> 214
5 000
<210> 215
<400> 215
000
<210> 216
10 <400> 216
000
<210> 217
<400> 217
000
15 <210> 218
<400> 218
000
<210> 219
<400> 219
20 000
<210> 220
<400> 220
000
<210> 221
25 <400> 221
000
<210> 222
<400> 222
000
30 <210> 223
<400> 223
000
<210> 224
<400> 224
35 000
<210> 225
<400> 225
000
<210> 226
40 <400> 226
000
<210> 227
<400> 227
000
45 <210> 228
<400> 228
000
<210> 229

<400> 229
 000
 <210> 230
 <400> 230
5 000
 <210> 231
 <400> 231
 000
 <210> 232
10 <400> 232
 000
 <210> 233
 <400> 233
 000
15 <210> 234
 <400> 234
 000
 <210> 235
 <400> 235
20 000
 <210> 236
 <400> 236
 000
 <210> 237
25 <400> 237
 000
 <210> 238
 <400> 238
 000
30 <210> 239
 <400> 239
 000
 <210> 240
 <400> 240
35 000
 <210> 241
 <400> 241
 000
 <210> 242
40 <400> 242
 000
 <210> 243
 <400> 243
 000
45 <210> 244
 <400> 244
 000
 <210> 245

<400> 245
000
<210> 246
<400> 246
5 000
<210> 247
<400> 247
000
<210> 248
10 <400> 248
000
<210> 249
<400> 249
000
15 <210> 250
<400> 250
000
<210> 251
<400> 251
20 000
<210> 252
<400> 252
000
<210> 253
25 <400> 253
000
<210> 254
<400> 254
000
30 <210> 255
<400> 255
000
<210> 256
<400> 256
35 000
<210> 257
<400> 257
000
<210> 258
40 <400> 258
000
<210> 259
<400> 259
000
45 <210> 260
<400> 260
000
<210> 261

<400> 261
 000
 <210> 262
 <400> 262
5 000
 <210> 263
 <400> 263
 000
 <210> 264
10 <400> 264
 000
 <210> 265
 <400> 265
 000
15 <210> 266
 <400> 266
 000
 <210> 267
 <400> 267
20 000
 <210> 268
 <400> 268
 000
 <210> 269
25 <400> 269
 000
 <210> 270
 <400> 270
 000
30 <210> 271
 <400> 271
 000
 <210> 272
 <400> 272
35 000
 <210> 273
 <400> 273
 000
 <210> 274
40 <400> 274
 000
 <210> 275
 <400> 275
 000
45 <210> 276
 <400> 276
 000
 <210> 277

<400> 277
 000
 <210> 278
 <400> 278
5 000
 <210> 279
 <400> 279
 000
 <210> 280
10 <400> 280
 000
 <210> 281
 <400> 281
 000
 <210> 282
 <400> 282
 000
 <210> 283
 <400> 283
20 000
 <210> 284
 <400> 284
 000
 <210> 285
 <400> 285
25 000
 <210> 286
 <400> 286
 000
 <210> 287
 <400> 287
 000
 <210> 288
 <400> 288
35 000
 <210> 289
 <400> 289
 000
 <210> 290
 <400> 290
40 000
 <210> 291
 <400> 291
 000
 <210> 292
 <400> 292
45 000
 <210> 293

<400> 293
000
<210> 294
<400> 294
5 000
<210> 295
<400> 295
000
<210> 296
10 <400> 296
000
<210> 297
<400> 297
000
15 <210> 298
<400> 298
000
<210> 299
<400> 299
20 000
<210> 300
<400> 300
000
<210> 301
25 <400> 301
000
<210> 302
<400> 302
000
30 <210> 303
<400> 303
000
<210> 304
<400> 304
35 000
<210> 305
<400> 305
000
<210> 306
40 <400> 306
000
<210> 307
<400> 307
000
45 <210> 308
<400> 308
000
<210> 309

<400> 309
 000
 <210> 310
 <400> 310
 5 000
 <210> 311
 <400> 311
 000
 <210> 312
 10 <400> 312
 000
 <210> 313
 <400> 313
 000
 15 <210> 314
 <400> 314
 000
 <210> 315
 <400> 315
 20 000
 <210> 316
 <400> 316
 000
 <210> 317
 25 <400> 317
 000
 <210> 318
 <400> 318
 000
 30 <210> 319
 <400> 319
 000
 <210> 320
 <400> 320
 35 000
 <210> 321
 <400> 321
 000
 <210> 322
 40 <400> 322
 000
 <210> 323
 <400> 323
 000
 45 <210> 324
 <400> 324
 000
 <210> 325

<400> 325
000
<210> 326
<400> 326
5 000
<210> 327
<400> 327
000
<210> 328
10 <400> 328
000
<210> 329
<400> 329
000
15 <210> 330
<400> 330
000
<210> 331
<400> 331
20 000
<210> 332
<400> 332
000
<210> 333
25 <400> 333
000
<210> 334
<400> 334
000
30 <210> 335
<400> 335
000
<210> 336
<400> 336
35 000
<210> 337
<400> 337
000
<210> 338
40 <400> 338
000
<210> 339
<400> 339
000
45 <210> 340
<400> 340
000
<210> 341

<400> 341
 000
 <210> 342
 <400> 342
 5 000
 <210> 343
 <400> 343
 000
 <210> 344
 10 <400> 344
 000
 <210> 345
 <400> 345
 000
 15 <210> 346
 <400> 346
 000
 <210> 347
 <400> 347
 20 000
 <210> 348
 <400> 348
 000
 <210> 349
 25 <400> 349
 000
 <210> 350
 <400> 350
 000
 30 <210> 351
 <400> 351
 000
 <210> 352
 <400> 352
 35 000
 <210> 353
 <400> 353
 000
 <210> 354
 40 <400> 354
 000
 <210> 355
 <400> 355
 000
 45 <210> 356
 <400> 356
 000
 <210> 357

<400> 357
 000
 <210> 358
 <400> 358
5 000
 <210> 359
 <400> 359
 000
 <210> 360
10 <400> 360
 000
 <210> 361
 <400> 361
 000
 <210> 362
 <400> 362
 000
 <210> 363
 <400> 363
20 000
 <210> 364
 <400> 364
 000
 <210> 365
 <400> 365
25 000
 <210> 366
 <400> 366
 000
 <210> 367
 <400> 367
 000
 <210> 368
 <400> 368
35 000
 <210> 369
 <400> 369
 000
 <210> 370
40 <400> 370
 000
 <210> 371
 <400> 371
 000
 <210> 372
45 <400> 372
 000
 <210> 373

<400> 373
 000
 <210> 374
 <400> 374
 5 000
 <210> 375
 <400> 375
 000
 <210> 376
 10 <400> 376
 000
 <210> 377
 <400> 377
 000
 15 <210> 378
 <400> 378
 000
 <210> 379
 <400> 379
 20 000
 <210> 380
 <211> 1365
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus
 25 <400> 380
 atggcagctg ttgtcctgga gaacggagtc ctgagcagaa aactctcaga ctttgggcag 60
 gaaacaagtt acatcgaaga caactccaat caaaatggtg ctgtatctct gatattctca 120
 ctcaaagagg aagttggtgc cctggccaag gtcctgcgct tatttgagga gaatgagatc 180
 aacctgacac acattgaatc cagaccttcc cgtttaaaca aagatgagta tgagtttttc 240
 30 acctatctgg ataagcgtag caagcccgtc ctgggcagca tcatcaagag cctgaggaac 300
 gacattggtg ccaactgtcca tgagctttcc cgagacaagg aaaagaacac agtgccttgg 360
 ttcccaagga ccattcagga gctggacaga ttcgccaatc agattctcag ctatggagcc 420
 gaactggatg cagaccaccc aggctttaa gatcctgtgt accgggcgag acgaaagcag 480
 tttgctgaca ttgcctacaa ctaccgccat gggcagccca ttcctcgggt ggaatacaca 540
 35 gaggaggaga ggaagacctg ggaacgggtg ttcaggactc tgaaggcctt gtataaaaca 600
 catgcctgct acgagcacaa ccacatcttc cctcttctgg aaaagtactg cggtttccgt 660
 gaagacaaca tcccgcagct ggaagatggt tctcagtttc tgcagacttg tactggtttc 720
 cgcctccgtc ctggtgctgg cttactgtcg tctcgagatt tcttgggtgg cctggccttc 780
 cgagtcttcc actgcacaca gtacattagg catggatcta agcccatgta cacacctgaa 840
 40 cctgatatct gtcatgaact cttgggacat gtgcccttgt tttcagatag aagctttgcc 900
 cagttttctc aggaaattgg gcttgcatcg ctgggggcac ctgatgagta cattgagaaa 960
 ctggccacaa tttactgggt tactgtggag tttgggcttt gcaaggaagg agattctata 1020
 aaggcatatg gtgctgggct cttgtcatcc tttggagaat tacagtactg tttatcgac 1080
 aagccaaagc tcctgcccct ggagctagag aagacagcct gccaggagta tactgtcaca 1140
 45 gaggttccagc ctctgtacta tgtggccgag agtttcaatg atgccaagga gaaagtgagg 1200
 acttttgctg ccacaatccc ccggcccttc tccgttcgct atgacccta cactcaaagg 1260
 gttgaggtcc tggacaatac tcagcagttg aagatttttag ctgactccat taatagttag 1320
 gttggaatcc tttgccatgc cctgcagaaa ataaagtcat gataa 1365

<210> 381
 <211> 1362
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 381
 atgtccactg cggtcctgga aaaccaggc ttgggcagga aactctctga ctttgacag 60
 gaaacaagct atattgaaga caactgcaat caaaatgggtg ccatatcact gatcttctca 120
 ctcaaagaag aagttgggtgc attggccaaa gtattgctgt tatttgagga gaatgatgta 180
 aacctgacct acattgaatc tagaccttct cgtttaaaga aagatgagta tgaatttttc 240
 10 acccatttgg ataaacgtag cctgcctgct ctgacaaaaca tcatcaagat cttgaggcat 300
 gacattgggtg ccaactgtcca tgagctttca cgagataaga agaaagacac agtgccctgg 360
 ttcccaagaa ccattcaaga gctggacaga tttgccaatc agattctcag ctatggagcg 420
 gaactggatg ctgaccaccc tggttttaaa gatcctgtgt accgtgcaag acggaagcag 480
 tttgctgaca ttgcctacaa ctaccgccat gggcagccca tccctcgagt ggaatacatg 540
 15 gaggaagaaa agaaaacatg gggcacagtg ttcaagactc tgaagtcctt gtataaaacc 600
 catgcttgct atgagtacaa tcacatTTTT ccaacttcttg aaaagtactg tggcttccat 660
 gaagataaca ttccccagct ggaagacgtt tctcaattcc tgcagacttg cactggtttc 720
 cgctccgac ctgtggctgg cctgctttcc tctcgggatt tcttgggtgg cctggccttc 780
 cgagtcttcc actgcacaca gtacatcaga catggatcca agcccatgta tacccccga 840
 20 cctgacatct gccatgagct gttgggacat gtgcccttgt tttcagatcg cagctttgcc 900
 cagttttccc aggaaattgg ccttgctctct ctgggtgcac ctgatgaata cattgaaaag 960
 ctcgccacaa tttactgggt tactgtggag tttgggtctc gcaacaagg agactccata 1020
 aaggcatatg gtgctgggct cctgtcatcc tttggtgaat tacagtactg cttatcagag 1080
 aagccaaagc ttctccccct ggagctggag aagacagcca tccaaaatta cactgtcacg 1140
 25 gaggttccagc ccctgtatta cgtggcagag agttttaatg atgccaagga gaaagtaagg 1200
 aactttgctg ccacaatacc tcggcccttc tcagttcgtc acgaccata cacccaaagg 1260
 attgaggtct tggacaatac ccagcagctt aagattttgg ctgattccat taacagtgaa 1320
 attggaatcc tttgcagtgct cctccagaaa ataaagtaat aa 1362
 <210> 382
 30 <211> 1359
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид
 35 <400> 382
 atgagcaccg ccgtgctgga aaatcctggc ctgggcagaa agctgagcga cttcggccaa 60
 gagacaagct acatcgagga caactgcaac cagaacggcg ccatcagcct gatcttcagc 120
 ctgaaagaag aagtgggctc cctggccaag gtgctgagac tgttcgaaga gaacgacgtg 180
 aacctgacac acatcgagag cagaccacgc agactgaaga aggacgagta cgagttcttc 240
 40 acccacctgg acaagcggag cctgcctgct ctgaccaaca tcatcaagat cctgcggcac 300
 gacatcggcg ccacagtgca cgaactgagc cgggacaaga aaaaggacac cgtgccatgg 360
 ttccccagaa ccattcaaga gctggacaga ttcgccaacc agatcctgag ctatggcgcc 420
 gagctggacg ctgatcacc tggctttaag gaccccggtg accgggcccag aagaaagcag 480
 tttgcccgata tcgcctacaa ctaccggcac ggccagccta ttctcgggt cgagtacatg 540
 45 gaagaggaaa agaaaacctg gggcacctgt ttcaagacc tgaagtcctt gtacaagacc 600
 cacgcctgct acgagtacaa ccacatcttc ccaactgctcg aaaagtactg cggcttccac 660
 gaggacaata tccctcagct tgaggacgtg tcccagttcc tgcagacctg caccggcttt 720
 agactgaggc cagttgccgg actgctgagc agcagagatt ttctcggcgg cctggccttc 780

RU 2 814 137 C2

	agagtgttcc	actgtaccca	gtacatcaga	cacggcagca	agcccatgta	caccctgag	840
	cctgatatct	gccacgagct	gctgggacat	gtgcccctgt	tcagcgatag	aagcttcgcc	900
	cagttcagcc	aagagatcgg	actggcttct	ctgggagccc	ctgacgagta	cattgagaag	960
	ctggccacca	tctactggtt	caccgtggaa	ttcggcctgt	gcaagcaggg	cgacagcatc	1020
5	aaagcttatg	gcgctggcct	gctgtctagc	ttcggcgagc	tgcagtactg	tctgagcgag	1080
	aagcctaagc	tgctgcccct	ggaactggaa	aagaccgcca	tccagaacta	caccgtgacc	1140
	gagttccagc	ctctgtacta	cgtggccgag	agcttcaacg	acgccaaga	aaaagtgcgg	1200
	aacttcgccg	ccaccattcc	tcggcctttc	agcgtcagat	acgacccta	cacacagcgg	1260
	atcgaggtgc	tggacaacac	acagcagctg	aaaattctgg	ccgactccat	caacagcgag	1320
10	atcggcatcc	tgtgcagcgc	cctgcagaaa	atcaagtga			1359
	<210>	383					
	<211>	1359					
	<212>	ДНК					
	<213>	Homo sapiens					
15	<400>	383					
	atgtccactg	cggtcctgga	aaaccaggc	ttgggcagga	aactctctga	ctttggacag	60
	gaaacaagct	atattgaaga	caactgcaat	caaaatgggtg	ccatatcact	gatcttctca	120
	ctcaaagaag	aagttgggtg	attggccaaa	gtattgcgct	tatttgagga	gaatgatgta	180
	aacctgacct	acattgaatc	tagaccttct	cgtttaaaga	aagatgagta	tgaatttttc	240
20	accattttgg	ataaacgtag	cctgcctgct	ctgacaaaac	tcatcaagat	cttgaggcat	300
	gacattgggtg	ccactgtcca	tgagctttca	cgagataaga	agaaagacac	agtgccctgg	360
	ttcccaagaa	ccattcaaga	gctggacaga	tttgccaatc	agattctcag	ctatggagcg	420
	gaactggatg	ctgaccacct	tggttttaaa	gatcctgtgt	accgtgcaag	acggaagcag	480
	tttgctgaca	ttgcctacaa	ctaccgccat	gggcagccca	tccctcgagt	ggaatacatg	540
25	gaggaagaaa	agaaaacatg	gggcacagtg	ttcaagactc	tgaagtcctt	gtataaaacc	600
	catgcttgct	atgagtacaa	tcacattttt	ccacttcttg	aaaagtactg	tggttccat	660
	gaagataaca	ttcccagct	ggaagacgtt	tctcagttcc	tgcagacttg	cactggtttc	720
	cgctcccgac	ctgtggctgg	cctgctttcc	tctcgggatt	tcttgggtgg	cctggccttc	780
	cgagtcttcc	actgcacaca	gtacatcaga	catggatcca	agcccatgta	tacccccgaa	840
30	cctgacatct	gccatgagct	gttgggacat	gtgcccctgt	tttcagatcg	cagctttgcc	900
	cagttttccc	aggaaattgg	ccttgcctct	ctgggtgcac	ctgatgaata	cattgaaaag	960
	ctcgccacaa	tttactgggt	tactgtggag	tttgggctct	gcaaacaagg	agactccata	1020
	aaggcatatg	gtgctgggct	cctgtcatcc	tttgggtgaat	tacagtactg	cttatcagag	1080
	aagccaaagc	ttctccccct	ggagctggag	aagacagcca	tccaaaatta	cactgtcacg	1140
35	gagttccagc	ccctctatta	cgtggcagag	agttttaatg	atgccaaagga	gaaagtaagg	1200
	aactttgctg	ccacaatacc	tcggcccttc	tcagttcgct	acgaccata	cacccaaagg	1260
	attgaggtct	tggacaatac	ccagcagctt	aagattttgg	ctgattccat	taacagtga	1320
	attggaatcc	tttgcagtgc	cctccagaaa	ataaagtaa			1359
	<210>	384					
40	<211>	1359					
	<212>	ДНК					
	<213>	Искусственная последовательность					
	<220>						
	<223>	Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид					
45	<400>	384					
	atgagtacag	ctgtgcttga	aaatcctggc	ctgggcagga	agcttagtga	ctttggccag	60
	gaaacatctt	atattgaaga	caactgcaac	cagaatgggtg	ccatttctct	tatcttctcc	120
	ctgaaagaag	aggtgggagc	cctggcaaaag	gttttaaggc	tctttgagga	gaatgatgtg	180

	aatttgacac	acattgagtc	caggccttct	agactcaaga	aagatgaata	tgagttcttc	240
	accacactgg	acaagaggag	tctccctgct	ctgaccaaca	ttatcaagat	cttgagacat	300
	gatataggag	ctacagtgca	tgaactttca	agggataaaa	agaaggacac	tgtcccctgg	360
	tttccagaaa	ctatccaaga	attagacagg	tttgccaatc	agatcctgag	ctatgggtgca	420
5	gaattagatg	cagaccacc	tgggtttaa	gaccctgtgt	atagagccag	aagaaagcag	480
	tttgctgaca	ttgcatacaa	ctacaggcat	gggcagccca	ttcctaggg	ggagtacatg	540
	gaggaagaaa	aaaagacctg	gggcacagtt	ttcaagacc	tgaagagcct	ttacaagaca	600
	catgcctgct	atgaatataa	ccatataatt	ccattgttgg	agaaatactg	tggatttcat	660
	gaagataaca	tccccagct	ggaggatggt	agtcagtttc	tgcacacctg	cacaggcttt	720
10	agactgaggc	cagttgcagg	actgctaagt	tctagggact	tctgggtgg	gctagccttc	780
	agagtgttcc	actgtacca	atatataagg	catggatcca	agcccatgta	caccctgag	840
	cctgatatct	gccatgagct	attgggccat	gtccccctat	tttctgacag	aagctttgcc	900
	cagttctccc	aggagattgg	attagcctct	ctgggagctc	ctgatgagta	cattgagaag	960
	ttagcaacca	tctactggtt	cactgtggaa	tttggccttt	gcaaacaagg	ggatagtata	1020
15	aaggcttatg	gagcaggct	gcttagcagt	tttggagagc	tgcagtactg	cctgtcagaa	1080
	aagccaaagc	tcctaccatt	agaactagaa	aagactgcc	tccagaacta	tacagtcact	1140
	gaattccagc	ctctctacta	tgtggctgag	tctttcaatg	atgccaagga	gaaggtgaga	1200
	aattttgcag	ccaccattcc	caggcccttc	tctgttagat	atgacccta	cactcagagg	1260
	attgaggtcc	tggacaatac	ccagcaacta	aaaattctgg	ctgattccat	taattctgaa	1320
20	attggcatcc	tctgctctgc	tctccagaag	attaatga			1359
	<210>	385					
	<211>	1451					
	<212>	ДНК					
	<213>	Искусственная последовательность					
25	<220>						
	<223>	Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид					
	<400>	385					
	atgagtacag	ctgtgcttga	aaatcctggc	ctgggcagga	agcttagtga	ctttggccag	60
	aagaggtaa	ggtttaagg	atggttgggt	ggtggggtat	taatgttaa	ttacctggag	120
30	cacctgcctg	aaatcacttt	ttttcagggt	gggaaacatc	ttatattgaa	gacaactgca	180
	accagaatgg	tgccatttct	cttatcttct	ccctgaaaga	agaggtggga	gccctggcaa	240
	aggttttaag	gctctttgag	gagaatgatg	tgaatttgac	acacattgag	tccaggcctt	300
	ctagactcaa	gaaagatgaa	tatgagttct	tcaccacct	ggacaagagg	agtctccctg	360
	ctctgacca	cattatcaag	atcttgagac	atgatatagg	agctacagtg	catgaacttt	420
35	caagggataa	aaagaaggac	actgtcccct	ggtttccag	aactatccaa	gaattagaca	480
	ggtttgcaa	tcagatcctg	agctatgggt	cagaattaga	tgcacaccac	cctgggttta	540
	aagaccctgt	gtatagagcc	agaagaaaagc	agtttgctga	cattgcatac	aactacaggc	600
	atgggcagcc	cattcctagg	gtggagtaca	tggaggaaga	aaaaaagacc	tggggcacag	660
	ttttcaagac	cctgaagagc	ctttacaaga	cacatgcctg	ctatgaatat	aaccatata	720
40	ttccattggt	ggagaaatac	tgtggatttc	atgaagataa	catccccag	ctggaggatg	780
	ttagtcagtt	tctgcagacc	tgcacaggct	ttagactgag	gccagttgca	ggactgctaa	840
	gttctaggg	cttcctgggt	gggctagcct	tcagagtgtt	ccactgtacc	caatatataa	900
	ggcatggatc	caagcccatg	tacaccctg	agcctgatat	ctgccatgag	ctattgggcc	960
	atgtccccct	atthttctgac	agaagctttg	cccagtctc	ccaggagatt	ggattagcct	1020
45	ctctgggagc	tcctgatgag	tacattgaga	agttagcaac	catctactgg	ttcactgtgg	1080
	aattttggcct	ttgcaaacaa	ggggatagta	taaaggctta	tggagcagg	ctgcttagca	1140
	gttttgagga	gctgcagtac	tgctgtcag	aaaagccaaa	gctcctacca	ttagaactag	1200
	aaaagactgc	catccagaac	tatacagtca	ctgaattcca	gcctctctac	tatgtggctg	1260

	agtctttcaa	tgatgccaaag	gagaagggtga	gaaattttgc	agccaccatt	cccaggccct	1320	
	tctctgtag	atatgacccc	tacactcaga	ggattgaggt	cctggacaat	accagcaac	1380	
	taaaaattct	ggctgattcc	attaattctg	aaattggcat	cctctgctct	gctctccaga	1440	
	agattaaatg	a					1451	
5	<210>	386						
	<211>	3359						
	<212>	ДНК						
	<213>	Искусственная последовательность						
	<220>							
10	<223>	Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид						
	<400>	386						
	atgagtacag	ctgtgcttga	aaatcctggc	ctgggcagga	agcttagtga	ctttggccag	60	
	gtgagccagg	gcagcctgag	ctgctcagtt	aggggaattt	gggcctccag	agaaagagat	120	
	cccaagactg	ctggtgcttc	ctggtttcat	aagctcagta	agaagtctga	attggttgga	180	
15	agctgatgag	aatatccagg	aagtcaacag	acaaatgtcc	tcaacaattg	tttctaagta	240	
	ggagaacatc	tgtcctgggt	ggctttcaca	ggaatgaatg	accattgctt	taggggggtg	300	
	gggatctggc	ctccagaact	gccaccaatt	agctgtgtgt	ctttggacaa	gttactgtcc	360	
	ctctctgttg	tctgtttact	cttctgtaca	ctgaaggggc	tggtcctaa	tgatctggga	420	
	tgggatgtgg	aatccttcta	gatttctttt	gtaatattta	taaagtgtct	tcagcaaggt	480	
20	atcaaaatgg	caaaattgtg	agtaactatc	ctcctttcat	tttgggaaga	agatgaggca	540	
	tgaagagaat	tcagacagaa	acttactcag	accaggggag	gcagaaacta	agcagagagg	600	
	aaaatgacca	agagttagcc	ctgggcatgg	aatgtgaaag	aaccctaaag	gtgacttgga	660	
	aataatgccc	aaggatatatt	ccattctcct	ggatttggtg	gcattttctt	gaggtgaaga	720	
	attgcagaat	acattcttta	atgtgaccta	catatttacc	catgtgagga	agtctgctcc	780	
25	tggactcttg	agattcagtc	ataaagccca	ggccagggaa	ataatgtaag	tctgcaggcc	840	
	cctgtcatca	gtaggattag	ggagaagagt	tctcagtaga	aaacagggag	gctggagaga	900	
	aaagaatggg	taatgttaag	gttaatataa	ctagaaagac	tgcagaactt	aggactgatt	960	
	tttatttgaa	tccttaaaaa	aaaaaatttc	ttatgaaaat	agtacatggc	tcttaggaga	1020	
	cagaacttat	tgtacagagg	aacagtgtga	gagtcagagt	gaattttatg	tattatTTTT	1080	
30	ggacttaggc	taatgattta	gcaaaactctg	gaatgtcagc	cctaacccca	accttggttt	1140	
	tctgtcacat	gcatgtagta	agtgctagat	cctggacatt	ctttgagatt	tagtttaaga	1200	
	ctaagtttat	tttctgatag	gttattttgtg	tactttcatg	gattttgtaa	ctctttttca	1260	
	acaattggat	gtctcagatc	tcagcatatg	ggagcaagtt	aatgcttcct	gagatctttg	1320	
	ccaagggtca	agaggtcatt	tttgtgtatt	tataattttc	catcattttt	atatacttct	1380	
35	caatattctt	tttaaaactat	tcttttcctt	ttttcatcct	ctgaatactg	ttttgacaga	1440	
	tcttgttatt	agcatgcttt	cagggatgag	aaaactaaga	aagctgaatg	atttgcccaa	1500	
	agtagtccac	ctggaaaatg	aaagagagag	gattccaatc	caggtcttag	gattcaaaag	1560	
	cctgtgcatg	ttccattttt	agtactttcc	acactgtatt	tctcaatgtc	tttctgggac	1620	
	atTTTataaa	tcatattata	tcacctctaa	ggatctttca	gtttgttata	tatgtgtcta	1680	
40	ttaagttaga	ttgtgagctc	ctaaaagata	aagcattgtc	ttattcatct	ttaaatttct	1740	
	cagagcccaa	atagtgctctg	gaacctagta	gttgctcaat	aaaaggattt	gaatttacag	1800	
	gattgaatgg	tgacatcaat	gaataattga	agattcctta	agctgataac	tgaccagta	1860	
	gcatcattga	tcatttaatt	gccctggact	tacttatttt	ccaccacact	acatatttct	1920	
	gtatagaata	tatatagctc	attgtattgc	aagatttaac	tagaagaaag	agttcatgct	1980	
45	tgctttgtcc	atgtaggttt	aacaggaatg	aattgctaaa	ctgtggaaaa	tgTTTTaaac	2040	
	aaatgcatct	tatcctgtag	gaaacatctt	atattgaaga	caactgcaac	cagaatgggtg	2100	
	ccatttctct	tatcttctcc	ctgaaagaag	aggtgggagc	cctggcaaag	gttttaaggc	2160	
	tctttgagga	gaatgatgtg	aatttgacac	acattgagtc	caggccttct	agactcaaga	2220	

	aagatgaata	tgagttcttc	accacactgg	acaagaggag	tctccctgct	ctgaccaaca	2280
	ttatcaagat	cttgagacat	gatataggag	ctacagtgca	tgaactttca	agggataaaa	2340
	agaaggacac	tgtcccctgg	tttcccagaa	ctatccaaga	attagacagg	tttgccaatc	2400
	agatcctgag	ctatggtgca	gaattagatg	cagaccaccc	tgggtttaaa	gaccctgtgt	2460
5	atagagccag	aagaaagcag	tttgctgaca	ttgcatacaa	ctacaggcat	gggcagccca	2520
	ttcctagggg	ggagtacatg	gaggaagaaa	aaaagacctg	gggcacagtt	ttcaagaccc	2580
	tgaagagcct	ttacaagaca	catgcctgct	atgaatataa	ccatatatth	ccattgttgg	2640
	agaaatactg	tggatttcat	gaagataaca	tccccagct	ggaggatgth	agtcagtttc	2700
	tgcagacctg	cacaggctth	agactgaggc	cagttgcagg	actgctaagt	tctagggact	2760
10	tcttgggtgg	gctagccttc	agagtgttcc	actgtacca	atatataagg	catggatcca	2820
	agcccatgta	caccctgag	cctgatatact	gccatgagct	attgggcat	gtccccctat	2880
	tttctgacag	aagctttgcc	cagttctccc	aggagattgg	attagcctct	ctgggagctc	2940
	ctgatgagta	cattgagaag	ttagcaacca	tctactggtt	cactgtggaa	tttggcctth	3000
	gcaaacaagg	ggatagtata	aaggcttatg	gagcaggtct	gcttagcagt	tttggagagc	3060
15	tgcagtactg	cctgtcagaa	aagccaaaagc	tctaccatt	agaactagaa	aagactgcca	3120
	tccagaacta	tacagtcact	gaattccagc	ctcttacta	tgtggctgag	tctttcaatg	3180
	atgccaaagg	gaaggtgaga	aattttgcag	ccaccattcc	caggcccttc	tctgttagat	3240
	atgaccctta	cactcagagg	attgaggtcc	tggacaatac	ccagcaacta	aaaattctgg	3300
	ctgattccat	taattctgaa	attggcatcc	tctgctctgc	tctccagaag	attaatga	3359
20	<210>	387					
	<211>	1362					
	<212>	ДНК					
	<213>	Искусственная последовательность					
	<220>						
25	<223>	Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид					
	<400>	387					
	atggccgctg	tgggtgctgga	aaatggcgtg	ctgagcagaa	agctgagcga	cttcggccaa	60
	gagacaagct	acatcgagga	caacagcaac	cagaacggcg	ctgtgtccct	gatcttcagc	120
	ctgaaagaag	aagtgggocg	cctggccaag	gtgctgagac	tgtttgagga	aaacgagatc	180
30	aacctgacgc	acatcgagag	cagaccacgc	agactgaaca	aggacgagta	cgagttcttc	240
	acctacctgg	acaagagaag	caagcccgtg	ctgggcagca	tcatcaagag	cctgagaaac	300
	gacatcggcg	ccaccgtgca	cgagctgagc	agggacaaa	aaaagaacac	cgtgccatgg	360
	ttccccagga	ccatccaaga	gctggacaga	ttcgccaacc	agatcctgtc	ttacggcgcc	420
	gagctggacg	ctgatcacc	tggctttaa	gaccccggtg	acagagccag	aagaaagcag	480
35	ttgcgagata	tgcctacaa	ctacagacac	ggccagccta	ttcctagagt	cgagtacacc	540
	gaggaagaga	gaaagacctg	gggcaccgtg	ttcagaacct	tgaaggccct	gtacaagacc	600
	cacgcctgct	acgagcaca	ccacatcttc	ccactgctcg	aaaagtactg	cggtctccgc	660
	gaggataaca	tcctcagct	tgaggacgtg	tcccagttcc	tgcagacctg	cacaggcttc	720
	agactgaggc	cagttgctgg	cctgctgtcc	agcagagatt	ttctcggcgg	cctggccttc	780
40	agagtgttcc	actgtacca	gtacatcagg	cacggcagca	agcccatgta	caccctgag	840
	cctgacatct	gccacgagct	gctgggacat	gtgcctctgt	tcagcgacag	aagcttcgcc	900
	cagttcagcc	aagagatcgg	cctggctagt	ctgggcgctc	ctgatgagta	catcgagaag	960
	ctggccacca	tctactggtt	caccgtggaa	ttcggcctgt	gcaaagaggg	cgacagcatc	1020
	aaggttatg	gcgccggact	gctgtctagc	tttggcgagc	tgcagtactg	tctgagcgac	1080
45	aagcctaagc	tgctgccct	ggaactggaa	aagaccgcct	gccaagagta	cacagtgacc	1140
	gagttccagc	ctctgtacta	cgtggccgag	agcttcaacg	acgccaaga	aaaagtgcgg	1200
	accttcgccg	ctacaatccc	cagaccttcc	agcgtcagat	acgaccctta	cacacagcgc	1260
	gtggaagtgc	tggacaacac	acagcagctg	aagattctgg	ccgactccat	caacagcgaa	1320

	gtgggcatcc	tgtgtcacgc	cctgcagaaa	atcaagagct	ga	1362
	<210>	388				
	<211>	5531				
	<212>	ДНК				
5	<213>	Homo sapiens				
	<400>	388				
	atgtccactg	cggtcctgga	aaaccaggc	ttgggcagga	aactctctga	ctttggacag 60
	gtgagccacg	gcagcctgag	ctgctcagtt	aggggaattt	gggcctccag	agaaagagat 120
	ccgaagactg	ctggtgcttc	ctggtttcat	aagctcagta	agaagtctga	attcgttgga 180
10	agctgatgag	aatatccagg	aagtcaacag	acaaatgtcc	tcaacaattg	tttctaagta 240
	ggagaacatc	tgtcctcggg	ggctttcaca	ggaatgaatg	accattgctt	taggggggtg 300
	gggatctggc	ctccagaact	gccaccaatt	agctgtgtgt	ctttggacaa	gttactgtcc 360
	ctctctgttg	tctgtttact	cttctgtaca	ctgaaggggc	tggtccttaa	tgatctggga 420
	tgggatgtgg	aatccttcta	gatttctttt	gtaaatattta	taaagtgtc	tcagcaaggt 480
15	atcaaaatgg	caaaattgtg	agtaactatc	ctcctttcat	tttgggaaga	agatgaggca 540
	tgaagagaat	tcagacagaa	acttactcag	accaggggag	gcagaaacta	agcagagagg 600
	aaaatgacca	agagttagcc	ctgggcatgg	aatgtgaaag	aaccctaaac	gtgacttgga 660
	aataatgccc	aaggatatt	ccattctccg	ggatttggtg	gcattttctt	gaggatgaaga 720
	attgcagaat	acattcttta	atgtgaccta	catatttacc	catgggagga	agtctgctcc 780
20	tggactcttg	agattcagtc	ataaagccca	ggccagggaa	ataatgtaag	tctgcaggcc 840
	cctgtcatca	gtaggattag	ggagaagagt	tctcagtaga	aacaggggag	gctggagaga 900
	aaagaatggg	taatgttaac	gttaataata	ctagaaagac	tgcagaactt	aggactgatt 960
	tttatttgaa	tccttaaaaa	aaaaaatttc	ttatgaaaat	agtacatggc	tcttaggaga 1020
	cagaacttat	tgtacagagg	aacagcgtga	gagtcagagt	gatcccagaa	caggctctgg 1080
25	ctccatcctg	cacatagttt	tgggtgctgct	ggcaatacgg	tccccacaac	tgtgggaagg 1140
	ggttaggggc	agggatctca	tcaggaaaagc	ataggggttt	aaagttcttt	atagagcact 1200
	tagaagattg	agaatccaca	aattatatta	ataacaaaca	aagtagtgtc	gtgttatata 1260
	gtaaagtga	atgtgcagac	acatttaggg	aaaagtata	attaaaaaaa	taggctgtat 1320
	atataatcaat	ggttccaaaa	ttttctatgg	ttaagaatca	cctgggatgg	ttttgaaatg 1380
30	gcagattcta	agacaacttg	attcaacagg	tttaggtaaa	gccaggggaa	ctgcattata 1440
	agaaggaatc	acctgtaatt	ttggagtcaa	gatccaagga	acactcattg	agaaacactg 1500
	atttacaaaag	tgcatggaga	gaaatggagc	aagtgaaggg	ggatcagcat	ggtgaaatat 1560
	aggctgttag	gagtgctatt	gactaactgt	ctggtgactg	gaccagagta	aatcttttac 1620
	tttgcaagaa	acaggactaa	attcccatat	tatgtccata	gcaaagggaa	ttatgtagaa 1680
35	aaattgataa	ttaggagcct	gagttcttga	ccagcctcca	ctacctatgt	ggcctcaggt 1740
	gagttatttt	ctccctttgg	ctctaagttt	tccccatctg	taatgtaagg	gagtttaact 1800
	agatgagcac	taaggacaaa	tcaatttctg	tgagtcaatt	attatgaaat	accatgtggg 1860
	catcaaatgc	caagtggaaa	gcatagataa	agaagtgatt	gtgcacctgg	gctgagggga 1920
	acaaacattt	cctaagagaa	ttgagaccca	aaagagcctt	taaggaaggt	gagatcttgg 1980
40	aaagggaaat	ttggtgaata	ctctaattgag	gagctaaaaa	ggcaagaaag	aaagcagctt 2040
	ggctggaaaag	gaggttcctg	taggtggggc	tccagagatt	cggtagccaca	gaaactgccca 2100
	aacatcagca	agaagccatg	gggatggagc	gtttgaggga	ttctaaatag	aaggacaaga 2160
	gtaaaaatgt	caggctggat	cgatgcaggc	cactaagaaa	tggattcagg	tgatggcagt 2220
	gggaagaaaag	gacctgatgc	ccagaggcat	ttctggagaa	gatgagatca	gacttgtgat 2280
45	tggctgaaca	cacactgtag	tgggggtggg	tttagggggg	gactcaactt	caagcccagg 2340
	tacattcaag	tctgaattgc	cctagtcaaa	agtggtcatct	gtggatgtgt	atcagaaata 2400
	tcttactttt	cttggaaagcc	aacaggagaa	aagagtgtca	ccaagtgaac	tagagacagg 2460
	aatatctttt	gtcatttcaa	ggaaaactgga	aagaagaagg	ctcagtattc	tttagtagga 2520

	agaagactta	agtcagagac	tcatctgtac	ctctctggca	gggtttaaaa	gggggaagag	2580
	gaatagaggc	tgcaagagat	tgtgattcat	ggacagtatg	cagagatcaa	atgacctggg	2640
	ttcagatcct	ggctccactg	ctaactgtgt	aactataggc	aagttcctta	acctctctaa	2700
	gccttaaatct	tgtcatcaat	aaaagggggc	acttggtgcc	taataaaaacc	tacctcttag	2760
5	gttgttgcca	aattacatga	gataatccaa	atcaagtgct	tattataata	cccagaaatt	2820
	ataggctcta	aataaatggt	tatataggct	ctaaataaat	gaagtttttt	agaaagataa	2880
	catcatgatc	aaaatgggat	atttaacagt	ttagtcttcc	atctcatttg	aagctcccta	2940
	aaatcactct	tgctgataaa	tttgtttttt	ccttcacacc	tcagtttcat	gggatgtttt	3000
	ggcaaaaatc	tgaattttct	gaattgaaag	aattttttgc	taagggtcat	cagtattcat	3060
10	gcagggcttg	ttattctgag	tcactaagag	tttcctaaca	cagccttctc	tcattgagat	3120
	gatgtaacat	ctattccatt	aatttcatta	acttgcttac	aagagagtaa	ttgttctgca	3180
	aatttttttc	ttcccagttt	taggtacctg	ctgcttattg	tggacacaca	tagaatttta	3240
	tgtattattt	ttcgacttag	gctaattgatt	tagcaaaact	tggaatgtca	gccctaacc	3300
	caaccttggg	tttctgtcac	atgcatgtag	taagtgctag	atcctggaca	ttctttgaga	3360
15	tttagtttaa	gactaagttt	atcttctgat	aggttatttg	tgtactttca	tggattttgt	3420
	aactcttttt	caacaattgg	atgtctcaga	tctcagcata	tgggagcaag	ttaatgcttc	3480
	ctgagatctt	tgccaaaggt	caagagggtca	tttttgtgta	tttataattt	tccatcattt	3540
	ttatatactt	ctcaatattc	tttttaaact	attcttttcc	tttttcatc	ctctgaatac	3600
	tgttttgaca	gatcttggtt	ttagcatgct	ttcacggatg	agaaaactaa	gaaagctgaa	3660
20	tgatttgccc	aaagtagtcc	acctggaaaa	tgaaagagag	aggattccaa	tccaggtctt	3720
	acgattcaaa	agcctgtgca	tgttccattt	ttagtacttt	ccacactgta	tttctcaatg	3780
	tctttctggg	acattttata	aatcatatta	tatcacctct	aaggatcttt	cagtttggtt	3840
	tatatgtgtc	tattaagtta	gattgtgagc	tcctaaaaga	taaagcattg	tcttattcat	3900
	ctttaaattt	ctcagagccc	aaatagtgcc	tggaacctag	tagttgctca	ataaaaggta	3960
25	ttgaatttac	aggattgaat	ggtgacatca	atgaataatt	gaagattcct	taagctgata	4020
	actgaccag	tagcatcatt	gatcatttaa	ttgccctgga	cttacttatt	ttcaccaca	4080
	ctacatattt	ctgtatagaa	tatatatagc	tcattgtatt	gcaagattta	actagaagaa	4140
	agagttcatg	cttgctttgt	ccatggagggt	ttaacaggaa	tgaattgcta	aactgtggaa	4200
	aatgttttaa	acaaatgcat	cttatcctgt	aggaaacaag	ctatattgaa	gacaactgca	4260
30	atcaaaatgg	tgccatatca	ctgatcttct	cactcaaaga	agaagttggg	gcattggcca	4320
	aagtattgcg	cttatttgag	gagaatgatg	taaacctgac	ccacattgaa	tctagacctt	4380
	ctcgtttaaa	gaaagatgag	tatgaatttt	tcaccatttt	ggataaacgt	agcctgctgt	4440
	ctctgacaaa	catcatcaag	atcttgaggc	atgacattgg	tgccactgtc	catgagcttt	4500
	cacgagataa	gaagaaagac	acagtgccct	ggttcccaag	aaccattcaa	gagctggaca	4560
35	gatttgccaa	tcagattctc	agctatggag	cggaaactgga	tgctgaccac	cctggtttta	4620
	aagatcctgt	gtaccgtgca	agacggaagc	agtttgctga	cattgcctac	aactaccgcc	4680
	atgggagacc	catccctcga	gtggaataca	tggaggaaaga	aaagaaaaca	tggggcacag	4740
	tgttcaagac	tctgaagtcc	ttgtataaaa	ccatgcttg	ctatgagtac	aatcacattt	4800
	ttccacttct	tgaaaagtac	tgtggcttcc	atgaagataa	cattccccag	ctggaagacg	4860
40	tttctcaatt	cctgcagact	tgcactggtt	tccgcctccg	acctgtggct	ggcctgcttt	4920
	cctctcggga	tttcttggtt	ggcctggcct	tccgagtctt	ccactgcaca	cagtacatca	4980
	gacatggatc	caagcccatg	tatacccccg	aacctgacat	ctgccatgag	ctgttgggac	5040
	atgtgccctt	gttttcagat	cgcagctttg	cccagttttc	ccaggaaatt	ggccttgctt	5100
	ctctgggtgc	acctgatgaa	tacattgaaa	agctcgccac	aatttactgg	tttactgtgg	5160
45	agtttgggct	ctgcaaacaa	ggagactcca	taaaggcata	tgggtgctggg	ctcctgtcat	5220
	cctttgggtga	attacagtac	tgcttatcag	agaagccaaa	gcttctcccc	ctggagctgg	5280
	agaagacagc	catccaaaat	tacactgtca	cggagtcca	gcccctgtat	tacgtggcag	5340
	agagttttaa	tgatgccaaag	gagaaaagtaa	ggaactttgc	tgccacaata	cctcggcctt	5400

	tctcagttcg ctacgaccca tacacccaaa ggattgaggt cttggacaat acccagcagc	5460
	ttaagatfff ggctgattcc attaacagtg aaattggaat cctttgcagt gccctccaga	5520
	aaataaagta a	5531
	<210> 389	
5	<211> 1359	
	<212> ДНК	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 389	
	atgtccactg cggtcctgga aaaccaggc ttgggcagga aactctctga ctttggacag	60
10	gaaacaagct atattgaaga caactgcaat caaaatgggt ccatatcact gatcttctca	120
	ctcaaagaag aagttgggtgc attggccaaa gtattgcgct tatttgagga gaatgatgta	180
	aacctgacct acattgaatc tagaccttct cgtttaaaga aagatgagta tgaatffffc	240
	accattttgg ataaacgtag cctgcctgct ctgacaaaaca tcatcaagat cttgaggcat	300
	gacattgggt ccaactgtcca tgagctttca cgagataaga agaaagacac agtgccctgg	360
15	ttcccaagaa ccattcaaga gctggacaga tttgccaatc agattctcag ctatggagcg	420
	gaactggatg ctgaccacct tggttttaaa gatcctgtgt accgtgcaag acggaagcag	480
	tttgcctgaca ttgcctacaa ctaccgccat gggcagccca tccctcgagt ggaatacatg	540
	gaggaagaaa agaaaacatg gggcacagtg ttcaagactc tgaagtcctt gtataaaacc	600
	catgcttgct atgagtacaa tcacatffff ccacttcttg aaaagtactg tggcttccat	660
20	gaagataaca ttcccagct ggaagacgtt tctcaattcc tgacagcttg cactggtttc	720
	cgccctccgac ctgtggctgg cctgctttcc tctcgggatt tcttgggtgg cctggccttc	780
	cgagtcttcc actgcacaca gtacatcaga catggatcca agcccatgta tacccccgaa	840
	cctgacatct gccatgagct gttgggacat gtgcccttgt tttcagatcg cagctttgcc	900
	cagttttccc aggaaattgg ccttgccctc ctgggtgcac ctgatgaata cattgaaaag	960
25	ctcgccacaa tttactgggt tactgtggag tttgggctct gcaaacaagg agactccata	1020
	aaggcatatg gtgctgggct cctgtcatcc tttggtgaat tacagtactg cttatcagag	1080
	aagccaaagc ttctcccct ggagctggag aagacagcca tccaaaatta cactgtcacg	1140
	gagttccagc ccctgtatta cgtggcagag agttttaatg atgccaagga gaaagtaagg	1200
	aactttgctg ccacaatacc tcggcccttc tcagttcgct acgaccata cacccaaagg	1260
30	attgaggtct tggacaatac ccagcagctt aagatffffg ctgattccat taacagtgaa	1320
	attggaatcc tttgcagtgc cctccagaaa ataaagtaa	1359
	<210> 390	
	<211> 1451	
	<212> ДНК	
35	<213> Homo sapiens	
	<400> 390	
	atgtccactg cggtcctgga aaaccaggc ttgggcagga aactctctga ctttggacag	60
	aagaggtaag ggtttaaggg atggttggtt ggtggggtat taatgtttaa ttacctggag	120
	cacctgcctg aatcacttt ttttcaggtt gggaaaacaag ctatattgaa gacaactgca	180
40	atcaaaatgg tgccatatca ctgatcttct cactcaaaga agaagttggg gcattggcca	240
	aagtattgct cttatfffag gagaatgatg taaacctgac ccacattgaa tctagacctt	300
	ctcgtttaaa gaaagatgag tatgaatfff tcacccttt ggataaacgt agcctgcctg	360
	ctctgacaaa catcatcaag atcttgaggc atgacattgg tgccactgtc catgagcttt	420
	cacgagataa gaagaaagac acagtgccct ggttcccaag aaccattcaa gagctggaca	480
45	gatttgccaa tcagattctc agctatggag cggaaactgga tgctgaccac cctggtttta	540
	aagatcctgt gtaccgtgca agacggaagc agtttgctga cattgcctac aactaccgcc	600
	atgggcagcc catccctcga gtggaataca tggaggaaga aaagaaaaca tggggcacag	660
	tgttcaagac tctgaagtcc ttgtataaaa cccatgcttg ctatgagtac aatcacattt	720

	ttccacttct	tgaaaagtac	tgtggcttcc	atgaagataa	cattccccag	ctggaagacg	780
	tttctcaatt	cctgcagact	tgactgggtt	tccgcctccg	acctgtggct	ggcctgcttt	840
	cctctcggga	tttcttgggt	ggcctggcct	tccgagtctt	ccactgcaca	cagtacatca	900
	gacatggatc	caagcccatg	tatacccccg	aacctgacat	ctgccatgag	ctgttgggac	960
5	atgtgccctt	gttttcagat	cgcagctttg	cccagttttc	ccaggaaatt	ggccttgctt	1020
	ctctgggtgc	acctgatgaa	tacattgaaa	agctcgccac	aatttactgg	tttactgtgg	1080
	agtttgggct	ctgcaaacia	ggagactcca	taaaggcata	tgggtgctggg	ctcctgtcat	1140
	cctttgggtga	attacagtac	tgcttatcag	agaagccaaa	gcttctcccc	ctggagctgg	1200
	agaagacagc	catccaaaat	tacactgtca	cggagtcca	gcccctgtat	tacgtggcag	1260
10	agagttttta	tgatgccaaag	gagaaaagtaa	ggaactttgc	tgccacaata	cctcggccct	1320
	tctcagttcg	ctacgacca	tacacccaaa	ggattgaggt	cttgacaat	accagcagc	1380
	ttaagatttt	ggctgattcc	attaacagtg	aaattggaat	cctttgcagt	gccctccaga	1440
	aaataaagta	a					1451
	<210>	391					
15	<211>	1588					
	<212>	ДНК					
	<213>	Homo sapiens					
	<400>	391					
	atgtccactg	cggtcctgga	aaaccaggc	ttgggcagga	aactctctga	ctttggacag	60
20	gtgagccacg	gcagcctgag	ctgctcagtt	aggggaattt	gggcctccag	agaaagagat	120
	ccgaagactg	ctggtgcttc	ctggtttcat	aagctcagta	agaagtctga	attcgttggga	180
	agctgatgat	agaagaaaaga	gttcatgctt	gctttgtcca	tggaggttta	acaggaatga	240
	attgctaaac	tgtggaaaat	gttttaaaaca	aatgcatctt	atcctgtagg	aaacaagcta	300
	tattgaagac	aactgcaatc	aaaatggtgc	catatcactg	atcttctcac	tcaaagaaga	360
25	agttggtgca	ttggccaaag	tattgctgctt	atgtgaggag	aatgatgtaa	acctgacca	420
	cattgaatct	agaccttctc	gtttaaagaa	agatgagtat	gaatttttca	cccatttggga	480
	taaacgtagc	ctgcctgctc	tgacaaacat	catcaagatc	ttgaggcatg	acattggtgc	540
	cactgtccat	gagctttcac	gagataagaa	gaaagacaca	gtgccctggg	tccaagaac	600
	cattcaagag	ctggacagat	ttgccaatca	gattctcagc	tatggagcgg	aactggatgc	660
30	tgaccaccct	ggttttaaag	atcctgtgta	ccgtgcaaga	cggaagcagt	ttgctgacat	720
	tgccataaac	taccgccatg	ggcagcccat	ccctcgagtg	gaatacatgg	aggaagaaaa	780
	gaaaacatgg	ggcacagtgt	tcaagactct	gaagtccttg	tataaaacc	atgcttgcta	840
	tgagtacaat	cacatthttc	cacttcttga	aaagtactgt	ggcttccatg	aagataacat	900
	tcccagctg	gaagacgttt	ctcaattcct	gcagacttgc	actggtttcc	gcctccgacc	960
35	tgtggctggc	ctgctttcct	ctcgggattt	cttgggtggc	ctggccttcc	gagtcttcca	1020
	ctgcacacag	tacatcagac	atggatccaa	gcccatgtat	acccccgaac	ctgacatctg	1080
	ccatgagctg	ttgggacatg	tgcccttggt	ttcagatcgc	agctttgcc	agttttccca	1140
	ggaaattggc	cttgctctc	tgggtgcacc	tgatgaatac	attgaaaagc	tcgccacaat	1200
	ttactggttt	actgtggagt	ttgggctctg	caaacaagga	gactccataa	aggcatatgg	1260
40	tgctgggctc	ctgtcatcct	ttggtgaatt	acagtactgc	ttatcagaga	agccaaagct	1320
	tctccccctg	gagctggaga	agacagccat	ccaaaattac	actgtcacgg	agttccagcc	1380
	cctgtattac	gtggcagaga	gttttaaatga	tgccaaggag	aaagtaagga	actttgctgc	1440
	cacaatacct	cggcccttct	cagttcgcta	cgaccatac	acccaaagga	ttgaggtctt	1500
	ggacaatacc	cagcagctta	agatthttggc	tgattccatt	aacagtgaaa	ttggaatcct	1560
45	ttgcagtgcc	ctccagaaaa	taaagtaa				1588
	<210>	392					
	<211>	1398					
	<212>	ДНК					

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

<400> 392

5	atggcagctg ttgtcctgga gaacggagtc ctgagcagaa aactctcaga ctttgggcag	60
	gaacaacagtt acatcgaaga caactccaat caaaatgggtg ctgtatctct gatattctca	120
	ctcaaagagg aagttgggtgc cctggccaag gtctctgcgt tatttgagga gaatgagatc	180
	aacctgacac acattgaatc cagaccttcc cgtttaaaca aagatgagta tgagtttttc	240
	acctatctgg ataagcgtag caagcccgtc ctgggcagca tcatcaagag cctgaggaac	300
10	gacattgggtg ccactgtcca tgagctttcc cgagacaagg aaaagaacac agtgccttgg	360
	ttcccaagga ccattcagga gctggacaga ttcgccaatc agattctcag ctatggagcc	420
	gaactggatg cagaccaccc aggctttaa gatcctgtgt accgggagcag acgaaagcag	480
	tttgctgaca ttgcctacaa ctaccgccat gggcagccca ttctcgggtt ggaatacaca	540
	gaggaggaga ggaagacctg ggaacgggtg ttcaggactc tgaaggcctt gtataaaaca	600
15	catgcctgct acgagcacaa ccacatcttc cctcttctgg aaaagtactg cggtttccgt	660
	gaagacaaca tcccgcagct ggaagatggt tctcagtttc tgcagacttg tactggtttc	720
	cgctctccgtc ctggttctgg cttactgtcg tctcgagatt tcttgggtgg cctggccttc	780
	cgagtcttcc actgcacaca gtacattagg catggatcta agcccatgta cacacctgaa	840
	cctgatatct gtcatgaact cttgggacat gtgcccttgt tttcagatag aagctttgcc	900
20	cagttttctc aggaaattgg gcttgcacg ctgggggac ctgatgagta cattgagaaa	960
	ctggccacaa tttactgggt tactgtggag tttgggcttt gcaaggaagg agattctata	1020
	aaggcatatg gtgctgggct cttgtcatcc tttggagaat tacagtactg tttatcagac	1080
	aagccaaagc tcctgcccct ggagctagag aagacagcct gccaggagta tactgtcaca	1140
	gagttccagc ctctgtacta tgtggccgag agtttcaatg atgccaagga gaaagtgagg	1200
25	acttttgctg ccacaatccc ccggcccttc tccgttctgt atgacccta cactcaaagg	1260
	gttgaggacc tggacaatac tcagcagttg aagattttag ctgactccat taatagttag	1320
	gttggaatcc tttgccatgc cctgcagaaa ataaagtcag ggggtggagg ctctcatcac	1380
	catcaccatc actaatga	1398

<210> 393

30 <211> 1395

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

35 <400> 393

	atggccgctg tgggtgctgga gaacggcgtg ctgtccagaa agctgtctga cttcggacag	60
	gagaccagct acatcgagga taactccaac cagaacggcg cctgagcct gatcttctcc	120
	ctgaaggagg aagtgggagc cctggctaag gtgctgagac tgtttgagga gaacgagatc	180
	aacctgaccc acatcgagtc caggccttct agactgaaca aggacgagta cgagttcttt	240
40	acatacctgg ataagcggtc taagccagtg ctgggctcta tcatcaagag cctgagaaac	300
	gatatcggag ctaccgtgca cgagctgagc cgggacaagg agaagaacac cgtgccttgg	360
	ttccccagga caatccagga gctggataga tttgccaacc agatcctgag ctacggagct	420
	gagctggacg ctgatcacc tggattcaag gaccccgtgt accgcgctag gagaaagcag	480
	tttgccgaca tcgcttaca ctacaggcac ggacagccaa tccctcgcgt ggagtacaca	540
45	gaggaggaga ggaagacctg ggaacagtg ttcagaacc tgaaggcctt gtacaagaca	600
	cacgcttgct acgagcacaa ccacatcttc cccctgctgg agaagtactg tggctttagg	660
	gaggacaaca tccctcagct ggaggacgtg agccagttcc tgcagacctg cacaggattt	720
	aggctgaggc cagtggccgg actgctgagc tcccgggatt tcctgggagg actggctttc	780

	cgcgtgtttc	actgcaccca	gtacatcagg	cacggctcta	agccaatgta	cacaccagag	840
	cccgatatct	gtcacgagct	gctgggacac	gtgcccctgt	ttagcgaccg	gtccttcgcc	900
	cagttttctc	aggagatcgg	cctggccagc	ctgggagctc	ctgacgagta	catcgagaag	960
	ctggctacca	tctactgggt	cacagtggag	tttggcctgt	gcaaggaggg	agattccatc	1020
5	aaggcctacg	gcgctggact	gctgtctagc	ttcggcgagc	tgcagtactg	cctgtctgac	1080
	aagccaaagc	tgctgcccct	ggagctggag	aagaccgcct	gtcaggagta	caccgtgaca	1140
	gagttccagc	ccctgtacta	cgtggccgag	agctttaacg	acgctaagga	gaaggtgcgc	1200
	accttcgccg	ctacaatccc	tcggccattt	tccgtgcgct	acgaccctta	caccagaggg	1260
	gtggaggtgc	tggataacac	acagcagctg	aagatcctgg	ccgactctat	caacagcgaa	1320
10	gtgggcatcc	tgtgccacgc	tctgcagaag	atcaagtccg	gaggaggagg	atctcatcac	1380
	caccaccacc	actga					1395
	<210>	394					
	<211>	1363					
	<212>	ДНК					
15	<213>	Homo sapiens					
	<400>	394					
	atgtccactg	cggctcctgga	aaaccaggc	ttgggcagga	aactctctga	ctttggacag	60
	gaaacaagct	atattgaaga	caactgcaat	caaatgggtg	ccatatcact	gatcttctca	120
	ctcaaagaag	aagttgggtg	attggccaaa	gtattgcgct	tatttgagga	gaatgatgta	180
20	aacctgacct	acattgaatc	tagaccttct	cgtttaaaga	aagatgagta	tgaatttttc	240
	accattttgg	ataaacgtag	cctgcctgct	ctgacaaaaca	tcatcaagat	cttgaggcat	300
	gacattgggtg	ccactgtcca	tgagctttca	cgagataaga	agaaagacac	agtgccctgg	360
	ttcccaagaa	ccattcaaga	gctggacaga	tttgccaatc	agattctcag	ctatggagcg	420
	gaactggatg	ctgaccaccc	tggttttaaa	gatcctgtgt	accgtgcaag	acggaagcag	480
25	tttctgacac	ttgcctacaa	ctaccgccat	gggcagccca	tccctcgagt	ggaatacatg	540
	gaggaagaaa	agaaaacatg	gggcacagtg	ttcaagactc	tgaagtcctt	gtataaaacc	600
	catgcttgct	atgagtacaa	tcacattttt	ccacttcttg	aaaagtactg	tggtttccat	660
	gaagataaca	ttccccagct	ggaagacggt	tctcagttcc	tgagacttg	caactggttc	720
	cgctcccgac	ctgtggctgg	cctgctttcc	tctcgggatt	tcttgggtgg	cctggccttc	780
30	cgagtcttcc	actgcacaca	gtacatcaga	catggatcca	agcccatgta	tacccccgaa	840
	cctgacatct	gccatgagct	gttgggacat	gtgcccttgt	tttcagatcg	cagctttgcc	900
	cagttttccc	aggaaattgg	ccttgccctct	ctgggtgcac	ctgatgaata	cattgaaaag	960
	ctcgccacaa	tttactgggt	tactgtggag	tttgggctct	gcaaacaagg	agactccata	1020
	aaggcatatg	gtgctgggct	cctgtcatcc	tttgggtgaat	tacagtactg	cttatcagag	1080
35	aagccaaagc	ttctccccct	ggagctggag	aagacagcca	tccaaaatta	caactgtcacg	1140
	gagttccagc	ccctctatta	cgtggcagag	agttttaatg	atgccaagga	gaaagtaagg	1200
	aactttgctg	ccacaatacc	tcggcccttc	tcagttcgct	acgaccata	cacccaaagg	1260
	attgaggtct	tggacaatac	ccagcagctt	aagattttgg	ctgattccat	taacagtgaa	1320
	attggaatcc	tttgcagtg	cctccagaaa	ataaagtaat	taa		1363
40	<210>	395					
	<211>	5					
	<212>	БЕЛОК					
	<213>	Искусственная последовательность					
	<220>						
45	<223>	Описание искусственной последовательности: синтетический пептид					
	<400>	395					
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser		
	1				5		

<210> 396

<211> 6

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

5 <220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетическая метка 6xHis

<400> 396

His His His His His His

1

5

10

(57) Формула изобретения

1. Бескапсидный вектор на основе ДНК с замкнутыми концами (зкДНК) для экспрессии белка фенилаланингидроксилазы (РАН), содержащий:

15 по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, расположенную между фланкирующими инвертированными концевыми повторами (ITR), причем указанная по меньшей мере одна последовательность нуклеиновой кислоты кодирует по меньшей мере один белок фенилаланингидроксилазы (РАН), и оптимизирована по кодонам для экспрессии в клетке, при этом указанная по меньшей мере одна последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, имеющую

20 по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO:382, SEQ ID NO:380, SEQ ID NO:381 и SEQ ID NO:383-394.

2. ЗкДНК-вектор по п. 1, отличающийся тем, что указанная по меньшей мере одна последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, имеющую

25 по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO:382.

3. ЗкДНК-вектор по п. 1, отличающийся тем, что указанная по меньшей мере одна последовательность нуклеиновой кислоты содержит SEQ ID NO:382.

4. ЗкДНК-вектор по п. 1 или 2, отличающийся тем, что указанный зкДНК-вектор содержит промотор, функционально связанный с указанной по меньшей мере одной

30 последовательностью нуклеиновой кислоты, которая кодирует указанный по меньшей мере один белок РАН.

5. ЗкДНК-вектор по п. 4, отличающийся тем, что указанный промотор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 191.

35 6. ЗкДНК-вектор по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что указанный зкДНК-вектор содержит энхансер.

7. ЗкДНК-вектор по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что указанный зкДНК-вектор содержит 5'-UTR и/или последовательность интрона.

40 8. ЗкДНК-вектор по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что указанный зкДНК-вектор содержит 3'-UTR.

9. ЗкДНК-вектор по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что указанный зкДНК-вектор содержит по меньшей мере одну последовательность поли(А).

45 10. ЗкДНК-вектор по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что указанная по меньшей мере одна последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой кДНК.

11. ЗкДНК-вектор по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что по меньшей мере один из фланкирующих ITR содержит функциональный сайт концевой разрешения (TRS) и сайт связывания репликационного белка (Rep).

12. ЗкДНК-вектор по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что один или оба указанных фланкирующих ITR происходят из вируса, выбранного из группы, состоящей из парвовируса, депендовируса и аденоассоциированного вируса (AAB).

13. ЗкДНК-вектор по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что указанные фланкирующие ITR являются симметричными или асимметричными.

14. ЗкДНК-вектор по п. 13, отличающийся тем, что указанные фланкирующие ITR являются симметричными или по существу симметричными.

15. ЗкДНК-вектор по п. 13, отличающийся тем, что указанные фланкирующие ITR являются асимметричными.

16. ЗкДНК-вектор по любому из пп. 1-15, отличающийся тем, что один из указанных фланкирующих ITR представляет собой ITR дикого типа, или оба указанных фланкирующих ITR представляют собой ITR дикого типа.

17. ЗкДНК-вектор по любому из пп. 1-16, отличающийся тем, что указанные фланкирующие ITR происходят из различных вирусных серотипов.

18. ЗкДНК-вектор по любому из пп. 1-17, отличающийся тем, что указанные фланкирующие ITR происходят из пары вирусных серотипов, выбранных из группы, состоящей из пар вирусных серотипов AAV1,AAV1; AAV2,AAV2; AAV3,AAV3;

AAV4,AAV4; AAV5,AAV5; AAV1,AAV2; AAV2,AAV3; AAV3,AAV4; AAV4,AAV5; AAV5,AAV6; AAV1,AAV3; AAV2,AAV4; AAV3,AAV5; AAV4,AAV6; AAV5,AAV7;

AAV1,AAV4; AAV2,AAV5; AAV3,AAV6; AAV4,AAV7; AAV5,AAV8; AAV1,AAV5; AAV2,AAV6; AAV3,AAV7; AAV4,AAV8; AAV5,AAV9; AAV1,AAV6; AAV2,AAV7;

AAV3,AAV8; AAV4,AAV9; AAV5,AAV10; AAV1,AAV7; AAV2,AAV8; AAV3,AAV9; AAV4,AAV10; AAV5,AAV11; AAV1,AAV8; AAV2,AAV9; AAV3,AAV10; AAV4,AAV11;

AAV5,AAV12; AAV1,AAV9; AAV2,AAV10; AAV3,AAV11; AAV4,AAV12; AAV5,AAVRH8;

AAV1,AAV10; AAV2,AAV11; AAV3,AAV12; AAV4,AAVRH8; AAV5,AAVRH10; AAV1,AAV11; AAV2,AAV12; AAV3,AAVRH8; AAV4,AAVRH10; AAV5,AAV13;

AAV1,AAV12; AAV2,AAVRH8; AAV3,AAVRH10; AAV4,AAV13; AAV5,AAVDJ; AAV1,AAVRH8; AAV2,AAVRH10; AAV3,AAV13; AAV4,AAVDJ; AAV5,AAVDJ8;

AAV1,AAVRH10; AAV2,AAV13; AAV3,AAVDJ; AAV4,AAVDJ8; AAB5, птичий; AAB1, AAB13; AAB2, AABDJ; AAB3, AABDJ8; AAB4, птичий; AAB5, бычий; AAB1, AABDJ;

AAB2, AABDJ8; AAB3, птичий; AAB4, бычий; AAB5, собачий; AAB1, AABDJ8; AAB2, птичий; AAB3, бычий; AAB4, собачий; AAB5, лошадиный; AAB1, птичий; AAB2, бычий;

AAB3, собачий; AAB4, лошадиный; AAB5, козий; AAB1, бычий; AAB2, собачий; AAB3, лошадиный; AAB4, козий; AAB5, креветки; AAB1, собачий; AAB2, лошадиный; AAB3, козий; AAB4, креветки; AAB5, свиной; AAB1, лошадиный; AAB2, козий; AAB3, креветки;

AAB4, свиной; AAB5, насекомых; AAB1, козий; AAB2, креветки; AAB3, свиной; AAB4, насекомых; AAB5, овечий; AAB1, креветки; AAB2, свиной; AAB3, насекомых; AAB4, овечий; AAB5, B19; AAB1, свиной; AAB2, насекомых; AAB3, овечий; AAB4, B19; AAB5, MVM;

AAB1, насекомых; AAB2, овечий; AAB3, B19; AAB4, MVM; AAB5, гусиный; AAB1, овечий; AAB2, B19; AAB3, MVM; AAB4, гусиный; AAB5, змеиный; AAB1, B19;

AAB2, MVM; AAB3, гусиный; AAB4, змеиный; AAB1, MVM; AAB2, гусиный; AAB3, змеиный; AAB1, гусиный; AAB2, змеиный; AAB1, змеиный; AAB6, AAB6; AAB7, AAB7;

AAB8, AAB8; AAB9, AAB9; AAB10, AAB10; AAB6, AAB7; AAB7, AAB8; AAB8, AAB9; AAB9, AAB10; AAB10, AAB11; AAB6, AAB8; AAB7, AAB9; AAB8, AAB10; AAB9,

AAB11; AAB10, AAB12; AAB6, AAB9; AAB7, AAB10; AAB8, AAB11; AAB9, AAB12; AAB10, AABRH8; AAB6, AAB10; AAB7, AAB11; AAB8, AAB12; AAB9, AABRH8;

AAB10, AABRH10; AAB6, AAB11; AAB7, AAB12; AAB8, AABRH8; AAB9, AABRH10; AAB10, AAB13; AAB6, AAB12; AAB7, AABRH8; AAB8, AABRH10; AAB9, AAB13;

AAB10, AABDJ; AAB6, AABRH8; AAB7, AABRH10; AAB8, AAB13; AAB9, AABDJ;
 AAB10, AABDJ8; AAB6, AABRH10; AAB7, AAB13; AAB8, AABDJ; AAB9, AABDJ8;
 AAB10, птичий; AAB6, AAB13; AAB7, AABDJ; AAB8, AABDJ8; AAB9, птичий; AAB10,
 бычий; AAB6, AABDJ; AAB7, AABDJ8; AAB8, птичий; AAB9, бычий; AAB10, собачий;
 5 AAB6, AABDJ8; AAB7, птичий; AAB8, бычий; AAB9, собачий; AAB10, лошадиный;
 AAB6, птичий; AAB7, бычий; AAB8, собачий; AAB9, лошадиный; AAB10, козий; AAB6,
 бычий; AAB7, собачий; AAB8, лошадиный; AAB9, козий; AAB10, креветки; AAB6,
 собачий; AAB7, лошадиный; AAB8, козий; AAB9, креветки; AAB10, свиной; AAB6,
 лошадиный; AAB7, козий; AAB8, креветки; AAB9, свиной; AAB10, насекомых; AAB6,
 10 козий; AAB7, креветки; AAB8, свиной; AAB9, насекомых; AAB10, овечий; AAB6,
 креветки; AAB7, свиной; AAB8, насекомых; AAB9, овечий; AAB10, B19; AAB6, свиной;
 AAB7, насекомых; AAB8, овечий; AAB9, B19; AAB10, MVM; AAB6, насекомых; AAB7,
 овечий; AAB8, B19; AAB9, MVM; AAB10, гусиный; AAB6, овечий; AAB7, B19; AAB8,
 MVM; AAB9, гусиный; AAB10, змеиный; AAB6, B19; AAB7, MVM; AAB8, гусиный; AAB9,
 15 змеиный; AAB6, MVM; AAB7, гусиный; AAB8, змеиный; AAB6, гусиный; AAB7,
 змеиный; AAB6, змеиный; AAB11, AAB11; AAB12, AAB12; AABRH8, AABRH8;
 AABRH10, AABRH10; AAB13, AAB13; AAB11, AAB12; AAB12, AABRH8; AABRH8,
 AABRH10; AABRH10, AAB13; AAB13, AABDJ; AAB11, AABRH8; AAB12, AABRH10;
 AABRH8, AAB13; AABRH10, AABDJ; AAB13, AABDJ8; AAB11, AABRH10; AAB12,
 20 AAB13; AABRH8, AABDJ; AABRH10, AABDJ8; AAB13, птичий; AAB11, AAB13; AAB
 12, AABDJ; AABRH8, AABDJ8; AABRH10, птичий; AAB13, бычий; AAB11, AABDJ;
 AAB12, AABDJ8; AABRH8, птичий; AABRH10, бычий; AAB13, собачий; AAB11, AABDJ8;
 AAB12, птичий; AABRH8, бычий; AABRH10, собачий; AAB13, лошадиный; AAB11,
 птичий; AAB12, бычий; AABRH8, собачий; AABRH10, лошадиный; AAB13, козий;
 25 AAB11, бычий; AAB12, собачий; AABRH8, лошадиный; AABRH10, козий; AAB13,
 креветки; AAB11, собачий; AAB12, лошадиный; AABRH8, козий; AABRH10, креветки;
 AAB13, свиной; AAB11, лошадиный; AAB12, козий; AABRH8, креветки; AABRH10,
 свиной; AAB13, насекомых; AAB11, козий; AAB12, креветки; AABRH8, свиной;
 AABRH10, насекомых; AAB13, овечий; AABU, креветки; AAB12, свиной; AABRH8,
 30 насекомых; AABRH10, овечий; AAB13, B19; AAB11, свиной; AAB12, насекомых;
 AABRH8, овечий; AABRH10, B19; AAB13, MVM; AAB11, насекомых; AAB12, овечий;
 AABRH8, B19; AABRH10, MVM; AAB13, гусиный; AAB11, овечий; AAB12, B19; AABRH8,
 MVM; AABRH10, гусиный; AAB13, змеиный; AAB11, B19; AAB12, MVM; AABRH8,
 гусиный; AABRH10, змеиный; AAB11, MVM; AAB12, гусиный; AABRH8, змеиный;
 35 AAB11, гусиный; AAB12, змеиный; AAB11, змеиный; AABDJ, AABDJ; AABDJ8, AVVDJ8;
 птичий, птичий; бычий, бычий; собачий, собачий; AABDJ, AABDJ8; AABDJ8, птичий;
 птичий, бычий; бычий, собачий; собачий, лошадиный; AABDJ, птичий; AABDJ8, бычий;
 птичий, собачий; бычий, лошадиный; собачий, козий; AABDJ, бычий; AABDJ8, собачий;
 птичий, лошадиный; бычий, козий; собачий, креветки; AABDJ, собачий; AABDJ8,
 40 лошадиный; птичий, козий; бычий, креветки; собачий, свиной; AABDJ, лошадиный;
 AABDJ8, козий; птичий, креветки; бычий, свиной; собачий, насекомых; AABDJ, козий;
 AABDJ8, креветки; птичий, свиной; бычий, насекомых; собачий, овечий; AABDJ,
 креветки; AABDJ8, свиной; птичий, насекомых; бычий, овечий; собачий, B19; AABDJ,
 свиной; AABDJ8, насекомых; птичий, овечий; бычий, B19; собачий, MVM; AABDJ,
 45 насекомых; AABDJ8, овечий; птичий, B19; бычий, MVM; собачий, гусиный; AABDJ,
 овечий; AABDJ8, B19; птичий, MVM; бычий, гусиный; собачий, змеиный; AABDJ, B19;
 AABDJ8, MVM; птичий, гусиный; бычий, змеиный; AABDJ, MVM; AABDJ8, гусиный;
 птичий, змеиный; AABDJ, гусиный; AABDJ8, змеиный; AABDJ, змеиный; лошадиный,

лошадиный; козий, козий; креветки, креветки; свиной, свиной; насекомых, насекомых; лошадиный, козий; козий, креветки; креветки, свиной; свиной, насекомых; насекомых, овечий; лошадиный, креветки; козий, свиной; креветки, насекомых; свиной, овечий; насекомых, B19; лошадиный, свиной; козий, насекомых; креветки, овечий; свиной, B19; 5 насекомых, MVM; лошадиный, насекомых; козий, овечий; креветки, B19; свиной, MVM; насекомых, гусиный; лошадиный, овечий; козий, B19; креветки, MVM; свиной, гусиный; насекомых, змеиный; лошадиный, B19; козий, MVM; креветки, гусиный; свиной, змеиный; лошадиный, MVM; козий, гусиный; креветки, змеиный; лошадиный, гусиный; козий, змеиный; лошадиный, змеиный; овечий, овечий; B19, B19; MVM, MVM; гусиный, гусиный; 10 змеиный, змеиный; овечий, B19; B19, MVM; MVM, гусиный; гусиный, змеиный; овечий, MVM; B19, гусиный; MVM, змеиный; овечий, гусиный; B19, змеиный; овечий, змеиный.

19. ЗкДНК-вектор по любому из пп. 1-18, отличающийся тем, что один или оба указанных фланкирующих ITR содержат последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO:1, 2, 5-48.

15 20. ЗкДНК-вектор по любому из пп. 1-19, отличающийся тем, что по меньшей мере один из указанных фланкирующих ITR изменен относительно последовательности ITR дикого типа AAB путем делеции, добавления или замены, которые влияют на общую трехмерную конформацию указанного ITR.

21. ЗкДНК-вектор по любому из пп. 1-20, отличающийся тем, что один или оба 20 указанных фланкирующих ITR происходят из серотипа AAB, выбранного из группы, состоящей из AAB1, AAB2, AAB3, AAB4, AAB5, AAB6, AAB7, AAB8, AAB9, AAB10, AAB11 и AAB12.

22. ЗкДНК-вектор по любому из пп. 1-21, отличающийся тем, что один или оба указанных фланкирующих ITR являются синтетическими.

25 23. ЗкДНК-вектор по любому из пп. 1-22, отличающийся тем, что один из указанных фланкирующих ITR не является ITR дикого типа, или оба указанных фланкирующих ITR не являются ITR дикого типа.

24. ЗкДНК-вектор по любому из пп. 1-23, отличающийся тем, что один или оба 30 указанных фланкирующих ITR модифицированы путем делеции, вставки и/или замены по меньшей мере в одной из областей указанных ITR, выбранных из группы, состоящей из A, A', B, B', C, C', D и D'.

25. ЗкДНК-вектор по п. 24, отличающийся тем, что указанная делеция, вставка и/или замена приводит к делеции всей или части структуры стебель-петля, образуемой 35 указанными областями A, A', B, B', C или C'.

26. ЗкДНК-вектор по любому из пп. 1-25, отличающийся тем, что один или оба 40 указанных фланкирующих ITR модифицированы путем делеции, вставки и/или замены, которая приводит к делеции всей или части структуры стебель-петля, образуемой указанными областями B и B'.

27. ЗкДНК-вектор по любому из пп. 1-25, отличающийся тем, что один или оба 45 указанных фланкирующих ITR модифицированы путем делеции, вставки и/или замены, которая приводит к делеции всей или части структуры стебель-петля, образуемой указанными областями C и C'.

28. ЗкДНК-вектор по любому из пп. 1-25, отличающийся тем, что один или оба 45 указанных фланкирующих ITR модифицированы путем делеции, вставки и/или замены, которая приводит к делеции всей или части структуры стебель-петля, образуемой указанными областями B и B', и/или всей или части структуры стебель-петля, образуемой указанными областями C и C'.

29. ЗкДНК-вектор по любому из пп. 1-28, отличающийся тем, что один или оба

указанных фланкирующих ITR содержат единственную структуру стебель-петля в области, которая, в ITR дикого типа, содержит первую структуру стебель-петля, образуемую указанными областями В и В', и вторую структуру стебель-петля, образуемую указанными областями С и С'.

5 30. ЗкДНК-вектор по любому из пп. 1-29, отличающийся тем, что один или оба указанных фланкирующих ITR содержат один стебель и две петли в области, которая, в ITR дикого типа, содержит первую структуру стебель-петля, образуемую указанными областями В и В', и вторую структуру стебель-петля, образуемую указанными областями С и С'.

10 31. ЗкДНК-вектор по любому из пп. 1-30, отличающийся тем, что один или оба указанных фланкирующих ITR содержат один стебель и одну петлю в области, которая, в ITR дикого типа, содержит первую структуру стебель-петля, образуемую указанными областями В и В', и вторую структуру стебель-петля, образуемую указанными областями С и С'.

15 32. ЗкДНК-вектор по любому из пп. 1-31, отличающийся тем, что оба фланкирующих ITR изменяют таким образом, что это приводит к общей трехмерной симметрии, при которой указанные ITR инвертированы по отношению друг к другу.

33. ЗкДНК-вектор по любому из пп. 1-32, отличающийся тем, что указанная по меньшей мере одна последовательность нуклеиновой кислоты содержит
20 последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:382, SEQ ID NO:381, SEQ ID NO:383, SEQ ID NO:384, SEQ ID NO:385, SEQ ID NO:386, SEQ ID NO:387, SEQ ID NO:388, SEQ ID NO:389, SEQ ID NO:390, SEQ ID NO:391, SEQ ID NO:392, SEQ ID NO:393 и SEQ ID NO:394.

25 34. ЗкДНК-вектор по любому из пп. 1-33, отличающийся тем, что указанная по меньшей мере одна последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:382, SEQ ID NO:384, SEQ ID NO:394, SEQ ID NO:385, и SEQ ID NO:386.

30 35. ЗкДНК-вектор по любому из пп. 1-34, отличающийся тем, что указанный зкДНК-вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:192, SEQ ID NO:193 и SEQ ID NO:194.

36. ЗкДНК-вектор по любому из пп. 1-35, отличающийся тем, что по указанный
35 зкДНК-вектор содержит по меньшей мере один регуляторный переключатель.

37. ЗкДНК-вектор по п. 36, отличающийся тем, что указанный по меньшей мере один регуляторный переключатель выбран из группы, состоящей из бинарного регуляторного переключателя, низкомолекулярного регуляторного переключателя, регуляторного переключателя «с кодом доступа», регуляторного переключателя на основе нуклеиновой
40 кислоты, посттранскрипционного регуляторного переключателя, контролируемого излучением или контролируемого ультразвуком регуляторного переключателя, опосредуемого гипоксией регуляторного переключателя, регуляторного переключателя воспалительного ответа, активируемого сдвигом регуляторного переключателя и аварийного выключателя («kill switch»).

45 38. Способ экспрессии белка РАН в клетке, причем указанный способ включает приведение указанной клетки в контакт с зкДНК-вектором по любому из пп. 1-37.

39. Способ по п. 38, отличающийся тем, что указанная клетка представляет собой клетку печени.

40. Способ по п. 38 или 39, отличающийся тем, что указанная клетка находится в условиях *in vitro* или *in vivo*.

41. Способ по любому из пп. 38-40, отличающийся тем, что указанная по меньшей мере одна последовательность нуклеиновой кислоты выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO:382, SEQ ID NO:380, SEQ ID NO:381 и SEQ ID NO:383 - SEQ ID NO:394.

42. Способ по п. 41, отличающийся тем, что указанная по меньшей мере одна последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO:382.

43. Способ по п. 41, отличающийся тем, что указанная по меньшей мере одна последовательность нуклеиновой кислоты содержит SEQ ID NO:382.

44. Способ лечения субъекта, страдающего фенилкетонурией (ФКУ), причем указанный способ включает введение указанному субъекту зкДНК-вектора по любому из пп. 1-37.

45. Способ по п. 44, отличающийся тем, что указанная по меньшей мере одна последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует указанный по меньшей мере один белок РАН, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 382, SEQ ID NO:380, SEQ ID NO:381 и SEQ ID NO:383-394.

46. Способ по п. 44 или 45, отличающийся тем, что указанная по меньшей мере одна последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует указанный по меньшей мере один белок РАН, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO:382.

47. Способ по п. 44 или 45, отличающийся тем, что указанная по меньшей мере одна последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует указанный по меньшей мере один белок РАН, содержит SEQ ID NO:382.

48. Способ по п. 44 или 45, отличающийся тем, что указанный зкДНК-вектор подлежит введению в клетку печени.

49. Способ по любому из пп. 38-48, отличающийся тем, что указанный зкДНК-вектор экспрессирует белок РАН в клетке печени.

50. Способ по любому из пп. 44-49, отличающийся тем, что указанный зкДНК-вектор вводят с помощью любого одного или более из путей, выбранных из группы, состоящей из: внутривенная инъекция, внутримышечная инъекция, и инфузия.

51. Способ по любому из пп. 44-50, отличающийся тем, что у указанного субъекта наблюдается по меньшей мере примерно 50% снижение уровня фенилаланина в сыворотке по сравнению с уровнем фенилаланина в сыворотке у указанного субъекта до введения.

52. Способ по любому из пп. 44-51, отличающийся тем, что у указанного субъекта уровень фенилаланина в сыворотке после введения составляет менее примерно 1500 мкМ.

53. Способ по любому из пп. 44-52, отличающийся тем, что у указанного субъекта после введения наблюдается повышение активности РАН по меньшей мере примерно на 10% по сравнению с уровнем активности РАН до введения.

54. Фармацевтическая композиция для генной терапии, содержащая зкДНК-вектор по любому из пп. 1-37.

55. Клетка для продуцирования белка РАН, содержащая зкДНК-вектор по любому из пп. 1-37.

56. Клетка по п. 55, отличающаяся тем, что указанная клетка представляет собой клетку печени.

57. Композиция для доставки зкДНК-вектора, содержащая зкДНК-вектор по любому из пп. 1-37 и липид.

58. Композиция по п. 57, отличающаяся тем, что указанный липид представляет собой липидную наночастицу (ЛНЧ).

5 59. Набор для доставки зкДНК-вектора, содержащий зкДНК-вектор по любому из пп. 1-37, фармацевтическую композицию по п. 54, клетку по п. 55 или 56 или композицию по п. 57 или 58 и инструкции по применению.

10

15

20

25

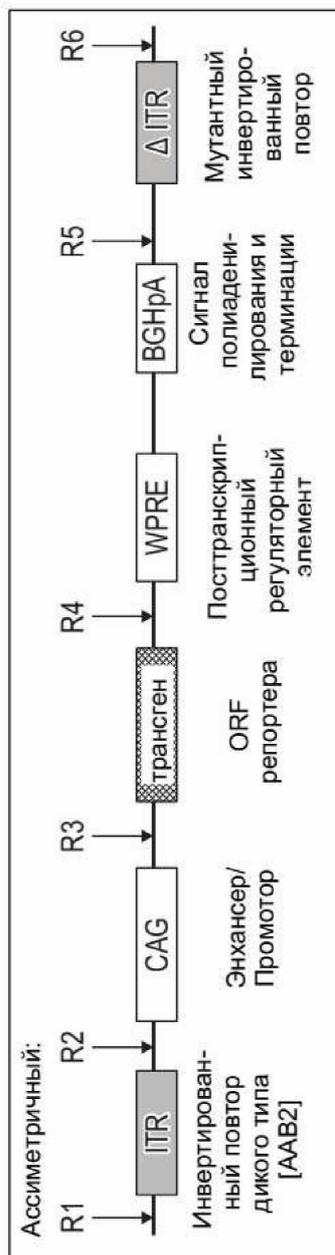
30

35

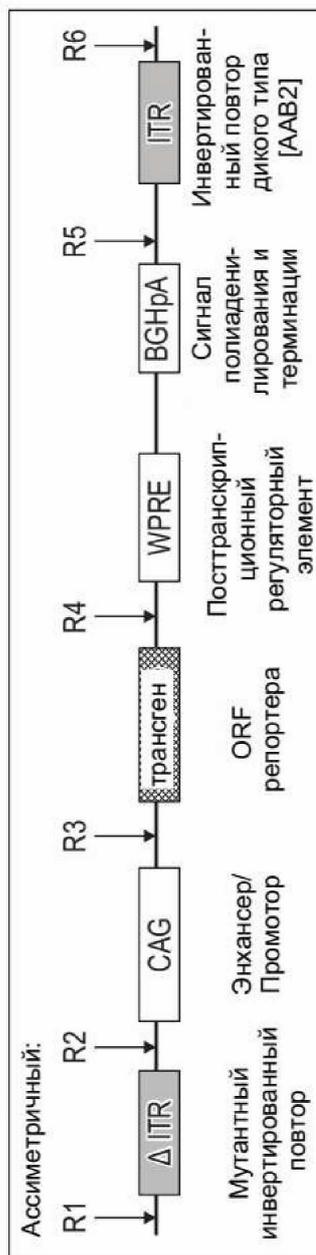
40

45

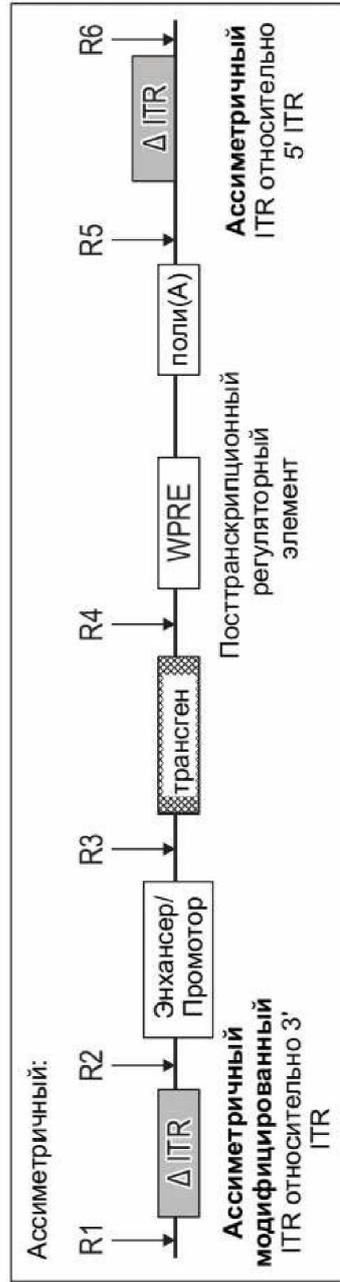
ФИГ. 1А



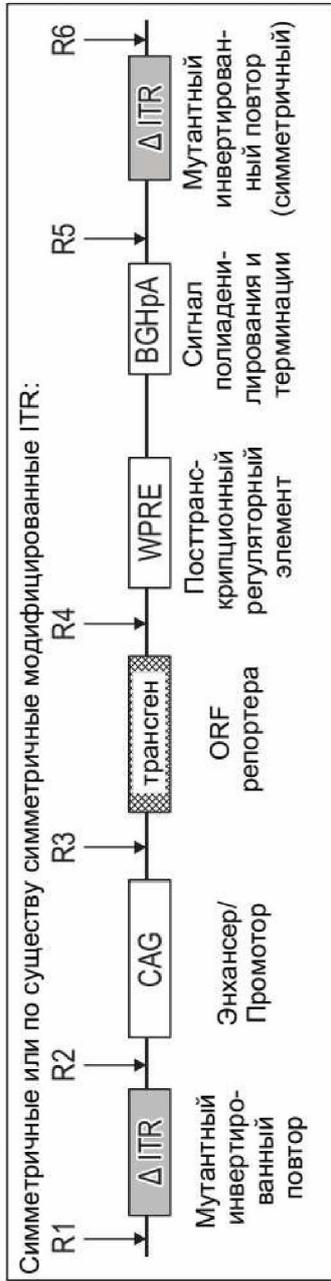
ФИГ. 1В



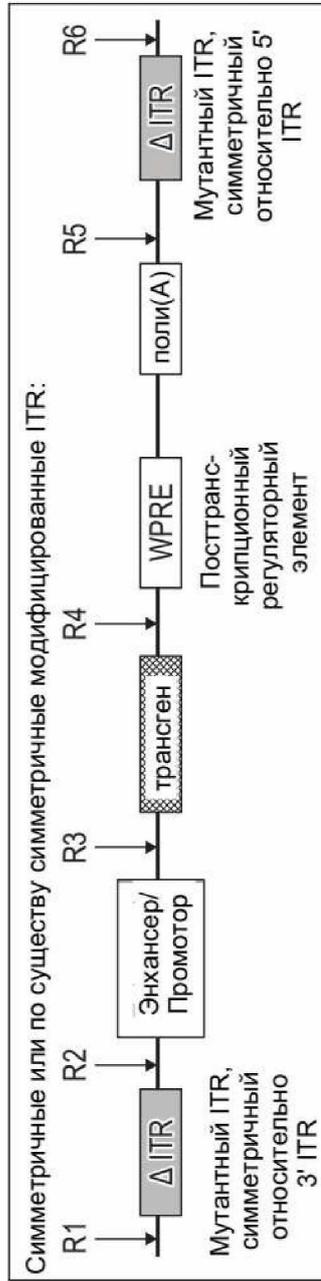
ФИГ. 1С



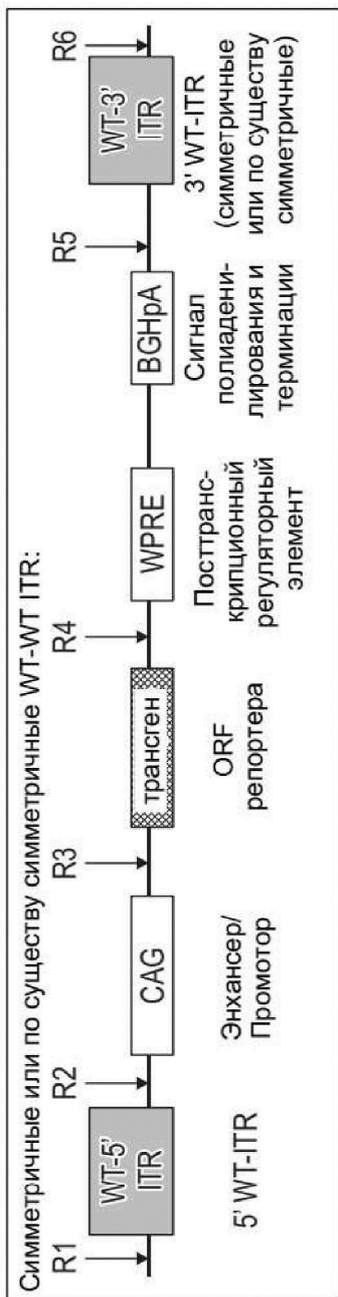
ФИГ. 1D



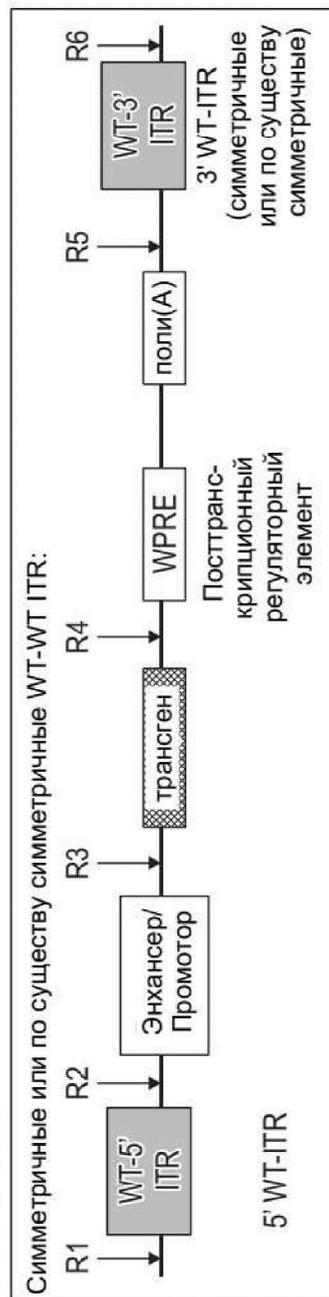
ФИГ. 1E

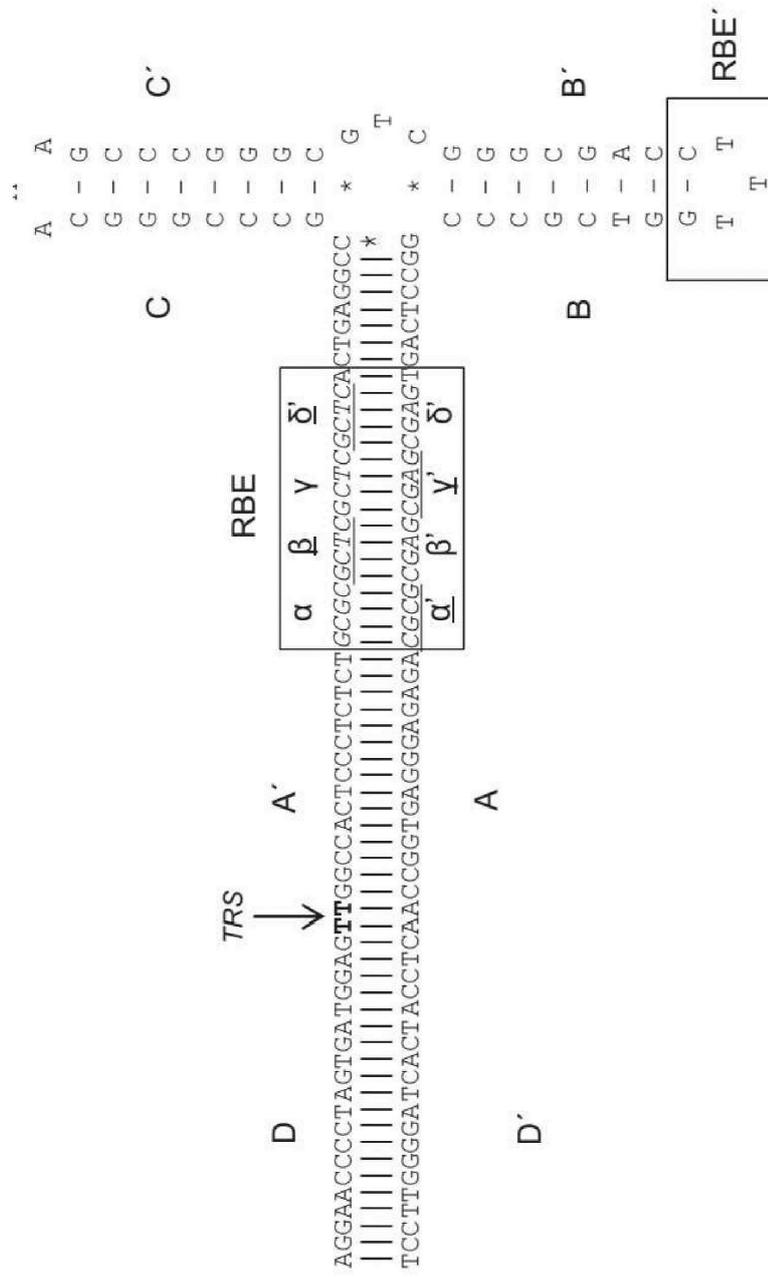


ФИГ. 1F

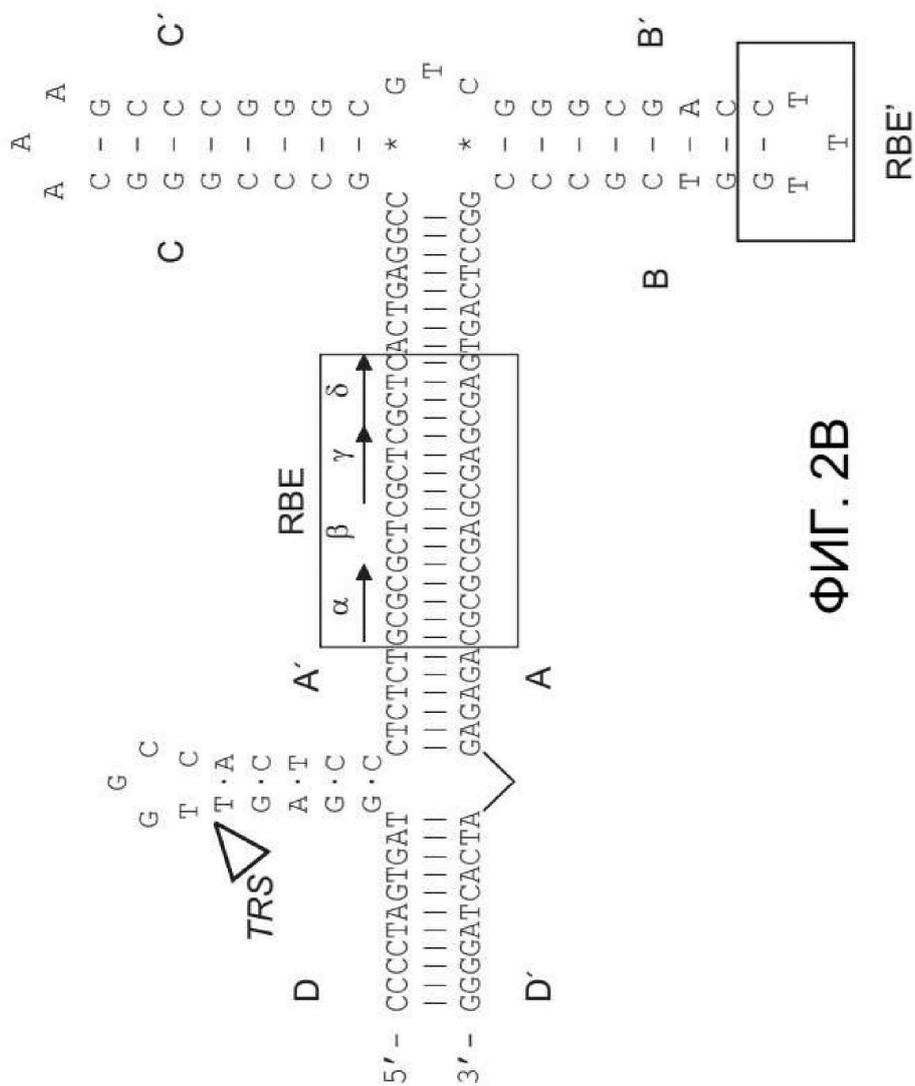


ФИГ. 1G

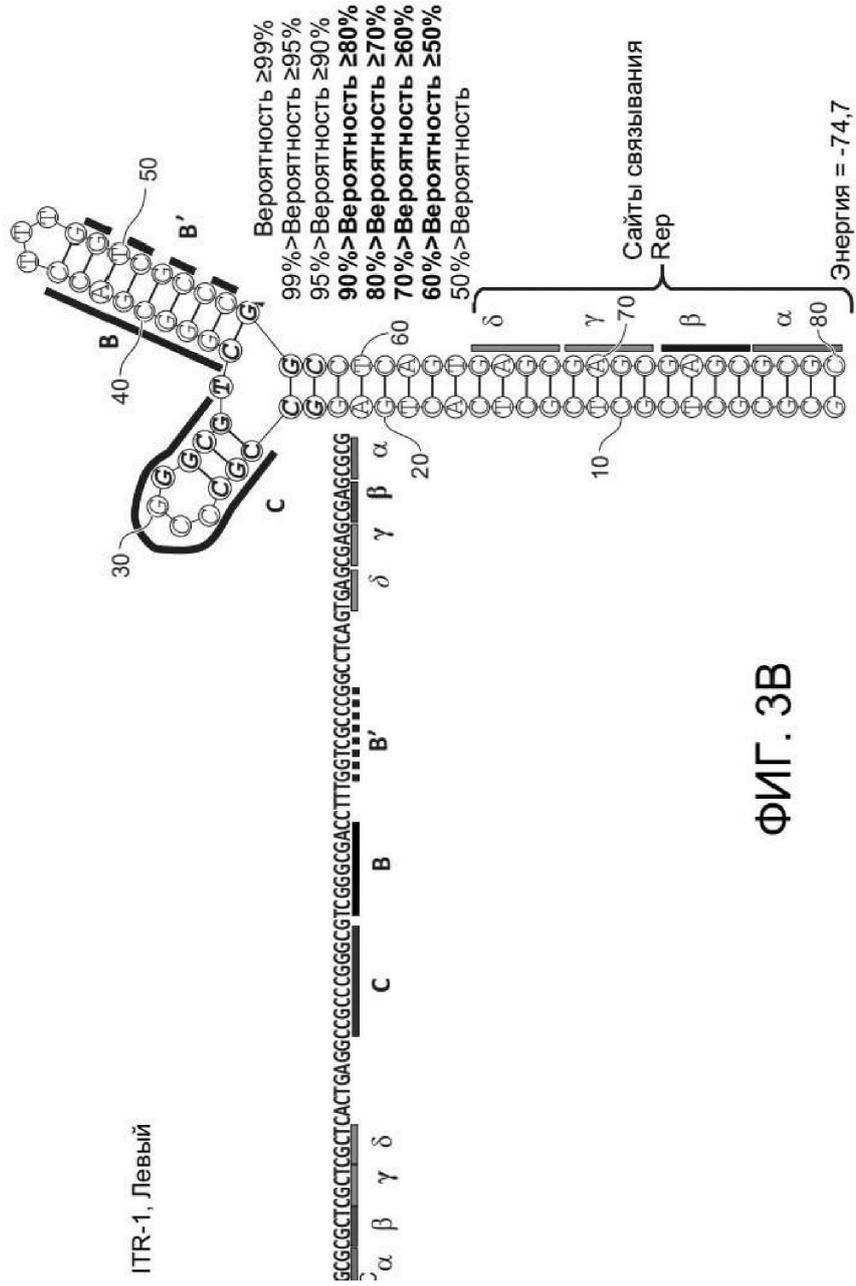




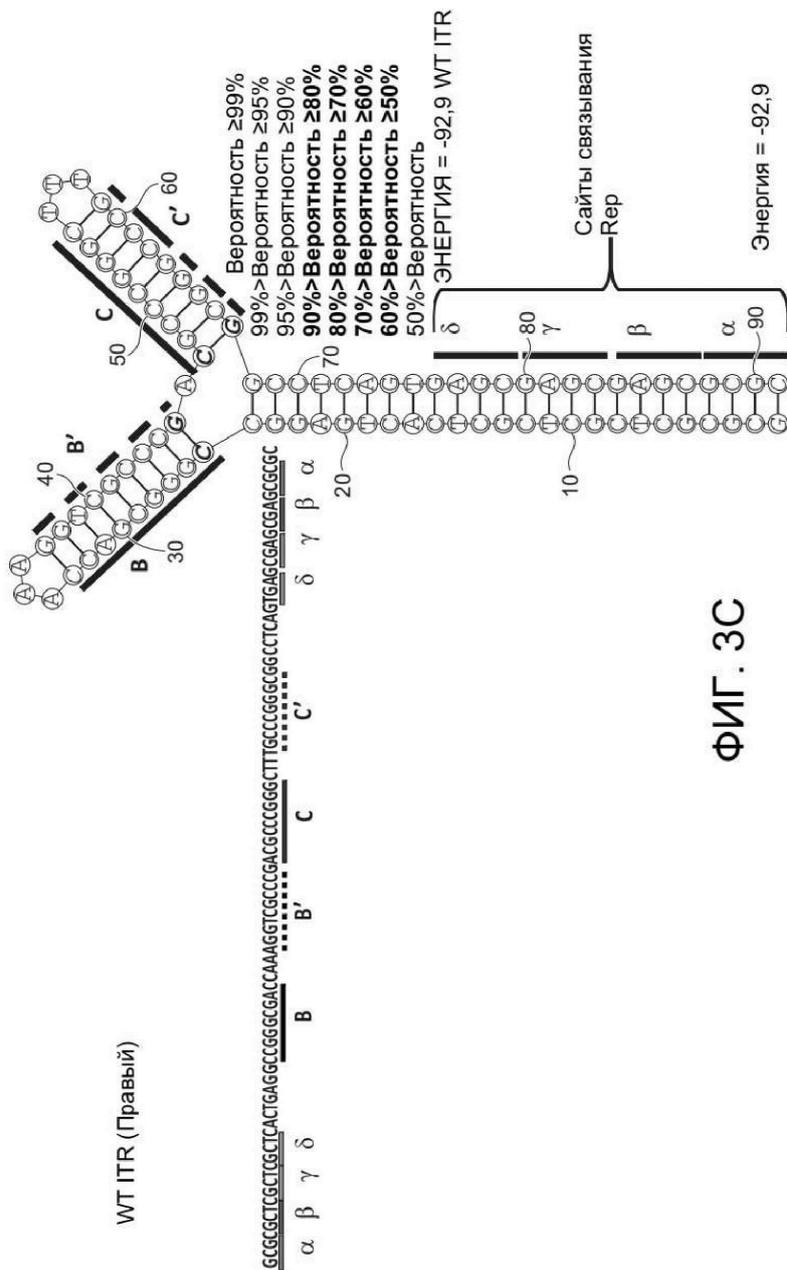
ФИГ. 2А



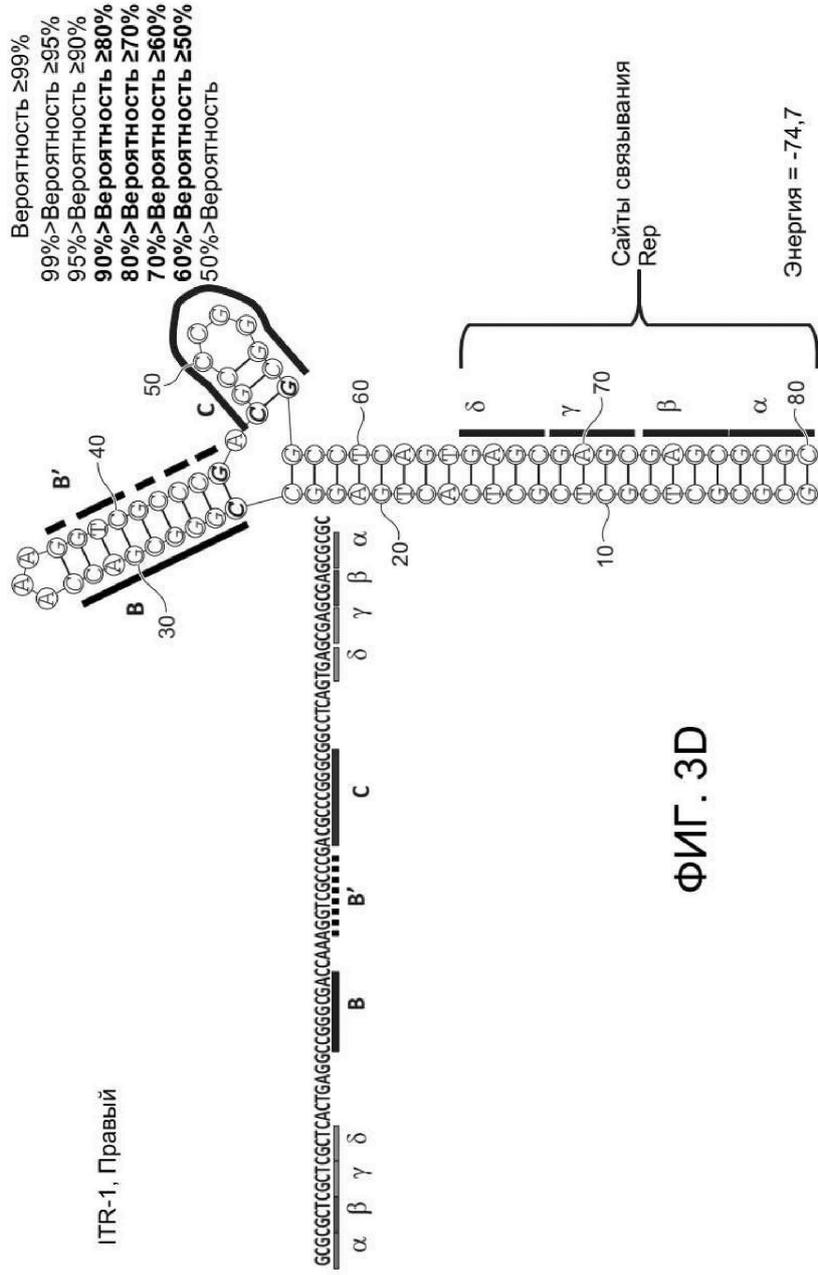
ФИГ. 2В



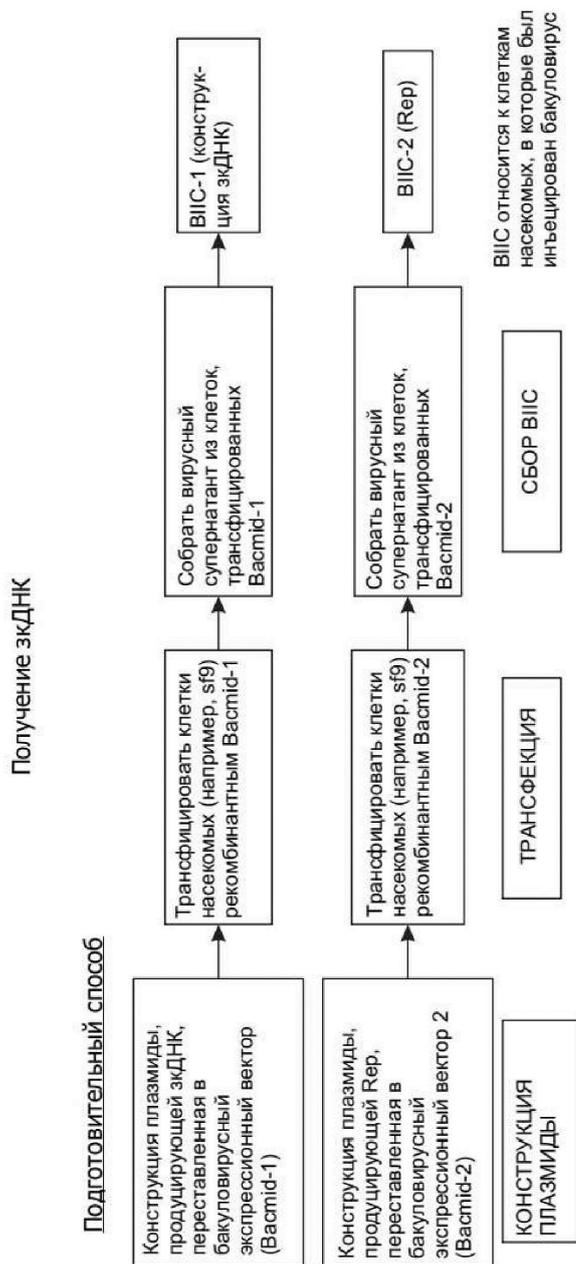
ФИГ. 3В



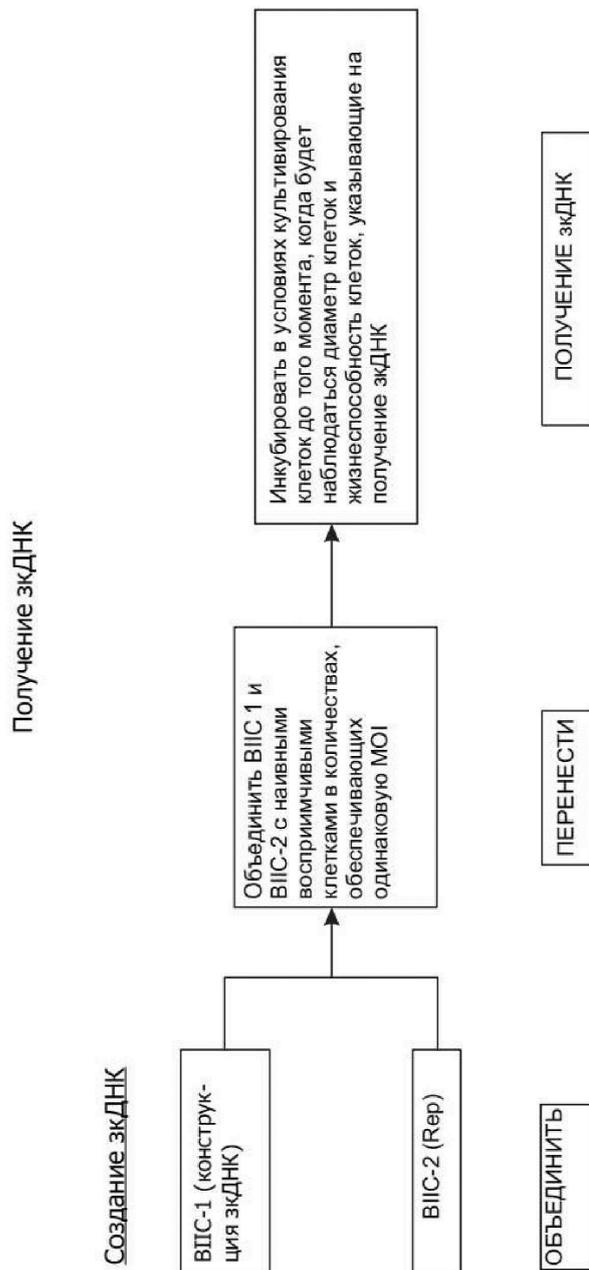
ФИГ. 3С



ФИГ. 3D



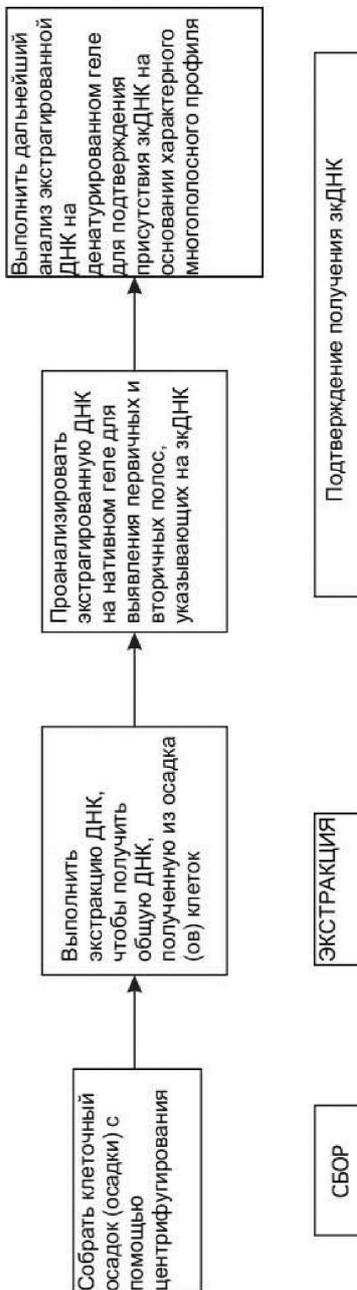
ФИГ. 4А



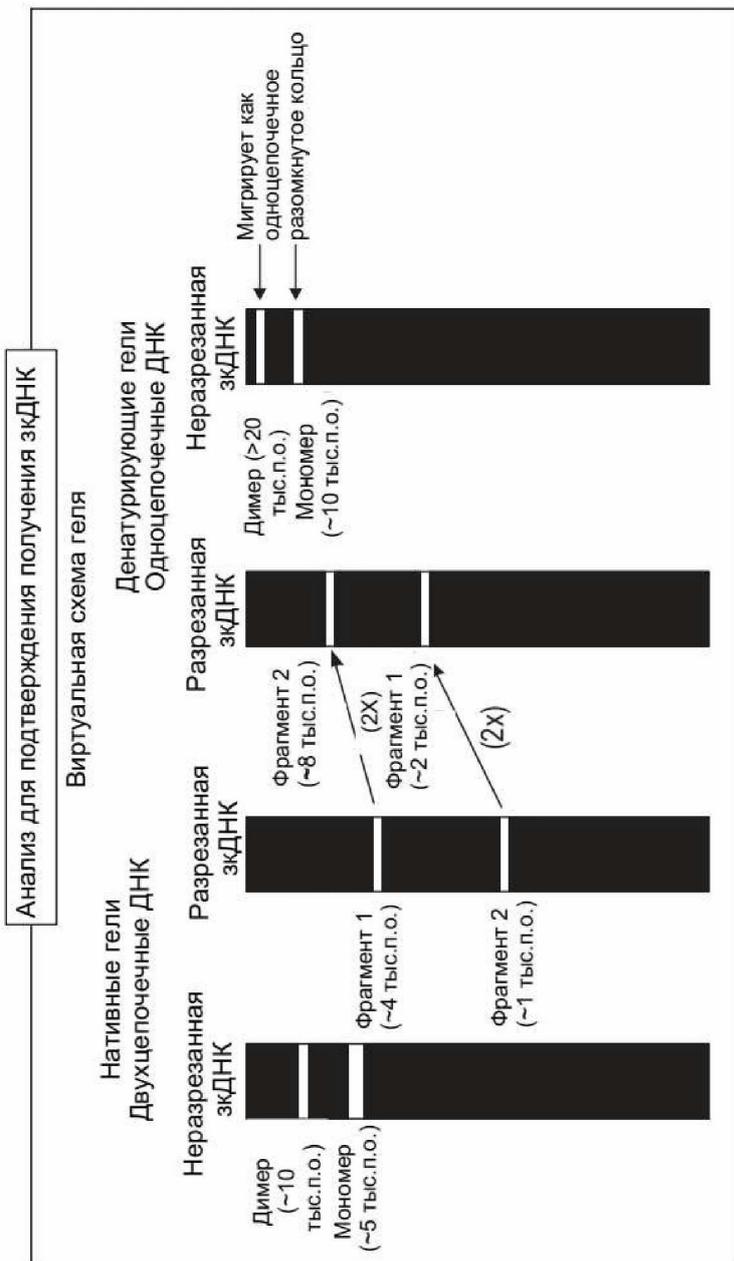
ФИГ. 4В

Получение зкДНК

Последующий способ

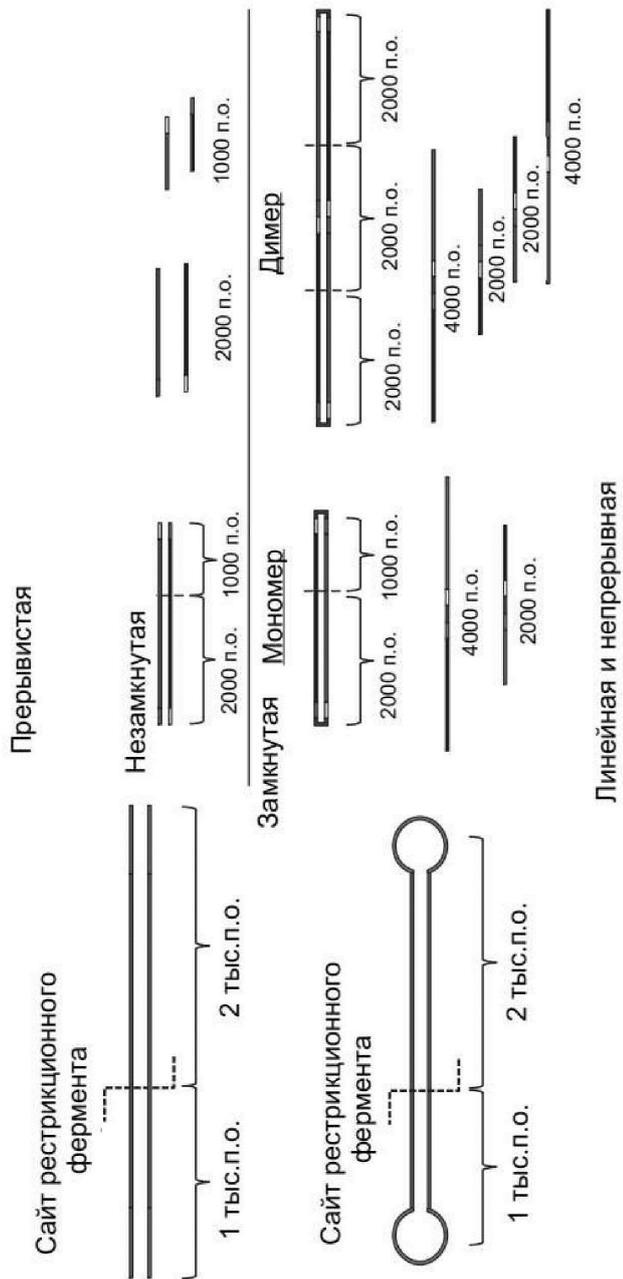


ФИГ. 4С

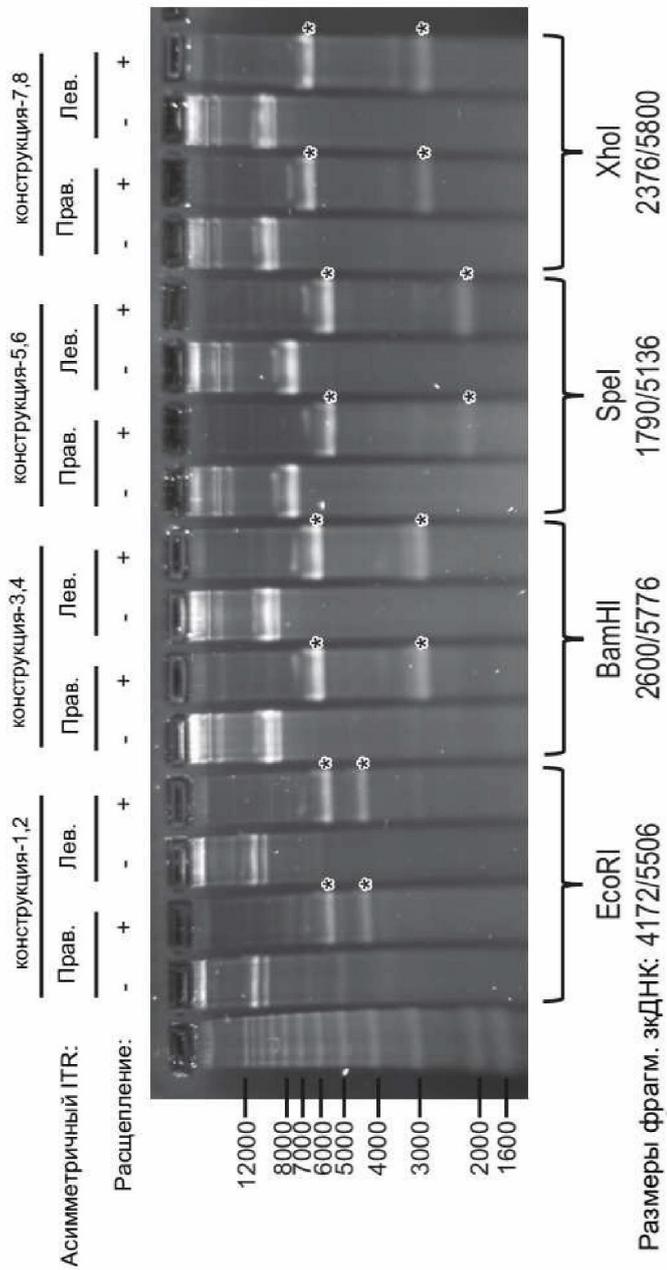


ФИГ. 4D

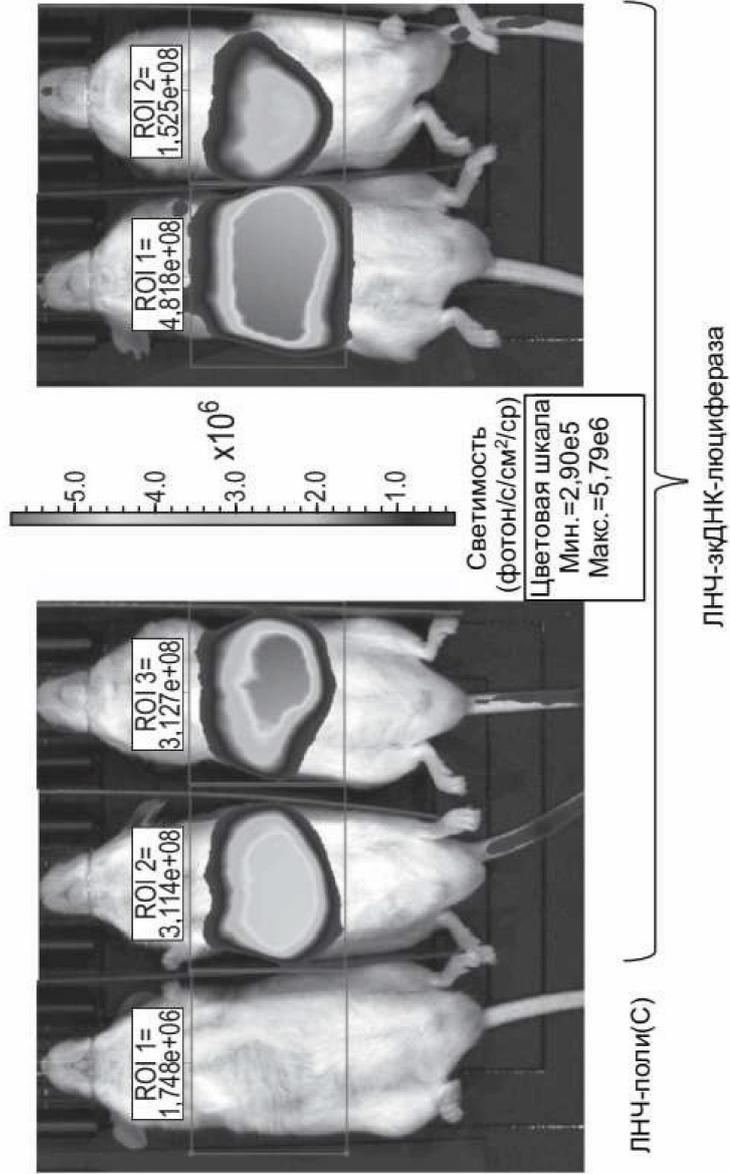
ФИГ. 4Е



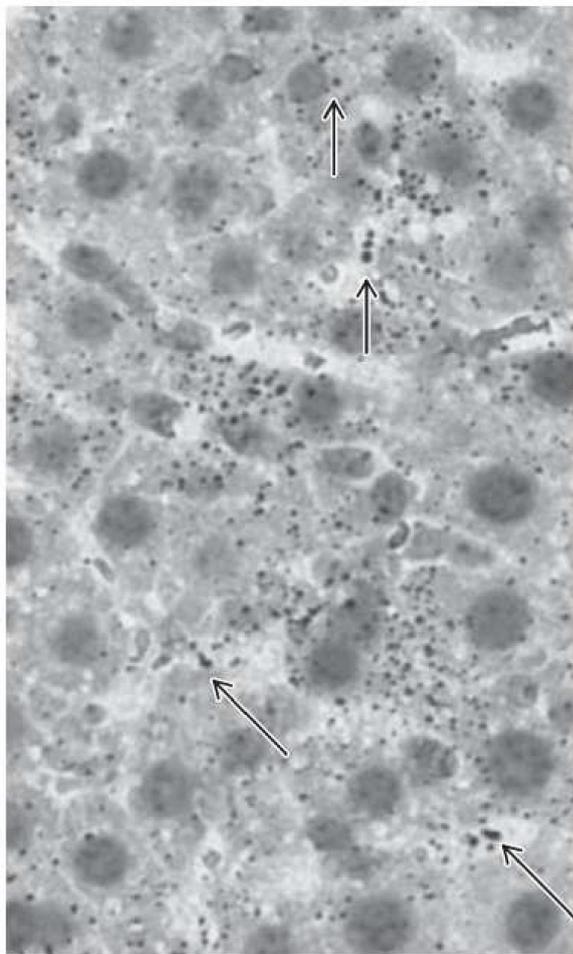
ФИГ. 5

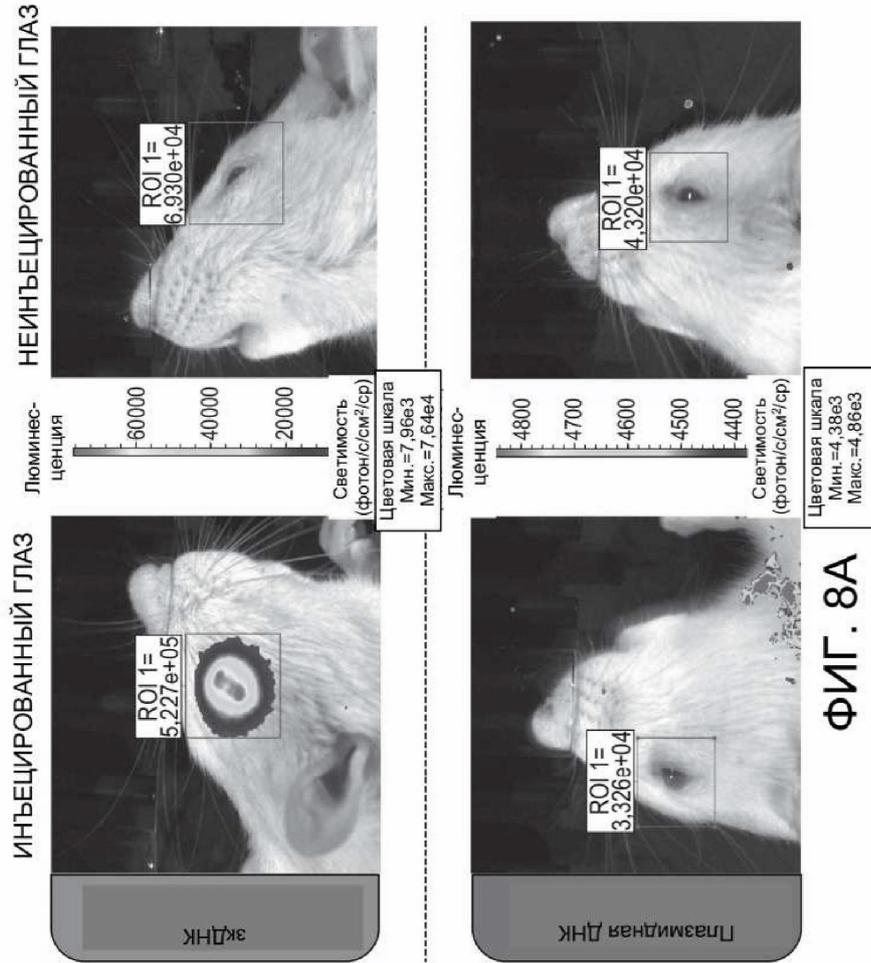


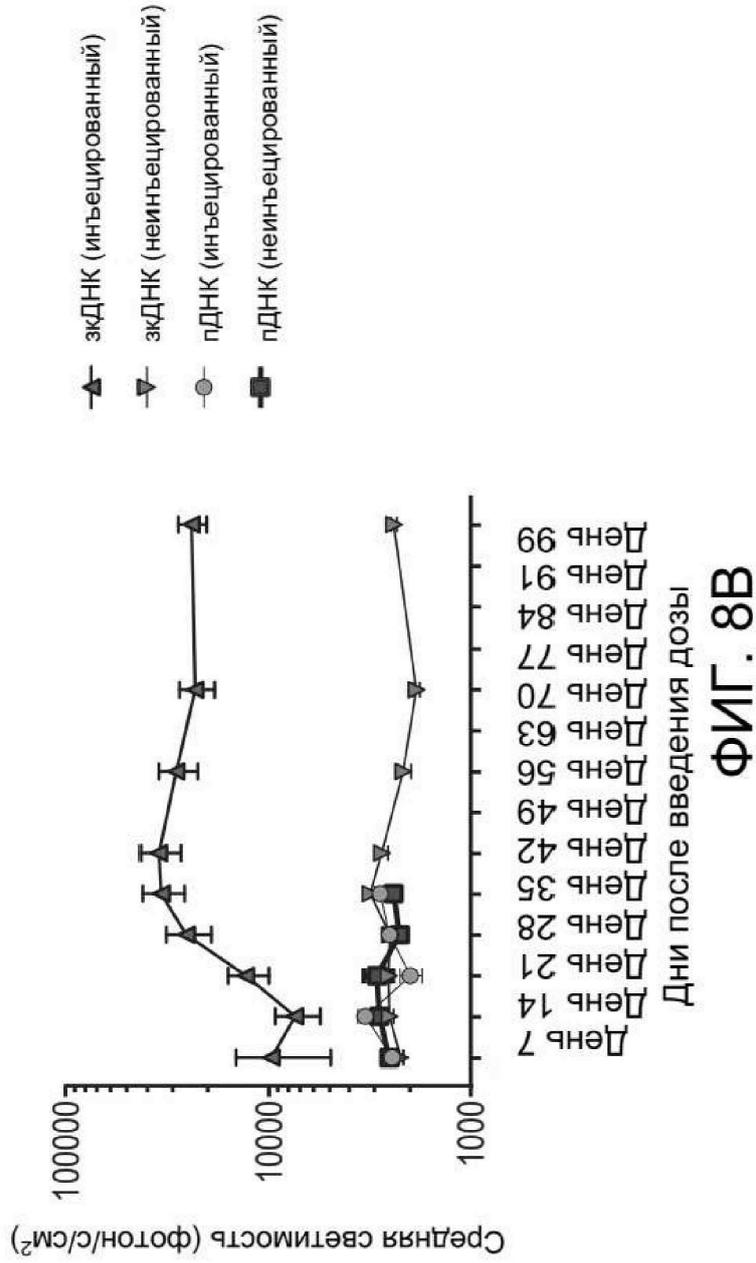
ФИГ. 6

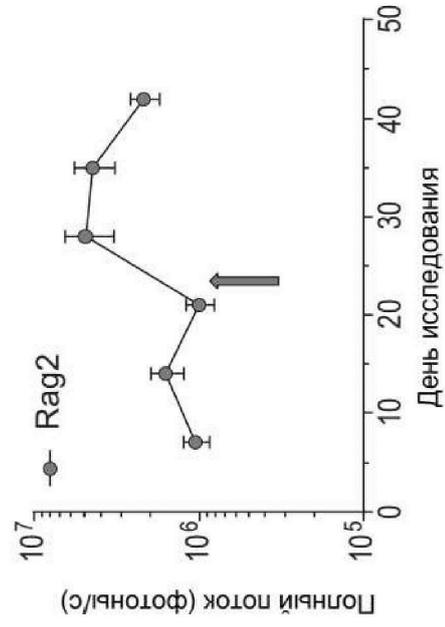


ФИГ. 7

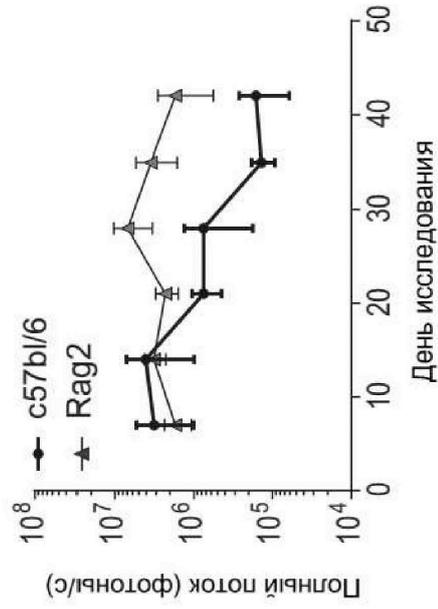




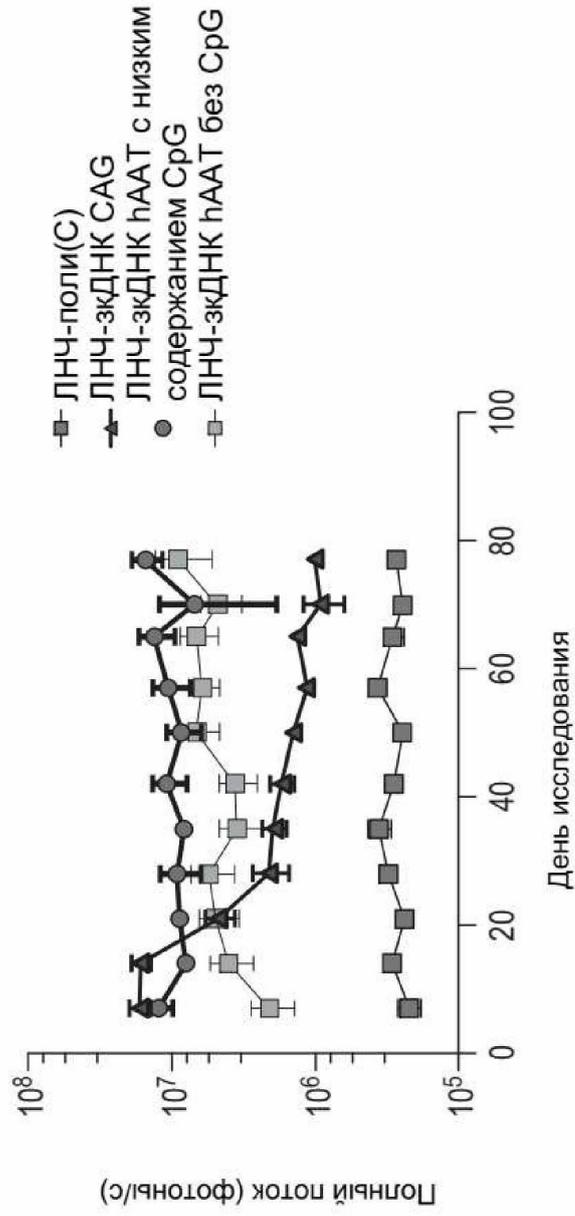




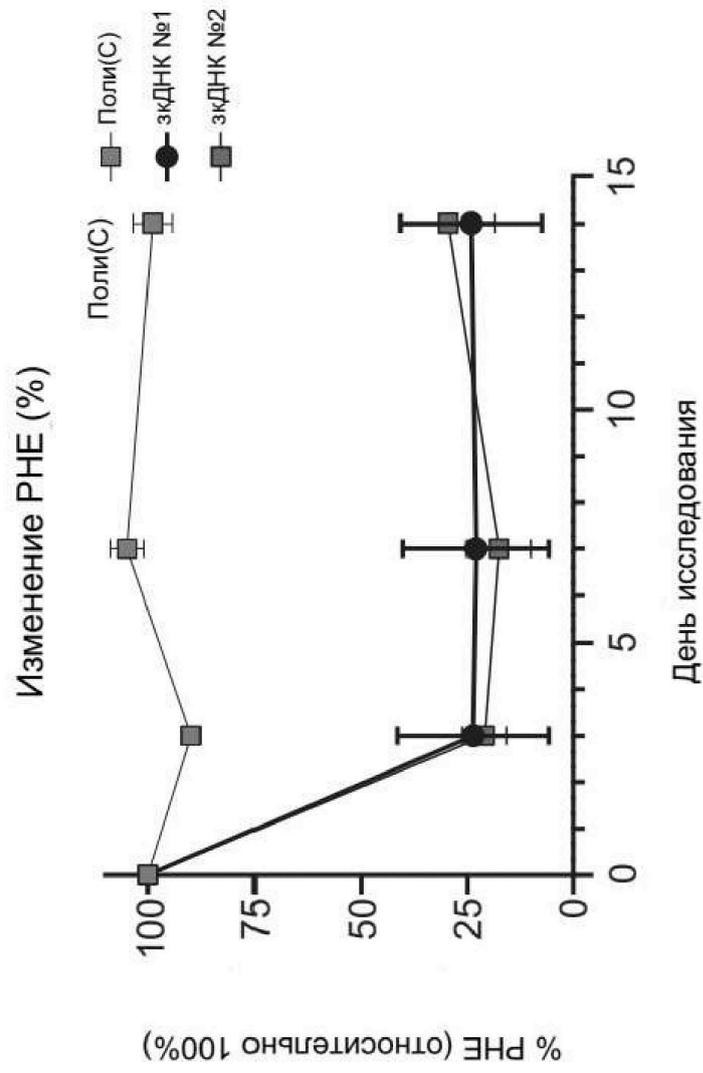
ФИГ. 9В



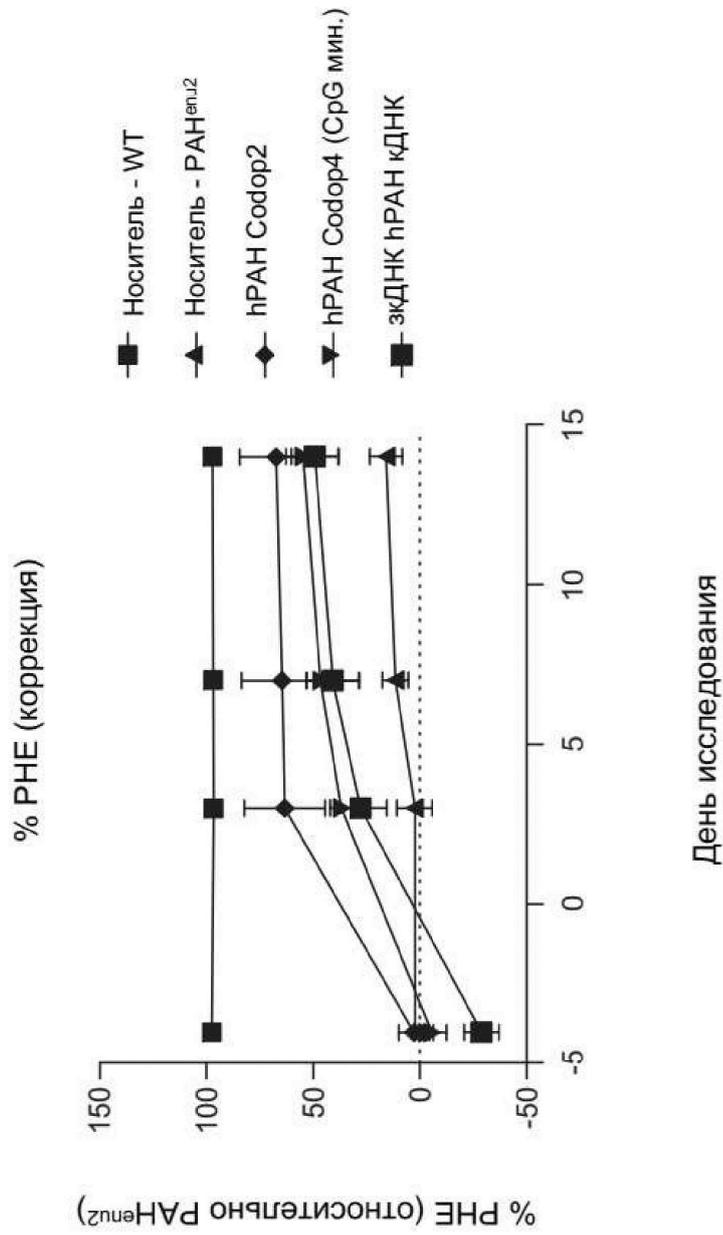
ФИГ. 9А



ФИГ. 10

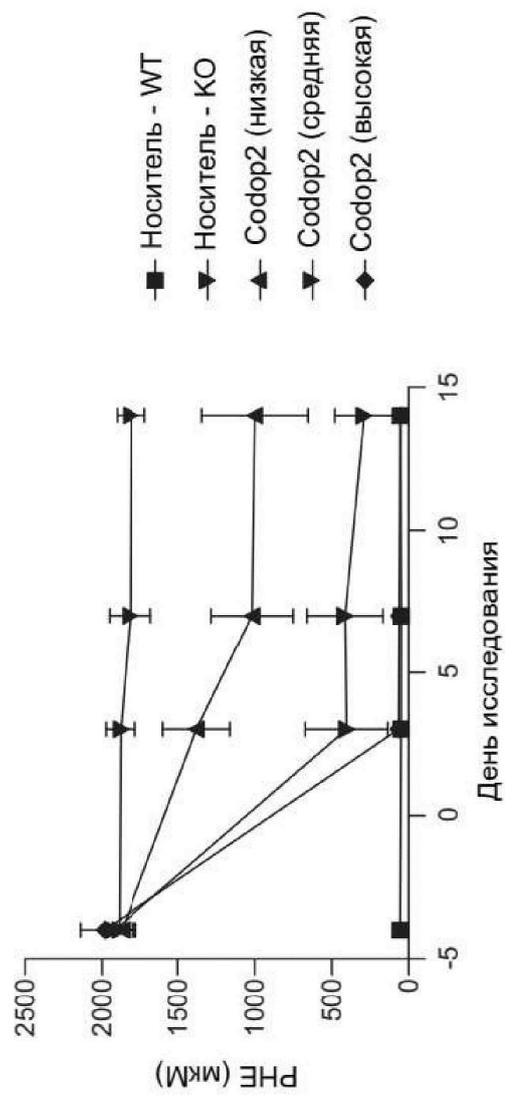


ФИГ. 11



ФИГ. 12

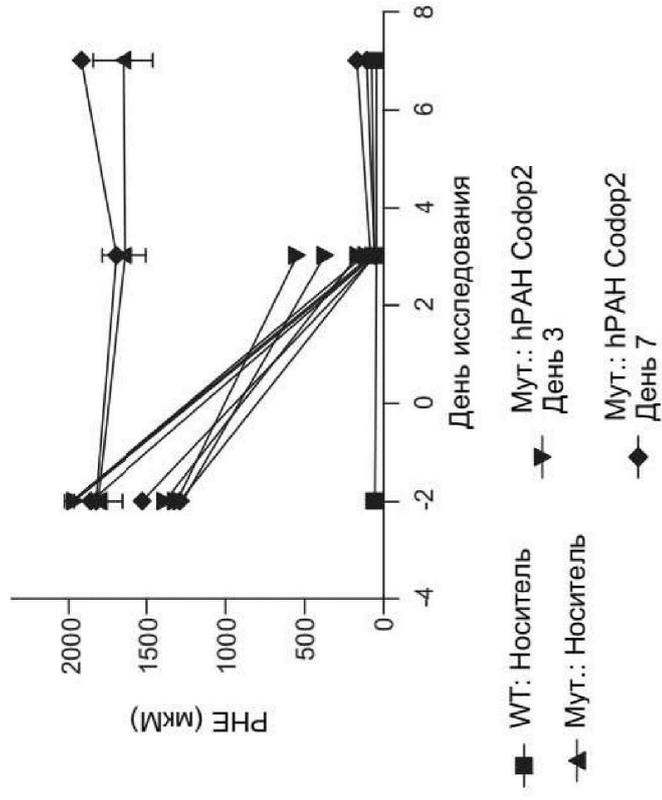
Диапазон доз hPAN Codor2
Влияние на сывороточный РНЕ



Codor2: hPAN Codor2 (ORF оптимизированной по кодонам зкДНК РАН человека)

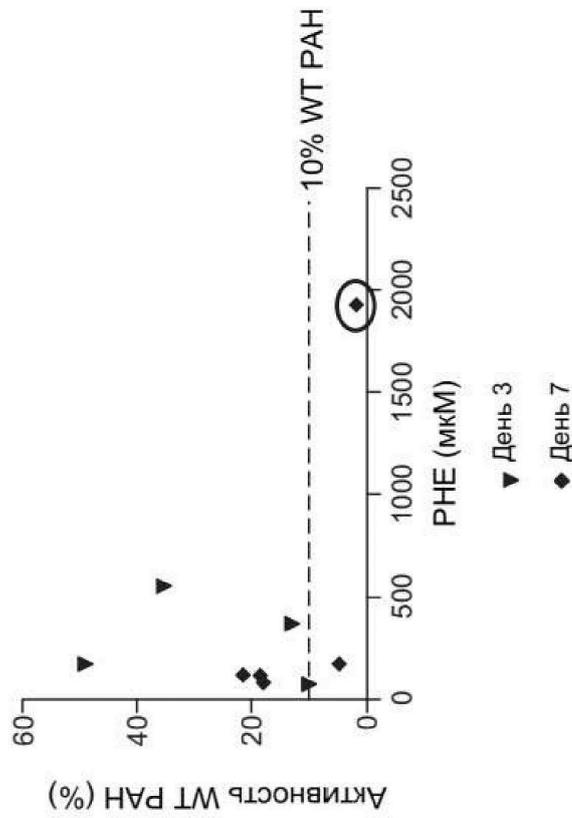
ФИГ. 13

hPAN Codop2: Острая коррекция PHE (отдельные животные)



ФИГ. 14А

hPAH Содор2: Активность в сравнении с PHE



○ Относится к данным мышей, не имеющим ответа, собранным в День 7;
 Относится к отсутствию коррекции PHE на ФИГ. 14А

ФИГ. 14В