

(19) C2 (11) 129010 (13) UA

(98) ТОВ "ІВП Група", а/с 87, м. Київ, 01135

(85) 2020-02-20

(74) Кістерський Кирило Арсенійович, (UA)

(45) [2024-12-25]

(43) [2020-05-25]

(24) 2024-12-26

(22) 2018-09-07

(12) Патент України (на 20 р.)

(21) a202000594

(46) 2024-12-25

(86) PCT/US2018/049996 2018-09-07

(30) 62/556,319 2017-09-08 US 62/556,324 2017-09-08 US 62/556,329 2017-09-08 US 62/556,331 2017-09-08 US 62/556,281 2017-09-08 US 62/556,335 2017-09-08 US

(54) НЕВІРУСНИЙ БЕЗКАПСИДНИЙ ДНК-ВЕКТОР ІЗ КОВАЛЕНТНО ЗАКРИТИМИ КІНЦЯМИ MODIFIED CLOSED-ENDED DNA (CEDNA)

(56) US 2014/0107186 A1, 17.04.2014 2 WO 2017/123918 A1, 20.07.2017 2 LINA LI et al Production and Characterization of Novel Recombinant Adeno-Associated Virus Replicative-Form Genomes: A Eukaryotic Source of DNA for Gene Transfer, PLOS ONE, vol. 8, no. 8, 01.08.2013, pages 1-14 3 SAMULSKI R J et al Rescue of adeno-associated virus from recombinant plasmids: Gene correction within the terminal repeats of AAV, CELL, ELSEVIER, AMSTERDAM NL, vol. 33, no. 1, 01.05.1983, pages 135 - 143 3 BOHENZKY R A et al Sequence and symmetry requirements within the internal palindromic sequences of the adeno-associated virus terminal repeat, VIROLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 166, no. 2, ISSN 0042-6822, 01.10.1988, pages 316 - 327 3 DOUGLAS M MCCARTY Self-complementary AAV Vectors ; Advances and Applications, MOLECULAR THERAPY, vol. 16, no. 10, ISSN 1525-0016, 01.10.2008, pages 1648 - 1656 3

(71) ДЖЕНЕРАТИОН БИО КО. US ДЖЕНЕРАТИОН БИО КО. US GENERATION BIO CO. US

(72) Котін Роберт Майкл US Котин Роберт Майкл US Kotin, Robert Michael US Алкан Озан US Алкан Озан US Alkan, Ozan US Джонс Анналізе US Джонс Аннализе US Jones, Annaliese US Керр Дуглас Ентоні US Керр Дуглас Ентони US Kerr, Douglas Anthony US Малакян Ара Карл US Малакян Ара Карл US Malakian, Ara Karl US Сіммонс Меттью Джон US Сіммонс Меттью Джон US Simmons, Matthew John US Райт Тереза Л. US Райт Тереза Л. US Wright, Teresa L. US

(73) ДЖЕНЕРАТИОН БИО КО. US ДЖЕНЕРАТИОН БИО КО. US GENERATION BIO CO. US

Вектори зкДНК, які мають лінійну та безперервну структуру, можуть продукуватися у великій кількості та використовуватися для ефективного перенесення й експресії трансгена. Вектори зкДНК включають експресійну касету та дві різні послідовності ITR, одержані з геномів AAV у визначеному порядку. Деякі вектори зкДНК, які забезпечуються даним винаходом, додатково включають цис-регуляторні елементи та забезпечують високу ефективність експресії гена. Також даний винахід забезпечує способи та лінії клітин для надійного й ефективного продукування лінійних, безперервних і неінкапсидованих векторів ДНК.

1. Невірусний безкапсидний ДНК-вектор із ковалентно закритими кінцями (вектор зкДНК), причому вектор зкДНК включає нуклеотидну послідовність, розташовану між асиметричних інвертованих кінцевих повторів (асиметричними ITR), причому принаймні один з асиметричних ITR включає делецію принаймні в D та D' ділянках ITR і делецію принаймні в одній з A, A', B, B', C та/або C' ділянках ITR, і причому принаймні один із асиметричних ITR включає сайт кінцевого розділення та сайт зв'язування Rep.
2. Вектор зкДНК за п. 1, який **відрізняється** тим, що вектор зкДНК демонструє смуги лінійної та безперервної ДНК у порівнянні з лінійними та переривчастими контрольними ДНК при розщепленні рестрикційним ферментом, який має єдину ділянку розпізнавання на векторі зкДНК, й аналізі шляхом електрофорезу на природному та денатуруючому гелі у порівнянні з лінійними та переривчастими контрольними ДНК.
3. Вектор зкДНК за п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що один або обидва асиметричні ITR походять з вірусу, вибраного з групи, що складається з: парвовірусу, депендовірусу й аденоасоційованого вірусу (AAV).
4. Вектор зкДНК за п. 3, який **відрізняється** тим, що один або обидва асиметричні ITR походять з різних вірусних серотипів або походять від одного вірусного серотипу, та/або в яких принаймні один з асиметричних ITR не є ITR дикого типу.
5. Вектор зкДНК за п. 4, який **відрізняється** тим, що один або обидва асиметричні ITR походять з серотипу AAV, вибраного з групи, що складається з: AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 й AAV12.
6. Вектор зкДНК за будь-яким із пп. 1-5, який **відрізняється** тим, що принаймні один з асиметричних ITR є синтетичним.
7. Вектор зкДНК за будь-яким із пп. 1-6, який **відрізняється** тим, що принаймні один з асиметричних ITR є модифікованим шляхом делеції усіх A, A', B, B', C, C', D і D' ділянок ITR.
8. Вектор зкДНК за будь-яким із пп. 1-7, який **відрізняється** тим, що принаймні один з асиметричних ITR є модифікованим шляхом делеції всієї або частини структури "петля на стеблі", утвореної ділянками A, A', B, B', C та/або C'.
9. Вектор зкДНК за будь-яким із пп. 1-8, який **відрізняється** тим, що один або обидва з асиметричних ITR є модифікованими шляхом делеції всієї або частини структури "петля на стеблі", утвореної ділянками B і B'.
10. Вектор зкДНК за будь-яким із пп. 1-9, який **відрізняється** тим, що один або обидва з асиметричних ITR є модифікованими шляхом делеції всієї або частини структури "петля на стеблі", утвореної ділянками C і C'.
11. Вектор зкДНК за будь-яким із пп. 1-10, який **відрізняється** тим, що один або обидва з асиметричних ITR є модифікованими шляхом делеції всієї або частини структури "петля на стеблі", утвореної ділянками B і B', і/або всієї або частини структури "петля на стеблі", утвореної ділянками C і C'.
12. Вектор зкДНК за будь-яким із пп. 1-9, який **відрізняється** тим, що один або обидва з асиметричних ITR включають єдину структуру "петля на стеблі" в ділянці, яка в ITR дикого типу включає першу структуру "петля на стеблі", утворену ділянками B і B', і другу структуру "петля на стеблі", утворену ділянками C і C'.
13. Вектор зкДНК за п. 12, який **відрізняється** тим, що один або обидва з асиметричних ITR включає єдине стебло та дві петлі в ділянці, яка в ITR дикого типу включає першу структуру "петля на стеблі", утворену ділянками B і B', і другу структура "петля на стеблі", утворену ділянками C і C'.
14. Вектор зкДНК за п. 12 або 13, який **відрізняється** тим, що один або обидва з асиметричних ITR включають єдине стебло й єдину петлю в ділянці, яка в ITR дикого типу включає першу структуру "петля на стеблі", утворену ділянками B і B', і другу структуру "петля на стеблі", утворену ділянками C і C'.
15. Вектор зкДНК за будь-яким із пп. 1-14, який **відрізняється** тим, що D і D' ділянки ITR

містять сайти зв'язування фактора транскрипції.

16. Вектор зкДНК за будь-яким із пп. 1-15, який **відрізняється** тим, що принаймні один асиметричний ITR містить делецію принаймні D і D' ділянок ITR, додатково містить делецію ділянок ITR A та/або A'.

17. Вектор зкДНК за будь-яким із пп. 1-16, який **відрізняється** тим, що принаймні один асиметричний ITR містить делецію принаймні D і D' ділянок ITR, додатково містить делецію всіх ділянок ITR A, A', B, B', C і C'.

18. Вектор зкДНК за будь-яким із пп. 1-17, який **відрізняється** тим, що принаймні один асиметричний ITR є модифікованим ITR AAV2, який включає нуклеотидну послідовність, вибрану з групи, що складається з: SEQ ID NO: 101-499 та SEQ ID NO: 545-547, або нуклеотидну послідовність, що має принаймні 95 % ідентичність послідовності з нуклеотидною послідовністю, вибраної з групи, що складається з: SEQ ID NO: 101-499 і SEQ ID NO: 545-547.

19. Вектор зкДНК за будь-яким із пп. 1-18, який **відрізняється** тим, що принаймні один асиметричний ITR є модифікованим ITR AAV2, який включає нуклеотидну послідовність, вибрану з групи, що складається з: SEQ ID NO: 2, 52, 63 і 64, або нуклеотидну послідовність, яка має принаймні 95 % ідентичність послідовності з нуклеотидною послідовністю, вибраної з групи, що складається з: SEQ ID NO: 2, 52, 63 і 64.

20. Вектор зкДНК за будь-яким із пп. 1-19, який **відрізняється** тим, що один або обидва асиметричні ITR включають послідовність, відмінну від SEQ ID NO: 2, 52, 63, 64, 113, 114 і 557.

21. Вектор зкДНК за будь-яким із пп. 1-20, який **відрізняється** тим, що нуклеотидна послідовність включає аптамер.

22. Вектор зкДНК за будь-яким із пп. 1-21, який **відрізняється** тим, що вектор зкДНК містить принаймні один регулюючий перемикач.

23. Вектор зкДНК за п. 22, який **відрізняється** тим, що принаймні один регулюючий перемикач є вибраним із групи, що складається з: ABA; AIR; ART; BEARON, BEAROFF; BirA-tTA; BIT; Cry2-CIB1; CTA, CTS; cTA, rcTA; Екдизону; EcR:RXR; electro-genetic перемикача; ER-p65-ZF; E.REX; EthR; GAL4-ER; GAL4-hPR; GAL4-Raps; GAL4-TR; GyrB; HEA-3; Intramer; LacI; LAD; LightOn; NICE; PPAR*; PEACE; PIT; REDOX; QuoRex; ST-TA; TIGR; TraR; TET-OFF, TET-ON; TRT; UREX; VAC; ZF-ER, ZF-RXR/EcR; ZF-Raps; ZF перемикачів; ZF(TF)s; аптамера PHKi; аптамера PHKi мікроPHK; аптамера сплайсингу; аптазима; реплікона CytTS; TET-OFF-shRNA, TET-ON-shRNA; theo аптамера; 3'-UTR аптазима; 5'-UTR аптазима; аптамера Хьохста; H23 аптамера; L7Ae аптамера; MS2 аптамера; AID; ER DD; FM; HaloTag; HDV-аптазима; PROTAC; щита DD; щита LID та TMP DD.

24. Вектор зкДНК за будь-яким із пп. 1-23, який **відрізняється** тим, що вектор знаходиться у наноносії.

25. Вектор зкДНК за п. 24, який **відрізняється** тим, що наноносій включає ліпідну наночастинку (LNP).

26. Невірусний безкапсидний ДНК-вектор із ковалентно закритими кінцями (вектор зкДНК) за будь-яким із пп. 1-23, який одержують від процесу, що включає етапи:

а) інкубації популяції клітин комах, які містять експресійний конструкт зкДНК у присутності принаймні одного Rep-білка, причому експресійний конструкт зкДНК кодує вектор зкДНК в умовах, ефективних, і протягом часу, достатнього для викликання продукування вектора зкДНК у клітинах комах; і

б) виділення вектора зкДНК з клітин комах.

27. Вектор зкДНК за п. 26, який **відрізняється** тим, що експресійний конструкт зкДНК є вибраним з групи, що складається з: плазміди зкДНК, бакміди зкДНК та бакуловірусу зкДНК.

28. Вектор зкДНК за п. 26 або 27, який **відрізняється** тим, що клітина комах експресує принаймні один Rep-білок.

29. Вектор зкДНК за п. 28, який **відрізняється** тим, що принаймні один Rep-білок походить з вірусу, вибраного з групи, що складається з: парвовірусу, депендовірусу й аденоасоційованого вірусу (AAV).
30. Вектор зкДНК за п. 29, який **відрізняється** тим, що принаймні один Rep-білок походить із серотипу AAV, вибраного з групи, що складається з: AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 й AAV12.
31. Експресійний конструкт зкДНК, який кодує вектор зкДНК за будь-яким із пп. 1-23.
32. Експресійний конструкт зкДНК за п. 31, вибраний з групи, що складається з: плазміди зкДНК, бакміду зкДНК та бакуловірусу зкДНК.
33. Клітина-хазяїн, яка включає експресійний конструкт зкДНК за п. 31 або 32.
34. Клітина-хазяїн за п. 33, яка експресує принаймні один Rep-білок.
35. Клітина-хазяїн за п. 34, яка **відрізняється** тим, що принаймні один Rep-білок походить з вірусу, вибраного з групи, що складається з: парвовірусу, депендовірусу й аденоасоційованого вірусу (AAV).
36. Клітина-хазяїн за п. 35, яка **відрізняється** тим, що принаймні один Rep-білок походить із серотипу AAV, вибраного з групи, що складається з: AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 й AAV12.
37. Клітина-хазяїн за будь-яким із пп. 33-36, яка є клітиною комахи.
38. Клітина-хазяїн за п. 37, яка є клітиною Sf9.
39. Спосіб одержання вектора зкДНК, який включає:
- а) інкубування клітини-хазяїна за будь-яким із пп. 33-38 в умовах, ефективних, і протягом часу, достатнього для викликання продукування вектора зкДНК; і
 - б) виділення зкДНК з клітини-хазяїна.
40. Вектор зкДНК за будь-яким із пп. 1-25 для застосування в лікуванні, профілактиці, послабленні, контролюванні або діагностуванні хвороби або порушення у суб'єкта, який цього потребує, причому принаймні одну нуклеотидну послідовність вибирають для лікування, профілактики, послаблення, діагностування або контролювання хвороби або порушення.
41. Вектор зкДНК за п. 40, який **відрізняється** тим, що принаймні одна нуклеотидна послідовність, будучи транскрибованою або трансльованою, модифікує відхилення в кількості ендogenous білка у суб'єкта.
42. Вектор зкДНК за п. 40, який **відрізняється** тим, що принаймні одна нуклеотидна послідовність, будучи транскрибованою або трансльованою, модифікує відхилення функції або активності ендogenous білка, або шляху у суб'єкта.
43. Вектор зкДНК за будь-яким із пп. 40-42, який **відрізняється** тим, що принаймні одна нуклеотидна послідовність кодує або включає молекулу нуклеїнової кислоти, вибрану з групи, що складається з: РНКі, міРНК, мікроРНК, нкРНК й антисмислового оліго- або полінуклеотиду.
44. Вектор зкДНК за будь-яким із пп. 40-42, який **відрізняється** тим, що принаймні одна нуклеотидна послідовність кодує білок.
45. Вектор зкДНК за п. 44, який **відрізняється** тим, що принаймні одна нуклеотидна послідовність кодує маркерний білок.
46. Вектор зкДНК за будь-яким із пп. 40-45, який **відрізняється** тим, що принаймні одна нуклеотидна послідовність кодує агоніст або антагоніст ендogenous білка, або шлях, асоційований з хворобою або порушенням.
47. Вектор зкДНК за будь-яким із пп. 40-45, який **відрізняється** тим, що принаймні одна нуклеотидна послідовність кодує антитіло.
48. Вектор зкДНК за будь-яким із пп. 40-47, який **відрізняється** тим, що вектор зкДНК вводять в комбінації з фармацевтично прийнятним носієм.
49. Вектор зкДНК за будь-яким із пп. 1-25 для застосування в доставленні терапевтичного білка суб'єкту, причому принаймні одна нуклеотидна послідовність кодує терапевтичний

білок.

50. Вектор зкДНК за п. 49, який **відрізняється** тим, що терапевтичний білок є терапевтичним антитілом.

51. Комплект для доставлення нуклеїнової кислоти, який включає вектор зкДНК за будь-яким із пп. 1-23 і наноносій, упаковані в контейнер з вкладкою у пакеті.

52. Комплект для продукування вектора зкДНК за будь-яким із пп. 1-25, причому комплект включає експресійний конструкт, який включає принаймні один сайт рестрикції для вставлення принаймні однієї нуклеотидної послідовності, або регулюючий перемикач, або і те, й інше, причому принаймні один сайт рестрикції розташовується між асиметричних інвертованих кінцевих повторів (асиметричними ITR), причому принаймні один із асиметричних ITR включає делецію принаймні в D та D' ділянках ITR і делецію принаймні в одній з A, A', B, B', C та/або C' ділянках, причому принаймні один з ITR включає сайт кінцевого розділення та сайт зв'язування Rep.

53. Комплект за п. 52, який є придатним для продукування вектора зкДНК за будь-яким із пп. 1-25.

54. Комплект за п. 52 або 53, що також включає популяцію клітин комах, яка є позбавленою кодуєчих послідовностей вірусного капсиду, що у присутності Rep-білка може викликати продукування вектора зкДНК.

55. Комплект за будь-яким із пп. 52-54, який також включає вектор, що включає полінуклеотидну послідовність, яка кодує принаймні один Rep-білок, причому вектор є придатним для експресії принаймні одного Rep-білка у клітині комах.

CeDNA vectors having linear and continuous structure can be produced in high yields and used for effective transfer and expression of a transgene. ceDNA vectors comprise an expression cassette and two different ITR sequences derived from AAV genomes in a specified order. Some ceDNA vectors provided herein further comprise cis-regulatory elements and provide high gene expression efficiencies. Further provided herein are methods and cell lines for reliable and efficient production of the linear, continuous and capsid-free DNA vectors.

Перехресне посилання на споріднені заявки

Ця заявка заявляє пріоритет згідно з 35 U.S.C. § 119(e) для попередніх заявок США №№: 62/556,319; 62/556,324; 62/556,329; 62/556,331; 62/556,281 та 62/556,335, кожну з яких було подано 8 вересня 2017 р., і зміст кожної з яких включено до цього опису шляхом посилання у повному обсязі.

Перелік послідовностей

Дана заявка містить перелік послідовностей, який було подано в електронному вигляді у форматі ASCII, й який включено до цього опису шляхом посилання в його повному обсязі. Зазначена копія ASCII, створена 7 вересня 2018 р., має назву 080170-090580WOPT_SL.txt і розмір 205 991 байт.

Галузь винаходу

Даний винахід стосується галузі генної терапії, яка включає доставлення послідовностей екзогенних ДНК у задану клітину, тканину, орган або організм.

Рівень техніки

Генна терапія має на меті поліпшення клінічних результатів для пацієнтів, які страждають від генетичних мутацій або набутих хвороб, викликаних порушенням профілю генної експресії. Генна терапія включає лікування або профілактику медичних станів, які виникають в результаті пошкодження генів або відхилень у регуляції й експресії, наприклад, недостатньої експресії або надекспресії, що може призводити до порушення, захворювання, злоякісності та т.ін. Наприклад, хвороба або порушення, викликані пошкодженням гена, можуть піддаватися лікуванню, профілактиці або послабленню шляхом доставлення коректуючого генетичного матеріалу в організм пацієнта, в результаті чого відбувається терапевтична експресія генетичного матеріалу в організмі пацієнта. Основою генної терапії є забезпечення транскрипційної касети з активним генним продуктом (іноді називається трансгеном), яка в результаті може забезпечувати, наприклад, позитивний ефект мутації з набуттям функції, негативний ефект мутації з втратою функції або інший результат, наприклад, онколітичний ефект. Генна терапія також може застосовуватися для лікування хвороби або злоякісності, викликані іншими чинниками. Моногенні порушення у людини піддаються лікуванню шляхом доставлення й експресії нормального гена у клітини-мішені. Доставлення й експресія коректуючого гена у клітинах-мішенях пацієнта здійснюють багатьма способами, включаючи застосування підданих інженерії вірусів і векторів доставлення вірусних генів. Серед багатьох наявних векторів вірусного походження (наприклад, рекомбінантного ретровірусу, рекомбінантного лентивірусу, рекомбінантного аденовірусу та т.ін.) рекомбінантний аденоасоційований вірус (rAAV) набуває популярності як універсальний вектор у генній терапії.

Аденоасоційовані віруси (AAV) відносяться до родини парвовірусів, більше конкретно – складають рід депендопарвовірус. Геном AAV складається з молекули лінійної одноланцюгової ДНК, яка містить приблизно 4,7 тисяч пар нуклеотидів (т.п.н.) і складається з двох головних відкритих рамок зчитування (ORF), які кодують неструктурні Rep (реплікаційні) та структурні Cap (капсидні) білки. Було розпізнано другу ORF в межах cap гена, яка кодує активуючий складання білок (AAP). ДНК, які є фланкуючими для кодуючих ділянок AAV, являють собою дві цис-діючі послідовності інвертованого кінцевого повтору (ITR), що мають довжину приблизно 145 нуклеотидів, з розірваними паліндромними послідовностями, які можуть бути складені в енергетично стійкі шпилькові структури, які функціонують як праймери реплікації ДНК. Було виявлено, що, крім їхньої ролі у реплікації ДНК, послідовності ITR беруть участь у включенні вірусної ДНК до клітинного геному, звільненні з геному або плазмід хазяїна й інкапсидзації вірусної нуклеїнової кислоти у зрілі віріони (Muzyczka, (1992) Curr. Top. Micro. Immunol. 158: 97 - 129).

Вектори, які походять від AAV (тобто, рекомбінантні AAV вектори (rAAV) або AAV), є привабливими з точки зору доставлення генетичного матеріалу, оскільки (i) вони здатні інфікувати (трансдукувати) найрізноманітніші типи непрولیферуючих і проліферуючих клітин, включаючи міоцити та нейрони; (ii) вони є позбавленими структурних генів вірусів, що зменшує реакцію клітин-хазяїнів на вірусну інфекцію, наприклад, інтерферон-опосередковані реакції; (iii) віруси дикого типу вважаються непатологічними для людини; (iv) на відміну від AAV дикого типу, здатних інтегруватися у геном клітини-хазяїна, дефектні за реплікацією AAV вектори не мають гер-гена та зазвичай зберігаються як епісоми, таким чином, обмежуючи ризик інсерційного мутагенезу або генотоксичності; й (v) у порівнянні з іншими векторними системами AAV вектори зазвичай вважаються відносно слабкими імуногенами, а отже, не викликають значної імунної реакції (див. ii) та, таким чином, забезпечують стійкість векторної ДНК і, потенційно, довготривалу експресію терапевтичних трансгенів. AAV вектори також можуть вироблятися та рецензуватися у високому титрі та доставлятися шляхом внутрішньоартеріальних, внутрішньовених або внутрішньочеревинних ін'єкцій, що дозволяє здійснювати розподіл векторів і перенесення генів до значних ділянок м'язів через єдину ін'єкцію у гризунів (Goyenvalle et al., 2004; Fougereousse et al., 2007; Korpanati et al., 2010; Wang et al., 2009) і собак. В клінічному дослідженні з лікування спинальної м'язової атрофії 1-го типу AAV вектори доставляли системно з метою спрямування на головний мозок, в результаті чого спостерігались явні клінічні поліпшення.

Однак існує декілька значних недоліків застосування частинок AAV як вектора доставлення гена. Одним із суттєвих недоліків, пов'язаних з rAAV, є його обмежена здатність до пакування вірусу приблизно 4,5 т.п.н. гетерологічної ДНК (Dong et al., 1996; Athanasiopoulos et al., 2004; Lai et al., 2010). В результаті застосування AAV векторів було обмежено до здатності до кодування білка, нижчої за

150 000 Да. Другий недолік полягає в тому, що в результаті переважання інфікування AAV дикого типу серед популяції кандидати для генної терапії із застосуванням gAAV мали відбиратися на наявність нейтралізуючих антитіл, які видаляють вектор з організму пацієнта. Третій недолік є пов'язаним із імуногенністю капсиду, що перешкоджає повторному введенню пацієнтам, які не були виключені з первісного лікування. Імунна система пацієнта може реагувати на вектор, який ефективно діє як "бустерна" доза для стимулювання імунної системи, що генерує високий титр антитіл проти AAV, які перешкоджають майбутньому лікуванню. У деяких нещодавніх повідомленнях вказується на проблеми з імуногенністю при високих дозах. Ще один помітний недолік полягає у тому, що початок AAV-опосередкованої експресії гена є відносно повільним, з урахуванням того, що одноланцюгова ДНК AAV повинна бути перетворена на дволанцюгову ДНК перед експресією гетерологічного гена. Хоча робилися спроби обійти цю проблему шляхом побудови векторів дволанцюгових ДНК, ця стратегія додатково обмежує розмір експресійної касети трансгена, яка може бути включена в AAV вектор (McCarty, 2008; Varenika et al., 2009; Foust et al., 2009).

Крім того, традиційні віріони AAV з капсидами одержують шляхом включення плазмиди або плазмід, які містять геном AAV, гер-гени та сар-гени (Grimm et al., 1998). Після включення цих хелперних плазмід у trans геном AAV "рятують" (тобто, вивільнюють, а потім ампліфікують) з геному хазяїна та піддають подальшій інкапсидзації (вірусні капсиди) для одержання біологічно активних AAV векторів. Однак було виявлено, що такі інкапсидовані вірусні AAV вектори неефективно трансдукують певні клітини та типи тканин. Капсиди також викликають імунну реакцію.

Відповідно, застосування аденоасоційованих вірусних (AAV) векторів для генної терапії є обмеженим через єдине введення пацієнтам (через імунну реакцію у пацієнта), обмежений діапазон трансгенного генетичного матеріалу, підходящого для доставлення в AAV вектори через мінімальну здатність до пакування вірусу (приблизно 4,5 т.п.н.) асоційованого AAV капсиду, а також повільну AAV-опосередковану експресію гена. Застосуванню gAAV для клінічної генної терапії також перешкоджають розбіжності між пацієнтами, які не піддаються прогнозуванню за реакцією на дозу в сингенних мишах чи моделях або в інших модельних видів.

Рекомбінантні безкапсидні AAV вектори можуть бути одержані як виділені лінійні молекули нуклеїнової кислоти, які включають експресибельні трансгенні та промоторні ділянки, за боками яких розташовуються дві послідовності інвертованих кінцевих повторів (ITR) AAV дикого типу, включаючи сайти Rep зв'язування та кінцевого розділення. Ці рекомбінантні AAV вектори є позбавленими кодуєчих послідовностей капсидних білків AAV і можуть бути одноланцюговими, дволанцюговими або дуплексними, з одним або обома кінцями, ковалентно зв'язаними через дві паліндромні послідовності ITR дикого типу (наприклад, документ WO2012/123430, патент США 9,598,703). Вони дозволяють уникнути багатьох проблем AAV-опосередкованої генної терапії завдяки тому, що трансгенна здатність є значно вищою, початок трансгенної експресії є швидким, й імунна система пацієнта розпізнає молекули ДНК як вірус, що підлягає видаленню. Однак постійна експресія трансгена може не бути бажаною в усіх випадках, і канонічні ITR AAV дикого типу можуть не бути оптимізованими стосовно функції зкДНК. Таким чином, зберігається незадоволена потреба у контрольованих векторах рекомбінантної ДНК з поліпшеними властивостями продукування й/або експресії.

Короткий опис винаходу

Описаний авторами винахід стосується невірусного безкапсидного ДНК-вектора з ковалентно закритими кінцями (вказується авторами як "ДНК-вектор із закритими кінцями" або "зкДНК-вектор"). Описані авторами зкДНК-вектори являють собою безкапсидні, лінійні дуплексні молекули ДНК, утворені з безперервного ланцюга комплементарної ДНК з ковалентно закритими кінцями (лінійна, безперервна та неінкапсидована структура), які включають послідовність 5' інвертованого кінцевого повтору (ITR) та послідовність 3' ITR, які є різними або асиметричними відносно одна одної.

Описана авторами технологія стосується вектора зкДНК, який містить принаймні одну модифіковану послідовність AAV інвертованого кінцевого повтору (ITR) та трансген, що піддається експресії. Описані авторами вектори зкДНК можуть продукуватися в еукаріотних клітинах й, таким чином, є позбавленими модифікацій прокаріотних ДНК та забруднення бактеріальним ендотоксином у клітинах комах.

В одному аспекті невірусні безкапсидні ДНК-вектори з ковалентно закритими кінцями в оптимальному варіанті є лінійними дуплексними молекулами та можуть бути одержані з векторного полінуклеотиду, який кодує гетерологічну нуклеїнову кислоту функціонально розташовану між двома різними послідовностями інвертованих кінцевих повторів (ITR) (наприклад, ITR AAV), причому принаймні один із ITR включає сайт кінцевого розділення та реплікаційний сайт зв'язування білка (RPS) (іноді вказується як реплікативний сайт зв'язування білка), наприклад, Rep сайт зв'язування, й один із ITR включає делецію, вставку або заміщення у порівнянні з іншим ITR. Тобто, один із ITR є асиметричним відносно іншого ITR. В одному варіанті втілення принаймні один із ITR являє собою ITR AAV, наприклад, ITR AAV дикого типу або модифікований ITR AAV. В одному варіанті втілення принаймні один із ITR є модифікованим ITR відносно іншого ITR – тобто, зкДНК включає ITR, які є асиметричними відносно один одного. В одному варіанті втілення принаймні один із ITR є нефункціональним ITR.

У деяких варіантах втілення вектор зкДНК включає: (1) експресійну касету, яка включає цис-регуляторний елемент, промотор і принаймні один трансген; або (2) промотор, функціонально

зв'язаний з принаймні одним трансгеном, і (3) дві самокомплементарні послідовності, наприклад, ITR, які є фланкуючими відносно зазначеної експресійної касети, причому вектор зкДНК не є асоційованим із капсидним білком. У деяких варіантах втілення вектор зкДНК включає дві самокомплементарні послідовності, які містяться в AAV геномі, принаймні один із яких включає функціональний Рер-зв'язувальний елемент (RBE) (який також вказується авторами як "RBS") і сайт кінцевого розділення (trs) AAV або функціональний варіант RBE, а також один або декілька цис-регуляторних елементів, функціонально зв'язаних з трансгеном. У деяких варіантах втілення вектор зкДНК включає додаткові компоненти для регулювання експресії трансгена, наприклад, регулюючі перемикачі, які описуються авторами у розділі під назвою "Регулюючі перемикачі", для контролювання та регулювання експресії трансгена та можуть включати регулюючий перемикач, наприклад, блокуючий перемикач для забезпечення можливості контрольованої смерті клітини, яка включає вектор зкДНК.

У деяких варіантах втілення дві самокомплементарні послідовності можуть бути послідовностями ITR з будь-якого відомого парвовірусу, наприклад, депендовірусу, такий, як AAV (наприклад, AAV1-AAV12). Може застосовуватися будь-який сіротип AAV, включаючи, крім інших, послідовність модифікованого ITR AAV2, яка зберігає сайт Рер-зв'язування (RBS), такий, як 5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3' (SEQ ID NO: 531), і сайт кінцевого розділення (TRS), додатково до варіабельної паліндромної послідовності, що забезпечує можливість утворення шпилькової вторинної структури. У деяких варіантах втілення ITR є синтетичною послідовністю ITR, яка зберігає функціональний сайт Рер-зв'язування (RBS), такий, як 5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3' (SEQ ID NO: 531), і сайт кінцевого розділення (TRS), додатково до варіабельної паліндромної послідовності, що забезпечує можливість утворення шпилькової вторинної структури. У деяких прикладах модифікована послідовність ITR зберігає послідовність RBS, TRS і структуру та позицію Рер-зв'язувального елемента, який утворює частину кінцевої петлі однієї зі шпилькових вторинних структур ITR з відповідної послідовності ITR AAV2 дикого типу.

Типові послідовності ITR для застосування у векторах зкДНК розкриваються у будь-яких одній або декількох Таблицях 2-10A та 10B або SEQ ID NO: 2, 52, 101 - 499 і 545 - 547 або часткових послідовностях ITR, показаних на Фіг. 26A - 26B. У деяких варіантах втілення вектори зкДНК не мають ITR, який включає будь-яку послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 500 - 529.

У деяких варіантах втілення вектор зкДНК може включати ITR з модифікацією в ITR, яка відповідає будь-якій з модифікацій у послідовностях ITR або часткових послідовностях ITR, показаних авторами у будь-яких одній або декількох Таблицях 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10A та 10B.

Як типовий приклад в даному описі представлений ДНК-вектор із закритими кінцями, який включає промотор, функціонально зв'язаний з трансгеном, де зкДНК є позбавленою капсидних білків й є: (а) утвореною із зкДНК-плазміди (наприклад, див. Приклади 1 - 2 та/або ФІГУРИ 1A - B), що кодує мутований правосторонній ITR AAV2, що має таку саму кількість внутрішньомолекулярно дуплексованих пар основ, що і SEQ ID NO:2, або мутований лівосторонній ITR AAV2, що має таку саму кількість внутрішньомолекулярно дуплексованих пар основ, що і SEQ ID NO: 51, в його шпильковій вторинній конфігурації (в оптимальному варіанті за виключенням делеції у будь-якій кінцевій петлі AAA або TTT в цій конфігурації у порівнянні з цими контрольними послідовностями), й (б) ідентифікованою як зкДНК із застосуванням аналізу для ідентифікації зкДНК шляхом електрофорезу на агарозному гелі у природних гелевих і денатуруючих умовах у Прикладі 1. Приклади таких модифікованих послідовностей ITR представлені авторами у Таблицях 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10A та 10B.

Описана авторами технологія також стосується вектора зкДНК, який може доставляти та кодувати один або декілька трансгенів у клітині-мішені, наприклад, при якій вектор зкДНК включає мультицистронну послідовність, або трансген і його природне геномне оточення (наприклад, трансген, інтрони й ендегенні нетрансльовані ділянки) разом є включеними у вектор зкДНК. Трансгени можуть бути кодуєчими білки транскриптами, некодуєчими транскриптами, або і тими, й іншими. Вектор зкДНК може включати багато кодуєчих послідовностей та неканонічний сайт ініціації трансляції або більше одного промотора для експресії кодуєчих білки транскриптів, некодуєчих транскриптів, або і тих, й інших. Трансген може включати послідовність, яка кодує більше одного білка, або може бути послідовністю некодуєчого транскрипту. Експресійна касета може включати, наприклад, понад 4000 нуклеотидів, 5000 нуклеотидів, 10 000 нуклеотидів або 20 000 нуклеотидів, або 30 000 нуклеотидів, або 40 000 нуклеотидів або 50 000 нуклеотидів, або у будь-якому діапазоні приблизно від 4000 до 10 000 нуклеотидів або від 10 000 до 50 000 нуклеотидів, або більше за 50 000 нуклеотидів. Вектори зкДНК не мають обмежень розміру інкапсидованих AAV векторів, а отже, забезпечують можливість доставлення експресійної касети великого розміру для забезпечення ефективної експресії трансгенів. У деяких варіантах втілення вектор зкДНК є позбавленим характерного для прокаріотів метилування.

Експресійна касета також може включати внутрішню ділянку посадки рибосоми (IRES) й/або елемент 2A. Цис-регуляторні елементи включають, крім іншого, промотор, рибоперемикач, ізолятор, міг-індуцибельний елемент, посттранскрипційний регуляторний елемент, специфічний до типу тканини та клітини промотор й енхансер. У деяких варіантах втілення ITR може діяти як промотор для трансгена. У деяких варіантах втілення вектор зкДНК включає додаткові компоненти для регулювання експресії трансгена. Наприклад, додатковий регуляторний компонент може бути регулюючим перемикачем, як розкривається авторами, включаючи, крім інших, блокуючий перемикач, який може знищувати інфіковані клітини зкДНК у разі необхідності, й інші елементи, які піддаються індукції й/або

інгібуванню.

Описана авторами технологія також забезпечує нові способи доставлення та ефективної та вибіркової експресії одного або декількох трансгенів із застосуванням векторів зкДНК. Вектор зкДНК має здатність бути захопленим у клітини-хазяїни, а також бути перенесеним в ядро за відсутності AAV капсиду. Крім того, вектори зкДНК, описані авторами, не мають капсиду та, таким чином, запобігають імунній реакції, яка може виникати у відповідь на капсидовмісні вектори.

Аспекти винаходу стосуються способів одержання описаних авторами векторів зкДНК. Інші варіанти втілення стосуються вектора зкДНК, одержаного запропонованим авторами способом. В одному варіанті втілення безкапсидний невірусний ДНК-вектор (вектор зкДНК) одержують з плазмід (вказується авторами як "зкДНК-плазміда"), яка включає матрицю експресійного конструкту полінуклеотиду, яка включає у такому порядку: перший 5' інвертований кінцевий повтор (наприклад, ITR AAV); експресійну касету; та 3' ITR (наприклад, ITR AAV), де принаймні один із 5' і 3' ITR є модифікованим ITR, або якщо і 5', і 3' ITR є модифікованими, вони мають відмінні між ними модифікації та не мають однакою послідовність.

Описаний авторами вектор зкДНК одержують багатьма способами, які мають бути зрозумілими фахівцям у даній галузі з ознайомлення з цим описом. Наприклад, матрицю експресійного конструкту полінуклеотиду, який застосовують для генерації векторів зкДНК згідно з даним винаходом, може бути зкДНК-плазмідом (наприклад, див. Таблицю 12 або Фіг.10В), зкДНК-бакмідом та/або зкДНК-бакуловірусом. В одному варіанті втілення зкДНК-плазмід включав сайт клонування рестрикції (наприклад, SEQ ID NO: 7), функціонально розташований між ITR, у який може бути вставлена експресійна касета, яка включає наприклад, промотор, функціонально зв'язаний з трансгеном, наприклад, репортерний ген і/або терапевтичний ген. У деяких варіантах втілення вектори зкДНК утворюють з полінуклеотидної матриці (наприклад, зкДНК-плазмід, зкДНК-бакмід, зкДНК-бакуловірус), яка містить ITR, модифікований у порівнянні з відповідною фланкуючою послідовністю AAV3 ITR або ITR AAV2 дикого типу, де модифікація являє собою одну або декілька змін, до яких відносяться делеція, вставка та/або заміщення.

У допустимій клітині-хазяїні, наприклад, у присутності Rep, полінуклеотидну матрицю, що має принаймні один модифікований ITR, реплікують для утворення векторів зкДНК. Утворення вектора зкДНК включає два етапи: перший – ексцизія ("рятування") матриці з кістяка матриці (наприклад, зкДНК-плазмідного, зкДНК-бакмідного, зкДНК-бакуловірусного геному та т.ін.) через Rep-білки, і другий – Rep-опосередкована реплікація підданого ексцизії вектора зкДНК. Rep-білки та Rep-сайти зв'язування різних сіротипів AAV є добре відомими серед фахівців у даній галузі. Фахівцю у даній галузі стане зрозуміло, яким чином вибрати Rep-білок із сіротипу, який зв'язується з нуклеїновокислотною послідовністю та реплікує її, на основі принаймні одного функціонального ITR. Наприклад, якщо здатний до реплікації ITR відноситься до сіротипу AAVy 2, відповідний Rep має відноситися до сіротипу AAVy, який працює з цим сіротипом, наприклад, ITR AAV2 з AAV2 або AAV4 Rep, але не AAV5 Rep, який не має такої здатності. Після реплікації ковалентно закритий вектор зкДНК продовжує накопичуватись у допустимих клітинах, і вектор зкДНК в оптимальному варіанті є достатньо стійким у часі у присутності Rep-білка за стандартних умов реплікації, наприклад, для накопичення в кількості, яка становить принаймні 1 пг/клітину, в оптимальному варіанті принаймні 2 пг/клітину, у ще кращому варіанті – принаймні 3 пг/клітину, у ще кращому варіанті – принаймні 4 пг/клітину, у ще кращому варіанті – принаймні 5 пг/клітину.

Відповідно, один аспект винаходу стосується процесу, який включає етапи: а) інкубації популяції клітин-хазяїнів (наприклад, клітин комах), які містять матрицю експресійного конструкту полінуклеотиду (наприклад, зкДНК-плазмід, зкДНК-бакмід та/або зкДНК-бакуловірус), яка є позбавленою кодуючих послідовностей вірусного капсиду, у присутності Rep-білка в умовах, ефективних, і протягом часу, достатнього для викликання продукування вектора зкДНК у клітинах-хазяїнах, причому клітини-хазяїни не включають кодуючих послідовностей вірусного капсиду; і б) збирання та виділення вектора зкДНК з клітин-хазяїнів. Присутність Rep-білка викликає реплікацію векторного полінуклеотиду з модифікованим ITR для продукування вектора зкДНК у клітині-хазяїні. Однак вірусні частинки (наприклад, AAV віріони) експресуються. Таким чином, не існує зумовленого віріоном обмеження розмірів.

Присутність вектора зкДНК, виділеного з клітин-хазяїнів, може бути підтверджена шляхом розщеплення ДНК, виділеної з клітини-хазяїна, рестрикційним ферментом, який має єдину ділянку розпізнавання на векторі зкДНК, й аналізу матеріалу розщепленої ДНК на денатуруючому та неденатуруючому гелях для підтвердження наявності характерних смуг лінійної та безперервної ДНК у порівнянні з лінійною та переривчастою ДНК.

У деяких варіантах втілення даний винахід може бути визначений у будь-якому з представлених нижче абзаців:

Невірусний безкапсидний ДНК-вектор із ковалентно закритими кінцями (вектор зкДНК), причому вектор зкДНК включає принаймні одну гетерологічну нуклеотидну послідовність, функціонально розташовану між послідовностями асиметричних інвертованих кінцевих повторів (асиметричними ITR), причому принаймні один із асиметричних ITR включає функціональний сайт кінцевого розділення та сайт зв'язування Rep.

Вектор зкДНК за абзацом 1, який відрізняється тим, що вектор зкДНК при розщепленні

рестрикційним ферментом, який має єдину ділянку розпізнавання на векторі зкДНК, й аналізі шляхом електрофорезу на природному та денатуруючому гелі демонструє характерні смуги лінійної та безперервної ДНК у порівнянні з лінійними та переривчастими контрольними ДНК.

Вектор зкДНК за абзацами 1 або 2, який відрізняється тим, що одна або декілька асиметричних послідовностей ITR є взятими з вірусу, вибраного серед парвовірусу, депендовірусу й аденоасоційованого вірусу (AAV).

Вектор зкДНК за абзацом 3, який відрізняється тим, що асиметричні ITR є взятими з різних вірусних сіротипів.

Вектор зкДНК за абзацом 4, який відрізняється тим, що один або декілька асиметричних ITR є взятими з сіротипу AAV, вибраного серед AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 й AAV12.

Вектор зкДНК за будь-яким із абзаців 1 - 3, який відрізняється тим, що одна або декілька асиметричних послідовностей ITR є синтетичними.

Вектор зкДНК за будь-яким із абзаців 1 - 3 і 6, який відрізняється тим, що один або декілька з ITR не відносяться до ITR дикого типу.

Вектор зкДНК за будь-яким із абзаців 1 - 7, який відрізняється тим, що один або декілька з обох асиметричних ITR є модифікованими шляхом делеції, вставки та/або заміщення у принаймні одній з ділянок ITR, вибраних серед A, A', B, B', C, C', D і D'. У деяких варіантах втілення один або обидва з асиметричних ITR можуть мати делецію, вставку та/або заміщення у будь-якій комбінації ділянок B, B', C або C', як описано у Таблиці 1. У деяких варіантах втілення один або обидва з асиметричних ITR можуть мати делецію, вставку та/або заміщення у ділянці B і/або ділянці B' і/або ділянці C і/або ділянці C'. У деяких варіантах втілення один або обидва з асиметричних ITR можуть мати одну або декілька делецій, вставок і/або заміщень в ділянці A та/або ділянці A' та/або ділянці B і/або ділянці B' і/або ділянці C і/або ділянці C' і/або ділянці D і/або ділянці D'. Наприклад, у деяких варіантах втілення модифікований ITR може мати видалення або делецію всього конкретного плеча, наприклад, всього або частини плеча A-A' або всього або частини плеча B-B' або всього або частини плеча C-C', або, в альтернативному варіанті, видалення 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або більше пар основ, які утворюють стебло петлі, якщо кінцева петля, що кепує стебло (наприклад, єдине плече), ще є присутньою (наприклад, див. ITR-6). У деяких варіантах втілення модифікований ITR може включати видалення 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або більше пар основ з плеча B-B'. У деяких варіантах втілення модифікований ITR може включати видалення 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або більше пар основ з плеча C-C'. У деяких варіантах втілення модифікований ITR може включати видалення 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або більше пар основ з плеча C-C' і видалення 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або більше пар основ з плеча B-B'. Передбачається будь-яка комбінація видалення пар основ. У деяких варіантах втілення модифікований ITR не має плеча B-B'. У деяких варіантах втілення модифікований ITR не має плеча C-C'.

Вектор зкДНК за абзацом 8, який відрізняється тим, що делеція, вставка та/або заміщення в результаті призведе до делеції всієї або частини структури "петля на стеблі", яка зазвичай утворюється ділянками A, A', B, B' C або C'. Наприклад, у деяких варіантах втілення 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або більше комплементарних пар основ видаляються з кожної серед C-частини та C'-частини плеча C-C', таким чином, що плече C-C' є зрізаним, і/або 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або більше комплементарних пар основ видаляються з кожної серед B-частини та B'-частини плеча B-B', таким чином, що плече C-C' і/або B'-B є зрізаними. В альтернативних варіантах втілення 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або більше пар основ видаляються з C-частини плеча C-C', таким чином, що залишається лише C'-частина плеча. В альтернативних варіантах втілення 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або більше пар основ видаляються з C'-частини плеча C-C', таким чином, що залишається лише C-частина плеча. У деяких варіантах втілення 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або більше пар основ видаляються з B-частини плеча B-B', таким чином, що залишається лише B'-частина плеча. В альтернативних варіантах втілення 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або більше пар основ видаляються з B'-частини плеча B-B', таким чином, що залишається лише B-частина плеча. У деяких варіантах втілення будь-яка делеція в C-ділянці, C'-ділянці, B-ділянці або B'-ділянці все одно зберігає кінцеву петлю структури "петля на стеблі". У деяких варіантах втілення кінцева петля складається з принаймні трьох амінокислот. У деяких варіантах втілення кінцева петля плеча C-C' і/або плеча B-B' має принаймні три послідовні TTT або три послідовні AAA.

Вектор зкДНК за абзацом 8 або абзацом 9, який відрізняється тим, що один або обидва з асиметричних ITR є модифікованими шляхом делеції, вставки та/або заміщення, що в результаті призведе до делеції всієї або частини структури "петля на стеблі", яка зазвичай утворюється ділянками B і B'.

Вектор зкДНК за будь-яким із абзаців 8 - 10, який відрізняється тим, що один або обидва з асиметричних ITR є модифікованими шляхом делеції, вставки та/або заміщення, що в результаті призведе до делеції всієї або частини структури "петля на стеблі", яка зазвичай утворюється ділянками C і C'.

Вектор зкДНК за абзацом 10 або абзацом 11, який відрізняється тим, що один або обидва з асиметричних ITR є модифікованими шляхом делеції, вставки та/або заміщення, що в результаті призведе до делеції у частині структури "петля на стеблі", яка зазвичай утворюється ділянками B і B', і/або частині структури "петля на стеблі", яка зазвичай утворюється ділянками C і C'.

Вектор зкДНК за будь-яким із абзаців 1 - 12, який відрізняється тим, що один або обидва з

асиметричних ITR включають єдину структуру "петля на стеблі" в ділянці, яка зазвичай включає першу структуру "петля на стеблі", утворену ділянками В і В', і другу структуру "петля на стеблі", утворену ділянками С і С'.

Вектор зкДНК за абзацом 13, який відрізняється тим, що один або обидва з асиметричних ITR включає єдине стебло та дві петлі в ділянці, яка зазвичай включає першу структуру "петля на стеблі", утворену ділянками В і В', і другу структуру "петля на стеблі", утворену ділянками С і С'.

Вектор зкДНК за абзацом 13 або абзацом 14, який відрізняється тим, що один або обидва з асиметричних ITR включають єдине стебло й єдину петлю в ділянці, яка зазвичай включає першу структуру "петля на стеблі", утворену ділянками В і В', і другу структуру "петля на стеблі", утворену ділянками С і С'.

Вектор зкДНК за будь-яким із абзаців 1 - 15, який відрізняється тим, що принаймні один асиметричний ITR є модифікованим ITR AAV2, який включає нуклеотидну послідовність, вибрану з: ITR на ФІГУРАХ 26А або 26В, SEQ ID NO: 101 - 499 або 545 - 547, ITR, що має принаймні 95% ідентичність послідовності з ITR на ФІГУРАХ 26А або 26В, й ITR, що має принаймні 95% ідентичність послідовності з SEQ ID NO: 101 - 499 і 545 - 547.

Вектор зкДНК за будь-яким із абзаців 1 - 16, який відрізняється тим, що принаймні один асиметричний ITR є модифікованим ITR AAV2, який включає нуклеотидну послідовність SEQ ID NO 2, 52, 63 або 64 або нуклеотидну послідовність, яка має принаймні 95% ідентичність послідовності з SEQ ID NOS. 2, 52, 63 або 64.

Вектор зкДНК за будь-яким із абзаців 1 - 16, який відрізняється тим, що 5' ITR являє собою ITR AAV дикого типу, та 3' ITR включає послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 2, 64, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 469 - 483 і 546, і послідовності ITR, показані на Фіг. 26А, та послідовності, що мають принаймні 95% ідентичність послідовностей з будь-якою з вищезазначених послідовностей.

Вектор зкДНК за будь-яким із абзаців 1 - 16, який відрізняється тим, що 3' ITR являє собою ITR AAV дикого типу, та 5' ITR включає послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 52, 63, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 484 - 499, 545 і 547, і послідовності ITR, показані на Фіг. 26В, та послідовності, що мають принаймні 95% ідентичність послідовностей з будь-якою з вищезазначених послідовностей.

Вектор зкДНК за будь-яким із абзаців 1 - 16, який відрізняється тим, що 5' ITR включає послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 52, 63, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 484 - 499, 545 і 547, і послідовності ITR, показані на Фіг. 26В, та послідовності, що мають принаймні 95% ідентичність послідовностей з будь-якою з вищезазначених послідовностей; та 3' ITR включає послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 2, 64, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 469 - 483 і 546, і послідовності ITR, показані на Фіг. 26А, та послідовності, що мають принаймні 95% ідентичність послідовностей з будь-якою з вищезазначених послідовностей.

Вектор зкДНК за абзацом 1, який включає принаймні два асиметричні ITR, вибрані з: (а) SEQ ID NO: 1 і SEQ ID NO:52; і (б) SEQ ID NO: 2 і SEQ ID NO: 51.

Вектор зкДНК за абзацом 1, який включає пару асиметричних ITR, вибраних із: (а) SEQ ID NO:1 і SEQ ID NO:52; і (б) SEQ ID NO:2 і SEQ ID NO:51.

Вектор зкДНК за будь-яким із абзаців 1 - 20, який відрізняється тим, що один або обидва асиметричні ITR включають послідовність, відмінну від SEQ ID NO: 2, 52, 63 64, 113, 114 і 557.

Вектор зкДНК за будь-яким із абзаців 1 - 24, який відрізняється тим, що вся гетерологічна нуклеотидна послідовність або її частина перебуває під контролем принаймні одного регулюючого перемикача.

Вектор зкДНК за абзацом 24, який відрізняється тим, що принаймні один регулюючий перемикач є вибраним із будь-якого або комбінації регулюючих перемикачів, перелічених у Таблиці 11 або в розділі під назвою "Регулюючі перемикачі". Лише для прикладу, регулюючий перемикач служить для точного регулювання експресії гетерологічної нуклеотидної послідовності, наприклад, трансгена, й у деяких варіантах втілення може виконувати функцію біоізоляції вектора зкДНК. У деяких варіантах втілення регулюючий перемикач є перемикачем "УВІМКНЕННЯ/ВИМКНЕННЯ". Без прив'язування до будь-якої теорії, перемикач "УВІМКНЕННЯ/ВИМКНЕННЯ" призначається для запуску або припинення (тобто, перекриття) експресії гетерологічної нуклеотидної послідовності або трансгена, що експресується з вектора зкДНК у контрольований та регульований спосіб. У деяких варіантах втілення регулюючий перемикач є "блокуючим перемикачем", який може дати клітині, яка включає вектор зкДНК, команду на запрограмовану смерть відразу після активації перемикача. У деяких варіантах втілення регулюючий перемикач є вибраним серед: бінарного перемикача (наприклад, індукцйбельні промотори, кофактори або екзогенні агенти дерепресують транскрипцію), низькомолекулярного регулюючого перемикача (наприклад, лікарські засоби або проліки активують або припиняють транскрипцію), регулюючого перемикача типу "код доступу" (наприклад, має існувати комбінація умов для того, щоб відбулася експресія та/або пригнічення трансгена), регулюючого перемикача на основі нуклеїнової кислоти (наприклад, механізму на основі нуклеїнової кислоти для контролю експресії та/або пригнічення), посттрансляційного та/або посттранскрипційного регулюючого перемикача (наприклад, трансгенів, які експресуються елементами сигнальної відповіді (SRE) або

дестабілізуючими доменами (DD), які перешкоджають функціональним трансгенам, доки не відбудеться посттрансляційна модифікація) або блокуючого перемикача (наприклад, перемикача для викликання запрограмованої смерті клітин як засобу остаточного усунення включеного вектора зкДНК з системи суб'єкта).

Вектор зкДНК за будь-яким із абзаців 1 - 25, який відрізняється тим, що вектор знаходиться у наноосії.

Вектор зкДНК за абзацом 26, який відрізняється тим, що наноосія включає ліпідну наночастинку (LNP).

Невірусний безкапсидний ДНК-вектор із ковалентно закритими кінцями (вектор зкДНК) за будь-яким із абзаців 1 - 25, який одержують від процесу, що включає етапи: (а) інкубації популяції клітин комах, які містять експресійний конструкт зкДНК у присутності принаймні одного Rep-білка, причому експресійний конструкт зкДНК кодує вектор зкДНК в умовах, ефективних, і протягом часу, достатнього для викликання продукування вектора зкДНК у клітинах комах; і (б) виділення вектора зкДНК з клітин комах.

Вектор зкДНК за абзацом 28, який відрізняється тим, що експресійний конструкт зкДНК є вибраним серед плазміди зкДНК, бакміди зкДНК і бакуловірусу зкДНК.

Вектор зкДНК за абзацом 28 або абзацом 29, який відрізняється тим, що клітина комах експресує принаймні один Rep-білок.

Вектор зкДНК за абзацом 30, який відрізняється тим, що принаймні один Rep-білок є взятим із вірусу, вибраного серед парвовірусу, депендовірусу й аденоасоційованого вірусу (AAV).

Вектор зкДНК за абзацом 31, який відрізняється тим, що принаймні один Rep-білок є взятим із серотипу AAV, вибраного серед AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 й AAV12.

Експресійний конструкт зкДНК, який кодує вектор зкДНК за будь-яким із абзаців 1-25.

Експресійний конструкт зкДНК за абзацом 33, який являє собою плазмиду зкДНК, бакмиду зкДНК або бакуловірус зкДНК.

Клітина-хазяїн, яка включає експресійний конструкт зкДНК за абзацом 33 або абзацом 34.

Клітина-хазяїн за абзацом 35, яка експресує принаймні один Rep-білок.

Клітина-хазяїн за абзацом 36, яка відрізняється тим, що принаймні один Rep-білок є взятим із вірусу, вибраного серед парвовірусу, депендовірусу й аденоасоційованого вірусу (AAV).

Клітина-хазяїн за абзацом 37, яка відрізняється тим, що принаймні один Rep-білок є взятим із серотипу AAV, вибраного серед AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 й AAV12.

Клітина-хазяїн за будь-яким із абзаців 35 – 38, яка є клітиною комах.

Клітина-хазяїн за абзацом 39, яка є клітиною Sf9.

Спосіб одержання вектора зкДНК, який включає: (а) інкубування клітини-хазяїна за будь-яким із абзаців 35 - 40 в умовах, ефективних, і протягом часу, достатнього для викликання продукування вектора зкДНК; і (б) виділення зкДНК з клітин-хазяїнів.

Спосіб лікування, профілактики, послаблення, контролювання або діагностування хвороби або порушення у суб'єкта, причому спосіб включає: введення суб'єкту, що має в цьому потребу, композиції, яка включає вектор зкДНК за будь-яким із абзаців 1 - 25, причому принаймні одну гетерологічну нуклеотидну послідовність вибирають для лікування, профілактики, послаблення, діагностування або контролювання хвороби або порушення.

Спосіб за абзацом 42, який відрізняється тим, що принаймні одна гетерологічна нуклеотидна послідовність, будучи транскрибованою або трансльованою, коректує відхилення в кількості ендogenous білка у суб'єкта.

Спосіб за абзацом 42, який відрізняється тим, що принаймні одна гетерологічна нуклеотидна послідовність, будучи транскрибованою або трансльованою, коректує відхилення функції або активності ендogenous білка або шляху у суб'єкта.

Спосіб за будь-яким із абзаців 42 - 44, який відрізняється тим, що принаймні одна гетерологічна нуклеотидна послідовність кодує або включає молекулу нуклеотиду, вибрану серед РНКі, міРНК, мікроРНК, нкРНК й антисмислового оліго- або полінуклеотиду.

Спосіб за будь-яким із абзаців 42 - 44, який відрізняється тим, що принаймні одна гетерологічна нуклеотидна послідовність кодує білок.

Спосіб за абзацом 42, який відрізняється тим, що принаймні одна гетерологічна нуклеотидна послідовність кодує маркерний білок (наприклад, репортерний білок).

Спосіб за будь-яким із абзаців 42 - 46, який відрізняється тим, що принаймні одна гетерологічна нуклеотидна послідовність кодує агоніст або антагоніст ендogenous білка або шлях, асоційований з хворобою або порушенням.

Спосіб за будь-яким із абзаців 42 - 46, який відрізняється тим, що принаймні одна гетерологічна нуклеотидна послідовність кодує антитіло.

Спосіб за будь-яким із абзаців 42 - 49, який відрізняється тим, що хвороба або порушення є вибраними серед: метаболічної хвороби або порушення, хвороби або порушення ЦНС, очної хвороби або порушення, хвороби або порушення крові, печінкової хвороби або порушення, імунної хвороби або порушення, інфекційної хвороби, м'язової хвороби або порушення, раку та хвороби або

порушення на основі відхилення рівня та/або функції генного продукту.

Спосіб за абзацом 50, який відрізняється тим, що метаболічна хвороба або порушення є вибраними серед діабету, хвороби лізосомального накопичення, мукополісахаридної хвороби, хвороби або порушення циклу обміну сечовини та хвороби або порушення накопичення глікогену.

Спосіб за абзацом 51, який відрізняється тим, що хвороба лізосомального накопичення є вибраною серед хвороби Гоше, генералізованого глікогенезу, метахроматичної лейкодистрофії (MLD), фенілкетонурії (PKU) та хвороби Фабрі.

Спосіб за абзацом 51, який відрізняється тим, що хвороба або порушення циклу обміну сечовини є дефіцитом орнітинтранскарбамілази (ОТС).

Спосіб за абзацом 51, який відрізняється тим, що мукополісахаридна хвороба є вибраною серед синдрому Слая, синдрому Гурлера, синдрому Шейє, синдрому Гурлера-Шейє, синдрому Гунтера, синдрому Санфіліппо, синдрому Моркіо та синдрому Марото-Ламі.

Спосіб за абзацом 50, який відрізняється тим, що хвороба або порушення ЦНС є вибраними серед хвороби Альцгеймера, хвороби Паркінсона, хвороби Хантингтона, хвороби Канавана, хвороби Лея, хвороби Рефсума, синдрому Туретта, первинного латерального склерозу, аміотрофічного латерального склерозу, прогресуючої м'язової атрофії, хвороби Піка, м'язової дистрофії, розсіяного склерозу, важкої міастенії, хвороби Бінсвангера, травми через пошкодження спинного мозку або голови, хвороби Тея-Сакса, хвороби Льоша-Найхана, епілепсії, церебральних інфарктів, психіатричних порушень, шизофренії, лікарської залежності, неврозів, психозу, деменції, параної, синдрому дефіциту уваги, порушень сну, больових синдромів, порушень харчування та ваги і раку та пухлин ЦНС.

Спосіб за абзацом 50, який відрізняється тим, що очна хвороба або порушення є вибраними серед офтальмологічних порушень з ураженням сітківки, заднього шляху та/або зорового нерва.

Спосіб за абзацом 55, який відрізняється тим, що офтальмологічне порушення з ураженням сітківки, заднього шляху та/або зорового нерва є вибраним серед діабетичної ретинопатії, дегенерації жовтої плями, включаючи вікову дегенерацію жовтої плями, географічну атрофію та судинну або "вологу" дегенерацію жовтої плями, глаукому, увеїт, пігментну дегенерацію сітківки, хворобу Штаргардта, уроджений амавроз Лебера (LCA), синдром Ашера, еластичну псевдоксантому (PXE), х-зчеплений пігментний ретиніт (XLRP), х-зчеплений ретиношизис (XLRs), хороїдеремію, спадкову оптичну нейропатію Лебера (LHON), ахроматопсію, колбочко-паличкову дистрофію, ендотеліальну дистрофію рогівки Фукса, діабетичний набряк жовтої плями та рак і пухлини очей.

Спосіб за абзацом 50, який відрізняється тим, що хвороба або порушення крові є вибраними серед гемофілії А, гемофілії В, таласемії, анемії та раку крові.

Спосіб за абзацом 50, який відрізняється тим, що хвороба або порушення печінки є вибраними серед прогресуючого сімейного внутрішньопечінкового холестазу (PFIC) та раку і пухлин печінки.

Спосіб за абзацом 42, який відрізняється тим, що хвороба або порушення є муковісцидозом.

Спосіб за абзацами 42 - 60, який відрізняється тим, що вектор зкДНК вводять в комбінації з фармацевтично прийнятним носієм.

Спосіб доставлення терапевтичного білка суб'єкту, причому спосіб включає введення суб'єкту композиції, яка включає вектор зкДНК за будь-яким із абзаців 1 - 25, причому принаймні одна гетерологічна нуклеотидна послідовність кодує терапевтичний білок.

Спосіб за абзацом 62, який відрізняється тим, що терапевтичний білок є терапевтичним антитілом.

Спосіб за абзацом 62, який відрізняється тим, що терапевтичний білок є вибраним серед ферменту, еритропоєтину, ангіостатину, ендостатину, супероксиддисмутази, глобіну, ліптину, каталази, тирозингідроксилази, цитокіну, регулятора трансмембранної провідності при муковісцидозі (CFTR), пептидного фактора росту та гормону.

Комплект, який включає вектор зкДНК за будь-яким із абзаців 1 - 25 і наноносій, упаковані в контейнер з вкладкою у пакеті.

Комплект для продукування вектора зкДНК, причому комплект включає експресійний конструкт, який включає принаймні один сайт рестрикції для вставлення принаймні однієї гетерологічної нуклеотидної послідовності, або регулюючий перемикач, або і те, й інше, причому принаймні один сайт рестрикції функціонально розташовується між послідовностями асиметричних інвертованих кінцевих повторів (асиметричними ITR), причому принаймні один із асиметричних ITR включає функціональний сайт кінцевого розділення та сайт зв'язування Rep.

Комплект за абзацом 66, який є придатним для продукування вектора зкДНК за будь-яким із абзаців 1 - 25.

Комплект за абзацом 66 або абзацом 67, що також включає популяцію клітин комах, яка є позбавленою кодуючих послідовностей вірусного капсиду, що у присутності Rep-білка може викликати продукування вектора зкДНК.

Комплект за будь-яким із абзаців 66 - 68, який також включає вектор, що включає полінуклеотидну послідовність, яка кодує принаймні один Rep-білок, причому вектор є підходящим для експресії принаймні одного Rep-білка у клітині комах.

У деяких варіантах втілення, один аспект описаної авторами технології стосується невірусного безкапсидного ДНК-вектора з ковалентно закритими кінцями (вектор зкДНК), причому вектор зкДНК включає принаймні одну гетерологічну нуклеотидну послідовність, функціонально розташовану між

послідовностями асиметричних інвертованих кінцевих повторів (асиметричними ITR), причому принаймні один із асиметричних ITR включає функціональний сайт кінцевого розділення та сайт зв'язування Rep, і гетерологічна нуклеїновокислотна послідовність необов'язково кодує трансген, причому вектор не є вірусним капсидом.

Ці й інші аспекти винаходу детальніше описуються далі.

Опис фігур

Фіг. 1A показує типову структуру вектора зкДНК. У цьому варіанті втілення типовий вектор зкДНК включає експресійну касету, яка містить CAG промотор, WPRE та BGHrA. Відкриту рамку зчитування (ORF), яка кодує трансген люциферази, вставляють в сайт клонування (R3/R4) між CAG промотором і WPRE. По боках експресійної касети розташовуються два інвертовані кінцеві повтори (ITR) – ITR AAV2 дикого типу на висхідному (5'-кінці) та модифікований ITR на низхідному (3'-кінці) експресійної касети, і, таким чином два ITR, розташовані по боках експресійної касети, є асиметричними відносно один одного.

Фіг. 1B показує типову структуру вектора зкДНК з експресійною касетою, яка містить CAG промотор, WPRE та BGHrA. Відкриту рамку зчитування (ORF), яка кодує трансген люциферази, вставляють в сайт клонування між CAG промотором і WPRE. По боках експресійної касети розташовуються два інвертовані кінцеві повтори (ITR) – модифікований ITR на висхідному (5'-кінці) й ITR дикого типу на низхідному (3'-кінці) експресійної касети.

Фіг. 1C показує типову структуру вектора зкДНК з експресійною касетою, яка містить енхансер/промотор, відкриту рамку зчитування (ORF) для вставки трансгена, посттранскрипційний елемент (WPRE) і сигнал поліА. Відкрита рамка зчитування (ORF) дозволяє вставляти трансген в сайт клонування між CAG промотором і WPRE. По боках експресійної касети розташовуються два інвертовані кінцеві повтори (ITR), які є асиметричними відносно один одного; модифікований ITR на висхідному (5'-кінці) та модифікований ITR на низхідному (3'-кінці) експресійної касети, причому 5' ITR і 3' ITR обидва є модифікованими ITR, але мають різні модифікації (тобто, вони не мають однакових модифікацій).

Фіг. 2A представляє Т-подібну структуру "петля на стеблі" лівого ITR AAV2 дикого типу (SEQ ID NO: 538) з ідентифікацією плеча A-A', плеча B-B', плеча C-C', двох сайтів зв'язування Rep (RBE та RBE'), а також показує сайт кінцевого розділення (trs). RBE містить групу з 4 дуплексних тетрамерів, які вважаються такими, що взаємодіють з Rep 78 або Rep 68. Крім того, RBE' також вважається таким, що взаємодіє з Rep комплексом, зібраним на ITR дикого типу або мутантному ITR в конструкті. Ділянки D і D' містять сайти зв'язування фактора транскрипції й іншу консервативну структуру. Фіг. 2B показує запропоноване Rep-каталізоване нікування та лігування в лівому ITR дикого типу (SEQ ID NO: 539), включаючи Т-подібну структуру "петля на стеблі" лівого ITR AAV2 дикого типу з ідентифікацією плеча A-A', плеча B-B', плеча C-C', двох сайтів зв'язування Rep (RBE та RBE'), а також показує сайт кінцевого розділення (trs) та ділянку D і D', яка включає декілька сайтів зв'язування фактора транскрипції й іншу консервативну структуру.

Фіг. 3A представляє первинну структуру (полінуклеотидну послідовність) (ліву) та вторинну структуру (праву) RBE-вмісних частин плеча A-A' та плеча C-C' і B-B' лівого ITR AAV2 дикого типу (SEQ ID NO: 540). Фіг. 3B показує типову послідовність мутантного ITR (також вказується як модифікований ITR) для лівого ITR. Показано первинну структуру (ліву) та прогнозовану вторинну структуру (праву) частини RBE плеча A-A' та плеча C і плеча B-B' типового мутантного лівого ITR (ITR-1, лівий) (SEQ ID NO: 113). Фіг. 3C показує первинну структуру (ліву) та вторинну структуру (праву) RBE-вмісної частини петлі A-A' та плеча B-B' і плеча C-C' правого ITR AAV2 дикого типу (SEQ ID NO: 541). Фіг. 3D показує типовий правий модифікований ITR. Показано первинну структуру (ліву) та прогнозовану вторинну структуру (праву) RBE-вмісної частини плеча A-A', плеча B-B' та плеча C типового мутантного правого ITR (ITR-1, правий) (SEQ ID NO: 114). Може бути застосована будь-яка комбінація лівого та правого ITR (наприклад, ITR AAV2 або іншого вірусного сіротипу або синтетичних ITR), за умови, що лівий ITR є асиметричним або відмінним від правого ITR. Кожна з представлених на ФІГУРАХ 3A - 3D полінуклеотидних послідовностей стосується послідовності, яку застосовують у геном плазміді або бакміді/бакуловірусу, який застосовують для продукування зкДНК, як описується авторами. Також на кожній з ФІГУР 3A - 3D включено відповідні вторинні структури зкДНК, виведені з конфігурацій вектора зкДНК у геномі плазміді або бакміді/бакуловірусу та прогнозовані значення вільної енергії Гіббса.

Фіг. 4A є схемою, яка пояснює висхідний процес одержання інфікованих бакуловірусом клітин комах (ВІІС), які застосовують для продукування зкДНК у процесі, який схематично описується на Фіг. 4B. Фіг. 4B є схемою типового способу продукування зкДНК, а Фіг. 4C пояснює біохімічний спосіб і процес підтвердження продукування вектора зкДНК. Фіг. 4D і Фіг. 4E є схематичними ілюстраціями, які описують процес розпізнавання присутності зкДНК у ДНК, зібраний з клітинної маси, отриманої під час процесу продукування зкДНК на Фіг. 4B. Фіг. 4E показує ДНК, яка має переривчасту структуру. ЗкДНК може бути розрізана рестрикційною ендонуклеазою, що має єдину ділянку розпізнавання на векторі зкДНК, і генерують два фрагменти ДНК з різними розмірами (1 т.п.н. і 2 т.п.н.) у нейтральних і денатуруючих умовах. Фіг. 4E також показує зкДНК, що має лінійну та безперервну структуру. Вектор зкДНК розрізають рестрикційною ендонуклеазою та генерують два фрагменти ДНК, які мігрують як 1 т.п.н. і 2 т.п.н. в нейтральних умовах, але в денатуруючих умовах ланцюги залишаються з'єднаними й

утворюють окремі ланцюги, які мігрують як 2 т.п.н. і 4 т.п.н. Фіг. 4D схематично показує очікувані смуги для типової зкДНК, або залишеної нерозрізаною, або розщепленої рестрикційною ендонуклеазою, а потім підданої електрофорезу на природному гелі або денатуруючому гелі. Крайня ліва діаграма стосується природного гелю та демонструє багато смуг, вказуючи на те, що в її дуплексній та нерозрізаній формі зкДНК існує принаймні у мономерному та димерному станах, є видимою як швидко мігруючий малий мономер і повільно мігруючий димер, який за розміром є вдвічі більшим за мономер. Друга зліва діаграма показує, що у випадку розрізання зкДНК рестрикційною ендонуклеазою первісні смуги зникають, і з'являються швидко мігруючі (наприклад, малі) смуги, які відповідають очікуваним розмірам фрагментів, які залишаються після розщеплення. В денатуруючих умовах первісна дуплексна ДНК є одноланцюговою та мігрує як різновид, удвічі більший за той, що спостерігається на природному гелі, оскільки комплементарні ланцюги є ковалентно зв'язаними. Таким чином, на другій діаграмі справа розщеплена зкДНК демонструє розподіл смуг, подібний до того, що спостерігається на природному гелі, але смуги мігрують як фрагменти вдвічі більшого розміру у порівнянні з їхніми відповідниками на природному гелі. Крайня справа діаграма демонструє, що нерозрізана зкДНК в денатуруючих умовах мігрує як одноланцюгове відкрите кільце, та, таким чином, смуги, що спостерігаються, є вдвічі більшими за розміром за ті, що спостерігаються за природних умов, коли кільце не є відкритим. На цій фігурі "т.п.н." вжито для вказування відносного розміру молекул нуклеотидів на основі, залежно від контексту, довжини нуклеотидного ланцюга (наприклад, для одноланцюгових молекул, які спостерігаються в денатуруючих умовах) або кількості пар основ (наприклад, для дволанцюгових молекул, які спостерігаються у природних умовах).

Фіг. 5 представляє типову картину прикладів прогону на денатуруючому гелі векторів зкДНК з (+) або без (-) розщеплення ендонуклеазами (EcoRI для конструкту 1 і 2 зкДНК; BamHI для конструкту 3 і 4 зкДНК; SpeI для конструкту 5 і 6 зкДНК; і XhoI для конструкту 7 і 8 зкДНК). Розміри смуг, позначені зірочкою, було визначено та вказано у нижній частині фігури.

Фіг. 6А показує результати аналізу *in vitro* експресії білка з вимірюванням активності люцифери (вісь у, RQ (Luc)) в клітинах HEK293 через 48 годин після трансфекції 400 нг (чорний), 200 нг (сірий) або 100 нг (білий) конструктів, розпізнаних на осі x (конструкт-1, конструкт-3, конструкт-5, конструкт-7 (Таблиця 12)). Фіг. 6В показує активність люцифери (вісь у, RQ (Luc)) виміряну в клітинах HEK293 через 48 годин після трансфекції 400 нг (чорний), 200 нг (сірий) або 100 нг (білий) конструктів, розпізнаних на осі x (конструкт-2, конструкт-4, конструкт-6, конструкт-8) (Таблиця 12). Також представлені показники активності люцифери, виміряні в клітинах HEK293, оброблених Eugene без будь-яких плазмід ("Eugene"), або в необроблених клітинах HEK293 ("Необроблені").

Фіг. 7А показує життєздатність клітин HEK293 (вісь у) через 48 годин після трансфекції 400 нг (чорний), 200 нг (сірий) або 100 нг (білий) конструктів, розпізнаних на осі x (конструкт-1, конструкт-3, конструкт-5, конструкт-7). Фіг. 7В показує життєздатність клітин HEK293 (вісь у) через 48 годин після трансфекції 400 нг (чорний), 200 нг (сірий) або 100 нг (білий) конструктів, розпізнаних на осі x (конструкт-2, конструкт-4, конструкт-6, конструкт-8).

Фіг. 8А представляє типову Rep-бакмід у плазміді pFBDSLRS, яка включає нуклеїновокислотні послідовності для Rep-білків Rep52 і Rep78. Ця типова Rep-бакміда включає: промоторний фрагмент IE1 (SEQ ID NO:66); нуклеотидну послідовність Rep78, яка включає послідовність Козака (SEQ ID NO:67), послідовність промотора поліедру для нуклеотидної послідовності Rep52 (SEQ ID NO:68) і Rep58, починаючи з послідовності Козака gccgccacc (SEQ ID NO:69). Фіг. 8В є схематичним зображенням типової плазмиди-1 зкДНК, з wt-L ITR, CAG промотором, трансгеном люцифери, WPRE та послідовністю поліаденілування і mod-R ITR.

Фіг. 9А показує прогнозовану структуру з найменшою енергією RBE-вмісної частини плеча A-A' та плеча C-C' типового модифікованого лівого ITR ("ITR-2 (лівий)" SEQ ID NO: 101), і Фіг. 9В показує прогнозовану структуру з найменшою енергією RBE-вмісної частини плеча A-A' та плеча C-C' типового модифікованого правого ITR ("ITR-2 (правий)" SEQ ID NO: 102). Вони прогнозовано мають утворювати структуру з одним плечем (C-C') й однією непарною петлею. Їхні значення вільної енергії Гіббса при розгортанні прогнозуються на рівні -72,6 ккал/моль.

Фіг. 10А показує прогнозовану структуру з найменшою енергією RBE-вмісної частини плеча A-A' та плеча B-B' типового модифікованого лівого ITR ("ITR-3 (лівий)" SEQ ID NO: 103), і Фіг. 10В показує прогнозовану структуру з найменшою енергією RBE-вмісної частини плеча A-A' та плеча B-B' типового модифікованого правого ITR ("ITR-3 (правий)" SEQ ID NO: 104). Вони прогнозовано мають утворювати структуру з одним плечем (B-B') й однією непарною петлею. Їхні значення вільної енергії Гіббса при розгортанні прогнозуються на рівні -74,8 ккал/моль.

Фіг. 11А показує прогнозовану структуру з найменшою енергією RBE-вмісної частини плеча A-A' та плеча C-C' типового модифікованого лівого ITR ("ITR-4 (лівий)" SEQ ID NO: 105), і Фіг. 11В показує прогнозовану структуру з найменшою енергією RBE-вмісної частини плеча A-A' та плеча C-C' типового модифікованого правого ITR ("ITR-4 (правий)" SEQ ID NO: 106). Вони прогнозовано мають утворювати структуру з одним плечем (C-C') й однією непарною петлею. Їхні значення вільної енергії Гіббса при розгортанні прогнозуються на рівні -76,9 ккал/моль.

Фіг. 12А показує прогнозовану структуру з найменшою енергією RBE-вмісної частини плеча A-A' та частин C-C' і B-B' типового модифікованого лівого ITR, з показом комплементарного спарювання основ частин C-B' і C'-B ("ITR-10 (лівий)" SEQ ID NO: 107), і Фіг. 12В показує прогнозовану структуру з

Фіг. 13A показує прогнозовану структуру з найменшою енергією RBE-вмісної частини плеча A-A' та частин C-C' і B-B' типового модифікованого лівого ITR ("ITR-17 (лівий)" SEQ ID NO: 109), і Фіг. 13B показує прогнозовану структуру з найменшою енергією RBE-вмісної частини плеча A-A' та частин C-C' і B-B' типового модифікованого правого ITR ("ITR-17 (правий)" SEQ ID NO: 110). І ITR-17 (лівий), й ITR-17 (правий) прогнозовано утворюють структуру з одним плечем (B-B') й однією непарною петлею. Їхні значення вільної енергії Гіббса при розгортанні прогнозуються на рівні $-73,3$ ккал/моль.

Фіг. 15А показує прогнозовану структуру з найменшою енергією RBE-вмісної частини плеча A-A' та плеча C і плеча B-B' типового модифікованого лівого ITR ("ITR-1 (лівий)" SEQ ID NO: 113), і Фіг. 15В показує прогнозовану структуру з найменшою енергією RBE-вмісної частини плеча A-A' та плеча C і плеча B-B' типового модифікованого правого ITR ("ITR-1 (правий)" SEQ ID NO: 114). І ITR-1 (лівий), й ITR-1 (правий) прогнозовано утворюють структуру з двома плечима, одне з яких є зрізаним. Їхні значення вільної енергії Гіббса при розгортанні прогнозуються на рівні $-74,7$ ккал/моль.

Фіг. 17A показує прогнозовану структуру з найменшою енергією RBE-вмісної частини плеча A-A' та плеча C-C' і плеча B-B' типового модифікованого лівого ITR ("ITR-7 (лівий)" SEQ ID NO: 117) і Фіг. 17B показує прогнозовану структуру з найменшою енергією RBE-вмісної частини плеча A-A' та плеча B-B' і плеча C-C' типового модифікованого правого ITR ("ITR-7 (правий)" SEQ ID NO: 118). І ITR-17 (лівий), й ITR-17 (правий) прогнозовано утворюють структуру з двома плечима, одне з яких (наприклад, плече B-B') є зрізаним. Їхні значення вільної енергії Гіббса при розгортанні прогнозуються на рівні $-89,6$ ккал/моль.

Фіг. 19A показує прогнозовану структуру з найменшою енергією RBE-вмісної частини плеча A-A' та плеча C-C' і плеча B-B' типового модифікованого лівого ITR ("ITR-9 (лівий)" SEQ ID NO: 121), і Фіг. 19B показує прогнозовану структуру з найменшою енергією RBE-вмісної частини плеча A-A' та плеча B-B' і плеча C-C' типового модифікованого правого ITR ("ITR-9 (правий)" SEQ ID NO: 122). І ITR-9 (лівий), й ITR-9 (правий) прогнозовано утворюють структуру з двома плечима, одне з яких є зрізаним. Їхні значення вільної енергії Гіббса при розгортанні прогнозуються на рівні -85.0 ккал/моль.

Фіг. 20А показує прогнозовану структуру з найменшою енергією RBE-вмісної частини плеча А-А' та плеча С-С' і плеча В-В' типового модифікованого лівого ITR ("ITR-11 (лівий)" SEQ ID NO: 123), і Фіг. 20В показує прогнозовану структуру з найменшою енергією RBE-вмісної частини плеча А-А' та плеча В-В' і плеча С-С' типового модифікованого правого ITR ("ITR-11 (правий)" SEQ ID NO: 124). І ITR-11 (лівий), й ITR-11 (правий) прогнозовано утворюють структуру з двома плечима, одне з яких є зрізаним. Їхні значення вільної енергії Гіббса при розгортанні прогнозуються на рівні $-89,5$ ккал/моль.

Фіг. 21А показує прогнозовану структуру з найменшою енергією RBE-вмісної частини плеча А-А' та плеча С-С' і плеча В-В' типового модифікованого лівого ITR ("ITR-12 (лівий)" SEQ ID NO: 125), і Фіг. 21В показує прогнозовану структуру з найменшою енергією RBE-вмісної частини плеча А-А' та плеча В-В' і плеча С-С' типового модифікованого правого ITR ("ITR-12 (правий)" SEQ ID NO: 126). І ITR-12 (лівий), й ITR-12 (правий) прогнозовано утворюють структуру з двома плечима, одне з яких є зрізаним. Їхні значення вільної енергії Гіббса при розгортанні прогнозуються на рівні -86,2 ккал/моль.

Фіг. 22A показує прогнозовану структуру з найменшою енергією RBE-вмісної частини плеча A-A' та плеча C-C' і плеча B-B' типового модифікованого лівого ITR ("ITR-13 (лівий)" SEQ ID NO: 127), і Фіг. 22B показує прогнозовану структуру з найменшою енергією RBE-вмісної частини плеча A-A' та плеча B-B' і плеча C-C' типового модифікованого правого ITR ("ITR-13 (правий)" SEQ ID NO: 128). І ITR-13 (лівий), й ITR-13 (правий) прогнозовано утворюють структуру з двома плечима, одне з яких (наприклад, плече C-C') є зрізаним. Їхні значення вільної енергії Гіббса при розгортанні прогнозуються

на рівні $-82,9$ ккал/моль.

Фіг. 23А показує прогнозовану структуру з найменшою енергією RBE-вмісної частини плеча A-A' та плеча C-C' і плеча B-B' типового модифікованого лівого ITR ("ITR-14 (лівий)" SEQ ID NO: 129), і Фіг. 23В показує прогнозовану структуру з найменшою енергією RBE-вмісної частини плеча A-A' та плеча B-B' і плеча C-C' типового модифікованого правого ITR ("ITR-14 (правий)" SEQ ID NO: 130). І ITR-14 (лівий), й ITR-14 (правий) прогнозовано утворюють структуру з двома плечима, одне з яких (наприклад, плече C-C') є зрізаним. Їхні значення вільної енергії Гіббса при розгортанні прогножуються на рівні $-80,5$ ккал/моль.

Фіг. 24А показує прогнозовану структуру з найменшою енергією RBE-вмісної частини плеча A-A' та плеча C-C' і плеча B-C' типового модифікованого лівого ITR ("ITR-15 (лівий)" SEQ ID NO: 131), і Фіг. 24В показує прогнозовану структуру з найменшою енергією RBE-вмісної частини плеча A-A' та плеча B-B' і плеча C-C' типового модифікованого правого ITR ("ITR-15 (правий)" SEQ ID NO: 132). І ITR-15 (лівий), й ITR-15 (правий) прогнозовано утворюють структуру з двома плечима, одне з яких (наприклад, плече C-C') є зрізаним. Їхні значення вільної енергії Гіббса при розгортанні прогножуються на рівні $-77,2$ ккал/моль.

Фіг. 25А показує прогнозовану структуру з найменшою енергією RBE-вмісної частини плеча A-A' та плеча C-C' і плеча B-C' типового модифікованого лівого ITR ("ITR-16 (лівий)" SEQ ID NO: 133), і Фіг. 25В показує прогнозовану структуру з найменшою енергією RBE-вмісної частини плеча A-A' та плеча B-B' і плеча C-C' типового модифікованого правого ITR ("ITR-16 (правий)" SEQ ID NO: 134). І ITR-16 (лівий), й ITR-16 (правий) прогнозовано утворюють структуру з двома плечима, одне з яких (наприклад, плече C-C') є зрізаним. Їхні значення вільної енергії Гіббса при розгортанні прогножуються на рівні $-73,9$ ккал/моль.

Фіг. 26А показує прогнозовані структури RBE-вмісної частини плеча A-A' та модифікованого плеча B-B' і/або модифікованого плеча C-C' типових модифікованих правих ITR, перелічених у Таблиці 10А. Фіг. 26В показує прогнозовані структури RBE-вмісної частини плеча A-A' та модифікованого плеча C-C' і/або модифікованого плеча B-B' типових модифікованих лівих ITR, перелічених у Таблиці 10В. Показані структури є прогнозованою структурою з найменшою вільною енергією. Умовні кольори: червоний = $>99\%$ імовірності; оранжевий = $99\% - 95\%$ імовірності; бежевий = $95 - 90\%$ імовірності; темно-зелений = $90\% - 80\%$; світло-зелений = $80\% - 70\%$; блакитний = $70\% - 60\%$; синій $60\% - 50\%$, і рожевий = $< 50\%$.

Фіг. 27 показує активність люциферази клітин комах Sf9 GlycoVac, трансфікованих вибраними мутантними варіантами асиметричних ITR з Таблиці 10А та 10В. Вектор зкДНК мав ген люциферази, по боках якого розташовувалися ITR дикого типу та модифікований асиметричний ITR, вибраний з Таблиці 10А або 10В. "ITR-50 R no rep" є відомим мутантом, який піддається рятуванню, без коінфекції Rep-вмісним бакуловірусом. "Імітаційні" умови передбачають лише трансфекційні реагенти, без донорної ДНК.

Фіг. 28 показує природний агарозний гель (1% агарози, 1x TAE буфер) екстрактів типових необроблених зкДНК з культур клітин комах Sf9, трансфікованих зкДНК-плазмідами, які включають лівий ITR дикого типу з іншим ITR, вибраним з різних мутантних правих ITR, показаних у Таблиці 10А. У кожний ряд завантажували 2 мкг загального екстракту. Зліва направо: Ряд 1) маркер довжини 1kb Plus, Ряд 2) ITR-18 правий, Ряд 3) ITR-49 правий, Ряд 4) ITR-19 правий, Ряд 5) ITR-20 правий, Ряд 6) ITR-21 правий, Ряд 7) ITR-22 правий, Ряд 8) ITR-23 правий, Ряд 9) ITR-24 правий, Ряд 10) ITR-25 правий, Ряд 11) ITR-26 правий, Ряд 12) ITR-27 правий, Ряд 13) ITR-28 правий, Ряд 14) ITR-50 правий, ряд 15) маркер довжини 1kb Plus.

Фіг. 29 показує денатуруючий гель (0,8% лужної агарози) типових конструктів з бібліотеки мутантів ITR. Вектор зкДНК продукують з плазмідних конструктів, які включають лівий ITR дикого типу з іншим ITR, вибраним з різних мутантних правих ITR, представлених у Таблиці 10А. Зліва направо: Ряд 1) маркер довжини 1kb Plus ДНК, Ряд 2) ITR-18 правий нерозрізаний, Ряд 3) ITR-18 правий рестрикт, Ряд 4) ITR-19 правий нерозрізаний, Ряд 5) ITR-19 правий рестрикт, Ряд 6) ITR-21 правий нерозрізаний, Ряд 7) ITR-21 правий рестрикт, Ряд 8) ITR-25 правий нерозрізаний, Ряд 9) ITR-25 правий рестрикт. Екстракти обробляли рестрикційною ендонуклеазою EcoRI. Очікується, що кожна мутантна зкДНК має єдину ділянку розпізнавання EcoRI, яка продукує два характерні фрагменти, ~ 2000 п.о. і ~ 3000 п.о., які складають ~ 4000 і ~ 6000 п.о., відповідно, в денатуруючих умовах. Необроблені екстракти зкДНК складають ~ 5000 п.о., й очікується, що вони мають мігрувати при ~ 11000 п.о. в денатуруючих умовах.

Фіг. 30 показує активність люциферази *in vitro* у клітинах HEK293 мутантів ITR ITR-18 правого, ITR-19 правого, ITR-21 правого й ITR-25 правого й ITR-49, де лівий ITR у векторі зкДНК є ITR дикого типу. "Імітаційні" умови передбачають лише трансфекційні реагенти, без донорної ДНК, а необроблений зразок являє собою негативний контроль.

Детальний опис винаходу

Визначення

Якщо в описі немає іншого визначення, наукові та технічні терміни, вжиті у зв'язку з даною заявкою, мають значення, які відповідають традиційному розумінню серед фахівців у галузі, до якої відноситься даний винахід. Слід розуміти, що цей винахід не обмежується конкретними методологіями, протоколами та реагентами і т. ін., описаними авторами, оскільки вони можуть бути різними. Вжита авторами термінологія має на меті лише опис конкретних варіантів втілення, а не для

обмеження обсягу даного винаходу, який визначається виключно формулою винаходу. Визначення загальних термінів з імунології та молекулярної біології можна знайти у публікаціях The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 19th Edition, видавництво Merck Sharp & Dohme Corp., 2011 (ISBN 978-0-911910-19-3); Robert S. Porter et al. (eds.), Fields Virology, 6th Edition, видавництво Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA (2013), Knipe, D.M. and Howley, P.M. (ed.), The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine, видавництво Blackwell Science Ltd., 1999 - 2012 (ISBN 9783527600908); та Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, видавництво VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8); Immunology by Werner Luttmann, видавництво Elsevier, 2006; Janeway's Immunobiology, Kenneth Murphy, Allan Mowat, Casey Weaver (eds.), Taylor & Francis Limited, 2014 (ISBN 0815345305, 9780815345305); Lewin's Genes XI, видавництво Jones & Bartlett Publishers, 2014 (ISBN-1449659055); Michael Richard Green and Joseph Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., 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; and 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), зміст яких включено до цього опису шляхом посилання у їх повному обсязі.

У контексті даного опису терміни "гетерологічна нуклеотидна послідовність" та "трансген" є вжитими взаємозамінно і стосуються потрібної нуклеїнової кислоти (відмінної від нуклеїнової кислоти, яка кодує капсидний поліпептид), яка є включеною у вектор зкДНК і може доставлятися й експресуватися ним, як розкривається авторами. До потрібних трансгенів, крім інших, відносяться нуклеїнові кислоти, які кодують поліпептиди, в оптимальному варіанті терапевтичні (наприклад, для медичного, діагностичного або ветеринарного застосування) або імуногенні поліпептиди (наприклад, для вакцин). У деяких варіантах втілення до потрібних нуклеїнових кислот відносяться нуклеїнові кислоти, які транскрибуються у терапевтичну РНК. До трансгенів, включених для застосування у векторах зкДНК згідно з винаходом, крім інших, відносяться ті, які експресують або кодують один або декілька поліпептидів, пептидів, рибозимів, аптамери, пептидні нуклеїнові кислоти, міРНК, РНКі, мікроРНК, нкРНК, антисмислові оліго- або полінуклеотиди, антитіла, антиген-зв'язувальні фрагменти або будь-яка їх комбінація.

У контексті даного опису терміни "експресійна касета" та "транскрипційна касета" є вжитими взаємозамінно і стосуються лінійного відрізка нуклеїнових кислот, який включає трансген, який є функціонально зв'язаним з одним або кількома промоторами або іншими регуляторними послідовностями, достатніми для спрямування транскрипції трансгена, але який не включає кодуючих капсид послідовностей, інших векторних послідовностей або ділянок інвертованих кінцевих повторів. Експресійна касета додатково може включати одну або декілька цис-діючих послідовностей (наприклад, промоторів, енхансерів або репресорів), один або декілька інтронів та один або декілька посттранскрипційних регуляторних елементів.

У контексті даного опису термін "кінцевий повтор" або "TR" включає будь-який вірусний кінцевий повтор або синтетичну послідовність, яка включає принаймні одне мінімальне джерело реплікації та ділянку, яка включає паліндромну шпилькову структуру. Реп-зв'язувальна послідовність ("RBS") (також вказується як RBE (Реп-зв'язувальний елемент)) та сайт кінцевого розділення ("TRS") разом складають "мінімально необхідне джерело реплікації", і, таким чином, TR включає принаймні одну RBS і принаймні один TRS. Кожний з TR, які є зворотними комплементами один одного у межах даного відрізка полінуклеотидної послідовності, зазвичай вказується як "інвертований кінцевий повтор" або "ITR". У контексті вірусу ITR опосередковують реплікацію, упаковку, інтеграцію вірусу та рятування провірусу. Авторами винаходу було несподівано виявлено, що TR, які не є зворотними комплементами по всій їхній довжині, все одно можуть виконувати традиційні функції ITR, і, таким чином, термін ITR вживається авторами для вказування на TR у геномі зкДНК або векторі зкДНК, який є здатним опосередковувати реплікацію вектора зкДНК. Фахівцю у даній галузі стане зрозуміло, що у складних конфігураціях вектора зкДНК можуть бути присутні більше двох ITR або асиметричні пари ITR. ITR може бути ITR AAV або відмінним від ITR AAV, або може походити від ITR AAV або не від ITR AAV. Наприклад, ITR може походити з родини Parvoviridae, яка охоплює парвовіруси та депендовіруси (наприклад, парвовірус собачих, парвовірус великої рогатої худоби, парвовірус мишей, парвовірус свиней, парвовірус людини B-19), або шпилька SV40, яка служить як джерело реплікації SV40, може використовуватись як ITR, яка може бути піддана подальшій модифікації шляхом зрізання, заміщення, делеції, вставки та/або додавання. Віруси родини Parvoviridae складаються з двох підродин: Parvovirinae, які інфікують хребетних, та Densovirinae, які інфікують безхребетних. Депендопарвовіруси охоплюють вірусну родину аденоасоційованих вірусів (AAV), здатних до реплікації в організмах-хазяях хребетних, включаючи, крім інших, людину, приматів, велику рогату худобу, собак, коней та інші види.

У контексті даного опису термін "асиметричні ITR" стосується пари ITR у межах єдиного геному зкДНК або вектора зкДНК, які не є зворотними комплементами по всій їхній довжині. Різниця у

послідовності між двома ITR може бути зумовлена додаванням нуклеотидів, делецією, зрізанням або точковою мутацією. В одному варіанті втілення один ITR з пари може бути послідовністю AAV дикого типу, а інший може не належати до дикого типу або бути синтетичною послідовністю. В іншому варіанті втілення жоден ITR з пари не є послідовністю AAV дикого типу, і два ITR мають відмінні одну від одної послідовності. Для зручності ITR, розташований на 5' кінці (перед експресійною касетою) у векторі зкДНК, вказується як "5' ITR" або "лівий ITR", а ITR, розташований на 3' кінці (після експресійної касети) у векторі зкДНК, вказується як "3' ITR" або "правий ITR".

У контексті даного опису термін "геном зкДНК" стосується експресійної касети, яка також включає принаймні одну ділянку інвертованого кінцевого повтору. Геном зкДНК також може включати одну або декілька спейсерних ділянок. У деяких варіантах втілення геном зкДНК є включеним як міжмолекулярний дуплексний полінуклеотид ДНК у плазміді або вірусний геном.

У контексті даного опису термін "спейсерна ділянка зкДНК" стосується проміжної послідовності, яка розділяє функціональні елементи у векторі зкДНК або геномі зкДНК. У деяких варіантах втілення спейсерні ділянки зкДНК тримають два функціональні елементи на потрібній відстані для оптимальної функціональності. У деяких варіантах втілення спейсерні ділянки зкДНК забезпечують або додають генетичну стійкість геному зкДНК, наприклад, у межах плазміді або бакуловірусу. У деяких варіантах втілення спейсерні ділянки зкДНК сприяють генетичним маніпуляціям з геномом зкДНК шляхом забезпечення зручного розташування для сайтів клонування і т. ін. Наприклад, у деяких аспектах олігонуклеотид "полілінкер", який містить декілька сайтів рестрикційної ендонуклеази або послідовність, відмінну від відкритої рамки читування, яка не передбачає сайтів зв'язування відомого білка (наприклад, фактора транскрипції), може розташовуватись у геномі зкДНК для відокремлення цис-діючих факторів, наприклад, з вставленням 6-меру, 12-меру, 18-меру, 24-меру, 48-меру, 86-меру, 176-меру, і т. д. між сайтом кінцевого розділення та висхідним транскрипційним регуляторним елементом. Подібним чином спейсер може бути включений між послідовність сигналу поліаденілування та 3'-сайтом кінцевого розділення.

У контексті даного опису терміни "Сайт зв'язування Rep", "зв'язувальний елемент Rep", "RBE" та "RBS" є вжитими взаємозамінно і стосуються сайту зв'язування для Rep-білка (наприклад, AAV Rep 78 або AAV Rep 68), який після зв'язування з Rep-білком дозволяє Rep-білку здійснювати його сайт-специфічну ендонуклеазну активність на послідовності, яка включає RBS. Послідовність RBS та її зворотний комплемент разом утворюють єдину RBS. Послідовності RBS є відомими фахівцям у даній галузі, і до них відносяться, наприклад, 5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3' (SEQ ID NO: 531), послідовність RBS, розпізнана в AAV2. Будь-яка відома послідовність RBS може застосовуватись у варіантах втілення винаходу, включаючи інші відомі послідовності RBS AAV та інші природні або синтетичні послідовності RBS. Без прив'язування до будь-якої теорії вважається, що нуклеазний домен Rep-білка зв'язується з дуплексною нуклеотидною послідовністю GCTC, і, таким чином, два відомі Rep-білки AAV безпосередньо зв'язуються і утворюють стійке об'єднання з дуплексним олігонуклеотидом, 5'-(GCGC)(GCTC)(GCTC)(GCTC)-3' (SEQ ID NO: 531). Крім того, розчинні агреговані конформери (тобто, невизначена кількість зв'язаних між собою Rep-білків) дисоціюються й зв'язуються з олігонуклеотидами, які містять сайти зв'язування Rep. Кожен Rep-білок взаємодіє як з азотними основами, так і з фосфодіестерним кістяком на кожному ланцюзі. Взаємодія з азотними основами забезпечує специфічність послідовності, тоді як взаємодія з фосфодіестерним кістяком є неспецифічною або менше специфічною до послідовності та стабілізує комплекс білок-ДНК.

У контексті даного опису терміни "сайт кінцевого розділення" та "TRS" вживаються взаємозамінно і стосуються ділянки, в якій Rep утворює тирозин-фосфодіестерний зв'язок з 5' тимідином, що генерує 3' ОН, який служить як субстрат для подовження ДНК через клітинну ДНК-полімеразу, наприклад, ДНК пол дельта або ДНК пол епсилон. В альтернативному варіанті комплекс Rep-тимідин може брати участь у координованій реакції лігування. У деяких варіантах втілення TRS мінімально включає тимідин з неспареними основами. У деяких варіантах втілення ефективність нікування TRS може принаймні частково регулюватися за його відстанню від RBS у межах однієї молекули. Якщо акцепторний субстрат є комплементарним ITR, утворений в результаті продукт є внутрішньомолекулярним дуплексом. Послідовності TRS є відомими фахівцям у даній галузі, і до них відносяться, наприклад, 5'-GGTTGA-3' (SEQ ID NO: 45), гексануклеотидна послідовність, розпізнана у AAV2. Будь-яка відома TRS послідовність може застосовуватись у варіантах втілення винаходу, включаючи інші відомі послідовності TRS AAV та інші природні або синтетичні послідовності TRS, такі, як AGTT (SEQ ID NO: 46), GGTTGG (SEQ ID NO: 47), AGTTGG (SEQ ID NO: 48), AGTTGA (SEQ ID NO: 49) та інші мотиви, такі, як RRTTRR (SEQ ID NO: 50).

У контексті даного опису термін "зкДНК-плазмід" стосується плазміді, яка включає геном зкДНК як міжмолекулярний дуплекс.

У контексті даного опису термін "зкДНК-бакміда" означає інфекційний геном бакуловірусу, який включає геном зкДНК як міжмолекулярний дуплекс, здатний розмножуватися в E. coli як плазмід, а отже, може діяти як човниковий вектор для бакуловірусу.

У контексті даного опису термін "зкДНК-бакуловірус" означає бакуловірус, який включає геном зкДНК як міжмолекулярний дуплекс у межах геному бакуловірусу.

У контексті даного опису терміни "інфікована зкДНК-бакуловірусом клітина комахи" та "зкДНК-ВІІС" вживаються взаємозамінно і означають клітину-хазяїн безхребетного (включаючи, крім інших, клітину

комахи (наприклад, клітину Sf9)), інфікованої зкДНК-бакуловірусом.

У контексті даного опису терміни "ДНК-вектор з закритими кінцями", "вектор зкДНК" та "зкДНК" є вжитими взаємозамінно і стосуються невірусного безкапсидного ДНК-вектора з принаймні одним ковалентно закритим кінцем (тобто, внутрішньомолекулярного дуплексу). У деяких варіантах втілення зкДНК включає два ковалентно закриті кінці.

Як визначено авторами, "репортери" означають білки, які можуть застосовуватися для забезпечення зчитуваних показників, які піддаються виявленню. Репортери зазвичай створюють вимірний сигнал, такий, як флуоресценція, колір або люмінесценція. Послідовності кодування репортерного білка кодують білки, присутність яких у клітині або організмі може легко спостерігатися. Наприклад, флуоресцентні білки змушують клітину флуоресцювати при збудженні світлом з певною довжиною хвилі, люциферази змушують клітину каталізувати реакцію, яка виробляє світло, а ферменти, такі, як β -галактозидаза, перетворюють субстрат на забарвлений продукт. До типових репортерних поліпептидів, які можуть застосовуватися для експериментальних або діагностичних цілей, відносяться, крім інших β -лактамаза, β -галактозидаза (LacZ), лужна фосфатаза (AP), тимідинкіназа (TK), зелений флуоресцентний білок (GFP) та інші флуоресцентні білки, хлорамфенікол-ацетилтрансфераза (CAT), люцифераза та інші, добре відомі фахівцям у даній галузі.

У контексті даного опису термін "ефекторний білок" означає поліпептид, який забезпечує зчитуваний показник, який піддається виявленню, або як, наприклад, репортерний поліпептид, або, більш бажано, як поліпептид, який знищує клітину, наприклад, токсин, або як агент, який робить клітину сприйнятливою до знищення вибраним агентом або його відсутністю. До ефекторних білків відносяться будь-який білок або пептид, який безпосередньо націлюється на ДНК та/або РНК клітини-хазяїна або пошкоджує її. Наприклад, до ефекторних білків, крім інших, можуть належати рестрикційна ендонуклеаза, націлена на послідовність ДНК клітини-хазяїна (геному або на позакромосомний елемент), протеаза, яка розщеплює поліпептид-мішень, необхідний для виживання клітини, інгібітор ДНК-гірази та токсин рибонуклеазного типу. У деяких варіантах втілення експресія ефекторного білка, контрольована синтетичним біологічним циклом, як описується авторами, може брати участь як фактор в іншому синтетичному біологічному циклі, таким чином, розширюючи діапазон та складність реагування системи біологічного циклу.

Транскрипційні регулятори означають транскрипційні активатори та репресори, які або активують, або пригнічують транскрипцію потрібного гена. Промотори є ділянками нуклеїнової кислоти, які започатковують транскрипцію конкретного гена. Транскрипційні активатори зазвичай зв'язуються поблизу від транскрипційних промоторів і залучають РНК-полімеразу для безпосереднього ініціації транскрипції. Репресори зв'язуються з транскрипційними промоторами і стерично перешкоджають ініціації транскрипції РНК-полімеразою. Інші транскрипційні регулятори можуть служити як активатори або репресори, залежно від місця їх зв'язування і клітинних та навколишніх умов. Необмежувальними прикладами класів транскрипційних регуляторів є, крім інших, гомеодомени білки, білки "цинкових пальців", білки "крилата спіраль" (forkhead) та білки "лейцинова застібка".

У контексті цього опису "репресорний білок" або "індукторний білок" означає білок, який зв'язується з елементом регуляторної послідовності і пригнічує або активує, відповідно, транскрипцію послідовностей, функціонально зв'язаних з елементом регуляторної послідовності. Оптимальні репресорні та індукторні білки, які описуються авторами, є чутливими до присутності або відсутності принаймні одного вхідного агента або впливу навколишнього середовища. Оптимальні білки, як описується авторами, є модульними за формою, включаючи, наприклад, віддільні елементи або домени, які зв'язуються з ДНК та вхідним агентом або реагують на них.

У контексті цього опису "носій" включає будь-які й усі розчинники, дисперсійні середовища, основи, покриття, розріджувачі, антибактеріальні та протигрибкові засоби, ізотонічні та уповільнюючі абсорбції агенти, буфери, розчини носіїв, суспензії, колоїди і т. ін. Застосування таких середовищ та агентів для фармацевтично активних речовин є добре відомим серед фахівців у даній галузі. До композицій також можуть бути включені додаткові активні інгредієнти. Фраза "фармацевтично прийнятні" стосується молекулярних субстанцій та композицій, які не викликають токсичної, алергічної або іншої подібної небажаної реакції при введенні до організму-хазяїна.

У контексті цього опису "реагуючий на вхідний агент домен" є доменом фактора транскрипції, який зв'язується або іншим чином реагує на умови або вхідний агент у спосіб який робить ДНК-зв'язувальний домен злиття чутливим до присутності цих умов або агента. В одному варіанті втілення присутність умов або агента в результаті веде до конформаційної зміни у реагуючому на вхідний агент домені або на білок, з яким він зливається, що модифікує модулюючи транскрипцію активність фактора транскрипції.

Термін "in vivo" стосується аналізів або процесів, які відбуваються в організмі або у межах організму, такого, як багатоклітинна тварина. У деяких з описаних авторами аспектів спосіб або застосування називають таким, що відбувається "in vivo", при використанні одноклітинного організму, такого, як бактерія. Термін "ex vivo" стосується способів та застосування, які відбуваються з використанням живої клітини з неушкодженою мембраною, яка перебуває поза межами організму багатоклітинної тварини або рослини, наприклад, експлантатів, культивованих клітин, включаючи первинні клітини та лінії клітин, трансформовані лінії клітин та екстраговані тканину або клітини, включаючи, крім іншого, клітини крові. Термін "in vitro" стосується аналізів або способів, які не

вимагають присутності клітини з неушкодженою мембраною, такої, як клітинні екстракти, і може стосуватися включення програмованого синтетичного біологічного циклу у неклітинну систему, таку, як середовище, яке не включає клітини або клітинні системи, такі, як клітинні екстракти.

Термін "промотор" у контексті цього опису стосується будь-якої нуклеїновокислотної послідовності, яка регулює експресію іншої нуклеїновокислотної послідовності шляхом запуску транскрипції нуклеїновокислотної послідовності, яка може бути гетерологічним геном-мішенню, що кодує білок або РНК. Промотори можуть бути конститутивними, індукцибельними, репресованими, тканиноспецифічними або представляти будь-яку їх комбінацію. Промотор є контрольною ділянкою нуклеїновокислотної послідовності, в якій контролюються ініціація та швидкість транскрипції решти нуклеїновокислотної послідовності. Промотор також може містити генетичні елементи, в яких можуть зв'язуватися регуляторні білки та молекули, такі, як РНК-полімераза та інші фактори транскрипції. У деяких варіантах втілення описаних авторами аспектів промотор може запускати експресію фактора транскрипції, який регулює експресію самого промотора, або іншого промотора, який використовують в іншому модульному компоненті описаних авторами синтетичних біологічних циклів. У межах послідовності промотора знаходиться сайт ініціації транскрипції, а також домени зв'язування білка, які відповідають за зв'язування РНК-полімерази. Еукаріотні промотори часто, хоча не завжди, містять ТАТА-блоки та САТ-блоки. Різні промотори, включаючи індукцибельні промотори, може застосовуватися для започаткування експресії трансгенів у векторах зкДНК, описаних авторами.

Термін "енхансер" у контексті цього опису означає цис-діючу регуляторну послідовність (наприклад, з 50-1500 пар основ), яка зв'яже один або декілька білків (наприклад, білки-активатори або фактор транскрипції) для підвищення транскрипційної активності нуклеїновокислотної послідовності. Енхансери можуть бути розташовані на відстані до 1 000 000 пар основ перед сайтом початку гена або після сайту початку гена, який вони регулюють. Енхансер може бути розташований у межах інтронної ділянки або в екзонній ділянці неспорідненого гена.

Промотор може вважатися таким, що запускає експресію або запускає транскрипцію нуклеїновокислотної послідовності, яку він регулює. Фрази "функціонально зв'язаний", "функціонально розташований", "під контролем" та "під транскрипційним контролем" означають, що промотор перебуває у належному функціональному місці та/або орієнтації відносно нуклеїновокислотної послідовності, яку він регулює для контролю транскрипційної ініціації й/або експресії цієї послідовності. "Інвертований промотор" у контексті цього опису означає промотор, у якому нуклеїновокислотна послідовність має зворотну орієнтацію, і, таким чином, ланцюг, який був кодуєчим, стає некодуєчим ланцюгом, і навпаки. Інвертовані промоторні послідовності застосовують у різних варіантах втілення для регулювання стану перемикача. Крім того, у різних варіантах втілення промотор може бути застосований у поєднанні з енхансером.

Промотор може бути природно асоційованим з геном або послідовністю, що може бути досягнуто шляхом виділення 5' некодуєчих послідовностей, розташованих перед кодуєчим сегментом й/або екзоном даного гена або послідовності. Такий промотор може бути вказаний як "ендогенний". Подібним чином у деяких варіантах втілення енхансер може бути природно асоційованим з нуклеїновокислотною послідовністю, розташованою до або після цієї послідовності.

У деяких варіантах втілення кодуєчий нуклеїновокислотний сегмент розташовується під контролем "рекомбінантного промотора" або "гетерологічного промотора", обидва з яких стосуються промотора, який за нормальних умов не є асоційованим з кодуєчою нуклеїновокислотною послідовністю, з якою він є функціонально зв'язаним у природному оточенні. Рекомбінантний або гетерологічний енхансер означає енхансер, який за нормальних умов не є асоційованим з даною нуклеїновокислотною послідовністю у природному оточенні. Такі промотори або енхансери можуть включати промотори або енхансери інших генів; промотори або енхансери, виділені з будь-якої іншої прокаріотної, вірусної або еукаріотної клітини; та синтетичні промотори або енхансери, які не є "природними", тобто, включають різні елементи різних транскрипційних регуляторних ділянок, та/або мутації, які змінюють експресію через способи генної інженерії, які є відомими фахівцям у даній галузі. Додатково до синтетичного продукування нуклеїновокислотних послідовностей промоторів та енхансерів промоторні послідовності можуть бути одержані з застосуванням рекомбінантного клонування та/або технології ампліфікації нуклеїнових кислот, включаючи ПЛР, у зв'язку з описаними авторами синтетичними біологічними циклами та модулями (див., наприклад, патент США № 4,683,202, патент США № 5,928,906, кожен з яких є включеними шляхом посилання). Крім того, передбачається, що також можуть застосовуватися контрольні послідовності, які спрямовують транскрипцію й/або експресію послідовностей в межах неядерних органел, таких, як мітохондрії, хлоропласти і т.ін.

Як описується авторами, "індукцибельний промотор" є промотором, який характеризується ініціацією або посиленням транскрипційної активності у присутності, під впливом індуктора або індукуючого агента, або в контакт з ними. "Індуктор" або "індукуючий агент", як визначено авторами, може бути ендогенною або за нормальних умов екзогенною сполукою або білком, які вводять таким чином, щоб вони були активними у викликанні транскрипційної активності від індукцибельного промотора. У деяких варіантах втілення індуктор або індукуючий агент, тобто, хімічна речовина, сполука або білок, сам може бути результатом транскрипції або експресії нуклеїновокислотної послідовності (тобто, індуктор може бути індукторним білком, який експресується іншим компонентом

або модулем), яка сама може бути під контролем або бути індукційним промотором. У деяких варіантах втілення індукційний промотор індукується за відсутності певних агентів, таких, як репресор. Прикладами індукційних промоторів є, крім інших, тетрациклін, металотіонін, екдизон, віруси ссавців (наприклад, пізній промотор аденовірусу; та довгий кінцевий повтор вірусу пухлини молочної залози мишей (MMTV-LTR)) та інші стероїд-залежні промотори, рапаміцин-залежні промотори і т.ін.

Термін "суб'єкт" у контексті цього опису означає людину або тварину, для якої забезпечується лікування, включаючи профілактичне лікування, з застосуванням вектора зкДНК згідно з даним винаходом. Зазвичай тварина належить до хребетних тварин, включаючи, крім інших, примати, гризуни, свійські тварини або дикі тварини. До приматів, крім інших, відносяться шимпанзе, яванські макаки, павукоподібні мавпи та макаки, наприклад, резуси. До гризунів відносяться миші, щури, лісові бабаки, тхори, кролі та хом'яки. До свійських та диких тварин відносяться, крім інших, корови, коні, свині, олені, бізони, буйволи, види котятих, наприклад, домашній кіт, види собак, наприклад, собака, лисиця, вовк, види птахів, наприклад, курка, ему, страус, та риби, наприклад, форель, сом та лосось. У деяких варіантах втілення описаних авторами аспектів суб'єкт є ссавцем, наприклад, а приматом або людиною. Суб'єкт може бути чоловічої або жіночої статі. Крім того, суб'єкт може бути дитинчам або дитиною. У деяких варіантах втілення суб'єкт може бути новонародженим або ненародженим суб'єктом, наприклад, суб'єктом *in utero*. В оптимальному варіанті суб'єкт є ссавцем. Ссавець може бути людиною або відмінним від людини приматом, мишею, щуром, собакою, котом, конем або коровою, але ці приклади не є обмежувальними. Відмінні від людини ссавці в оптимальному варіанті можуть бути використані як суб'єкти, які представляють тваринні моделі хвороб або порушень. Крім того, описані авторами способи та композиції можуть застосовуватися для приручених та/або хатніх тварин. Людина може бути будь-якого віку, статі, раси або етнічної групи, наприклад, європейської (білої), азійської, африканської, чорної, афроамериканської, афроєвропейської, латиноамериканської, близькосхідної і т. ін. У деяких варіантах втілення суб'єкт може бути пацієнтом або іншим суб'єктом у клінічних умовах. У деяких варіантах втілення суб'єкт вже піддається лікуванню.

У контексті даного опису термін "антитіло" вживається у найширшому сенсі і охоплює різні структури антитіл, включаючи, крім інших, моноклональні антитіла, поліклональні антитіла, мультиспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла) та фрагменти антитіл, якщо вони демонструють потрібну антиген-зв'язувальну активність. "Фрагмент антитіла" стосується молекули, відмінної від інтактного антитіла, що включає частину інтактного антитіла, яка зв'язується з тим самим антигеном, з яким зв'язується інтактне антитіло. В одному варіанті втілення антитіло або фрагмент антитіла включає імуноглобуліновий ланцюг або фрагмент антитіла та принаймні одну послідовність варіабельного домену імуноглобуліну. Прикладами антитіл або їх фрагментів, крім інших, можуть бути Fv, scFv, фрагмент Fab, Fab', F(ab')₂, Fab'-SH, одностороннє антитіло (dAb), важкий ланцюг, легкий ланцюг, важкий та легкий ланцюг, повне антитіло (наприклад, включає кожен з Fc, Fab, важких ланцюгів, легких ланцюгів, варіабельних ділянок і т.ін.), біспецифічне антитіло, діатіло, лінійне антитіло, одностороннє антитіло, інтратіло, моноклональне антитіло, химерне антитіло, мультиспецифічне антитіло або мультимерне антитіло. Антитіло або його фрагмент може належати до будь-якого класу, включаючи, крім інших, IgA, IgD, IgE, IgG та IgM, та будь-якого підкласу, включаючи, крім інших, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 та IgA2. Крім того, антитіло може бути взятим з організму будь-якої тварини, такої, як ссавець, наприклад, примати, людина, щури, миші, коні, кози і т.ін. В одному варіанті втілення антитіло є людським або гуманізованим. У деяких варіантах втілення антитіло є модифікованим антитілом. У деяких варіантах втілення компоненти антитіла можуть експресуватись окремо, таким чином, щоб антитіло самозбиралося після експресії білкових компонентів. У деяких варіантах втілення антитіло є "гуманізованим" для зменшення імуногенних реакцій в організмі людини. У деяких варіантах втілення антитіло має потрібну функцію, наприклад, взаємодію та інгібування потрібного білка з метою лікування хвороби або симптому хвороби. В одному варіанті втілення антитіло або фрагмент антитіла включає каркасну ділянку або Fc ділянку.

У контексті даного опису термін "антиген-зв'язувальний домен" молекули антитіла стосується частини молекули антитіла, наприклад, молекули імуноглобуліну (Ig), що бере участь у зв'язуванні антигена. У варіантах втілення сайт зв'язування антигена утворюється амінокислотними залишками варіабельних (V) ділянок важкого (H) та легкого (L) ланцюгів. Три високодивергентні відрізки у межах варіабельних ділянок важкого та легкого ланцюгів, які називаються гіперваріабельними ділянками, розташовуються між більш консервативними фланкуючими відрізками, які називаються "каркасними ділянками" (FR). FR є амінокислотними послідовностями, які у природі знаходяться між гіперваріабельними ділянками в імуноглобулінах та суміжно з цими ділянками. У варіантах втілення у молекулі антитіла, три гіперваріабельні ділянки легкого ланцюга та три гіперваріабельні ділянки важкого ланцюга розташовуються відносно одна одної у тривимірному просторі для утворення антиген-зв'язувальної поверхні, яка є комплементарною тривимірній поверхні зв'язаного антигена. Три гіперваріабельні ділянки кожного важкого та легкого ланцюгів вказуються як "ділянки визначення комплементарності" або "CDR." Каркасну ділянку та CDR було визначено й описано, наприклад, у публікаціях Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, і Chothia, C. et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901 - 917. Кожен варіабельний ланцюг (наприклад, варіабельний важкий ланцюг і

варіабельний легкий ланцюг) зазвичай складається з трьох CDR та чотирьох FR, розташованих від аміно-кінця до карбокси-кінця у порядку амінокислот: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 та FR4.

У контексті даного опису термін "антитіло повної довжини" означає молекулу імуноглобуліну (Ig) (наприклад, IgG антитіло), яка, наприклад, є природною і утворюється з застосуванням нормальних процесів рекомбінації фрагмента гена імуноглобуліну.

У контексті даного опису термін "функціональний фрагмент антитіла" означає фрагмент, який зв'язується з тим самим антигеном, що розпізнається інтактним антитілом (наприклад, антитілом повної довжини). Терміни "фрагмент антитіла" або "функціональний фрагмент" також включають виділені фрагменти, які складаються з варіабельних ділянок, такі, як фрагменти "Fv", які складаються з варіабельних ділянок важкого та легкого ланцюгів, або молекули рекомбінантних одноланцюгових поліпептидів, у яких легкі та важкі варіабельні ділянки з'єднуються пептидним лінкером ("scFv білки"). У деяких варіантах втілення фрагмент антитіла не включає частин антитіла без антиген-зв'язувальної активності, таких, як Fc фрагменти або окремі амінокислотні залишки.

У контексті цього опису "послідовність варіабельного домену імуноглобуліну" означає амінокислотну послідовність, яка може утворювати структуру варіабельного домену імуноглобуліну. Наприклад, послідовність може включати усю або частину амінокислотної послідовності природного варіабельного домену. Наприклад, послідовність може включати або не включати одну, дві або більше N- або C-кінцевих амінокислот, або може включати інші зміни, які є сумісними з утворенням структури білка.

У контексті цього опису термін "включаючи" або "включає" вживається у зв'язку з композиціями, способами та їхніми відповідними компонентами, які є суттєвими для способу або композиції, але передбачає включення незазначених елементів, незалежно від того, чи є вони суттєвими.

У контексті цього опису термін "по суті складається з" стосується елементів, які вимагаються для даного варіанта втілення. Термін допускає присутність елементів, які суттєво не впливають на базові та нові або функціональні характеристики варіанта втілення.

Термін "складається з" стосується композицій, способів та їх відповідних компонентів, як описується авторами, які не включають жодного елемента, не вказаного в цьому описі варіанта втілення.

Вжиті в цьому описі та супровідній формулі винаходу форми однини включають також посилання на множену, якщо контекстом прямо не передбачається іншого. Таким чином, наприклад, посилання на "спосіб" включає один або декілька способів та/або етапів типу, який описується авторами та/або який стане очевидним для фахівців у даній галузі по ознайомленню з цим описом, і т. д. Подібним чином слово "або" також передбачає "та", якщо контекстом прямо не передбачається іншого. Хоча у практичному втіленні або випробуванні цього винаходу можуть застосовуватися способи та матеріали, подібні або еквівалентні описаним авторами, підходящі способи та матеріали описуються нижче. Слово "наприклад" означає необмежувальний приклад.

У випадках, які не стосуються функціональних прикладів, бо якщо вказано інше, усі вказані авторами числа, які позначають кількість інгредієнтів або умов реакції, в усіх випадках слід розуміти як модифіковані терміном "приблизно." Термін "приблизно", вжитий у зв'язку з відсотками, може означати ± 1 %. Даний винахід далі описується детально на представлених нижче прикладах, але обсяг винаходу не обмежується ними.

Слід розуміти, що цей винахід не обмежується конкретними методологіями, протоколами та реагентами і т. ін., описаними авторами, оскільки вони можуть бути різними. Вжита авторами термінологія має на меті лише опис конкретних варіантів втілення, а не для обмеження обсягу даного винаходу, який визначається виключно формулою винаходу.

Вектор зкДНК

Авторами винаходу забезпечуються нові молекули невірусних, безкапсидних зкДНК з ковалентно закритими кінцями (зкДНК). Ці молекули невірусних безкапсидних зкДНК можуть вироблятися у допустимих клітинах-хазяях з експресійного конструкту (наприклад, зкДНК-плазмід, зкДНК-бакмід, зкДНК-бакуловірусу або лінії включених клітин), що містить гетерологічний ген (трансген), розташований між двома різними послідовностями інвертованого кінцевого повтору (ITR), де ITR є відмінними один від одного. У деяких варіантах втілення один з ITR є модифікованим шляхом делеції, вставки та/або заміщення у порівнянні з послідовністю ITR дикого типу (наприклад, ITR AAV); і принаймні один з ITR включає функціональний сайт кінцевого розділення (trs) та сайт зв'язування Rep. Вектор зкДНК в оптимальному варіанті є дуплексним, наприклад, самокомплементарним, принаймні у частині молекули, такий, як експресійна касета (наприклад, зкДНК не є дволанцюговою кільцевою молекулою). Вектор зкДНК має ковалентно закриті кінці й, таким чином, є стійким до розщеплення екзонуклеазою (наприклад, екзонуклеазою I або екзонуклеазою III), наприклад, протягом години при 37 °C.

Описані авторами вектори зкДНК не мають обмежень пакування, зумовленого обмеженням простором у межах вірусної капсиди. Вектори зкДНК представляють життєздатну вироблену еукаріотами альтернативу виробленим прокаріотами векторам плазмідної ДНК, на відміну від інкапсульованих геномів AAV. Це дозволяє вставляти контрольні елементи, наприклад, регулюючі перемикачі, як розкривається авторами, великі трансгени, множинні трансгени і т. ін.

В одному аспекті вектор зкДНК включає, у напрямку від 5' до 3': інвертований кінцевий повтор (ITR)

першого аденоасоційованого вірусу (AAV), потрібну нуклеотидну послідовність (наприклад, експресійну касету, як описується авторами) та ITR другого AAV, причому перший ITR та другий ITR є асиметричними відносно один одного – тобто, є відмінними один від одного. У типовому варіанті втілення перший ITR може бути ITR дикого типу, а другий ITR може бути мutowаним або модифікованим ITR. У деяких варіантах втілення перший ITR може бути мutowаним або модифікованим ITR, а другий ITR може бути ITR дикого типу. В іншому варіанті втілення перший ITR та другий ITR обидва є модифікованими, але мають різні послідовності або мають різні модифікації, або не є ідентичними модифікованими ITR. Іншими словами, ITR є асиметричними у тому сенсі, що будь-які зміни в одному ITR не відображаються в іншому ITR; або, в альтернативному варіанті, якщо ITR є відмінними один від одного. Типові ITR у векторі зкДНК і для застосування з метою генерації зкДНК-плазмиди обговорюються нижче у розділі під назвою "ITR".

Послідовності ITR дикого типу або мutowані або іншими чином модифіковані послідовності ITR, які пропонуються авторами, представляють послідовності ITR, включені в експресійний конструкт (наприклад, зкДНК-плазмиду, зкДНК-бакмиду, зкДНК-бакуловірус) для продукування вектора зкДНК. Таким чином, послідовності ITR, які фактично містяться у векторі зкДНК, який продукується з зкДНК-плазмиди або іншого експресійного конструкту, можуть бути або не бути ідентичними послідовностям ITR, які пропонуються авторами, в результаті природних змін, які відбуваються під час процесу продукування (наприклад, помилки реплікації).

У деяких варіантах втілення описаний авторами вектор зкДНК, який включає експресійну касету з трансгеном, який може бути, наприклад, регуляторною послідовністю, послідовністю, яка кодує нуклеїнову кислоту (наприклад, такою, як miR або антисмислова послідовність), або послідовністю, яка кодує поліпептид (наприклад, такий, як трансген). В одному варіанті втілення трансген може бути функціонально зв'язаним з однією або кількома регуляторними послідовностями, що дозволяє або контролює експресію трансгена. В одному варіанті втілення полінуклеотид включає першу послідовність ITR та другу послідовність ITR, причому потрібна нуклеотидна послідовність по боках має першу та другу фланкуючі послідовності ITR, і перша та друга послідовності ITR є асиметричними відносно одна одної.

В одному варіанті втілення у кожному з цих аспектів експресійна касета розташовується між двома ITR, включених у такому порядку з одним або кількома серед: промотора, функціонально зв'язаного з трансгеном, посттранскрипційного регуляторного елемента та сигналу поліаденілювання та термінації. В одному варіанті втілення промотор є регульованим – індукцибельним або репресованим. Промотор може бути будь-якою послідовністю, яка сприяє транскрипції трансгена. В одному варіанті втілення промотор є CAG промотором (наприклад, SEQ ID NO: 03) або його варіантом. Посттранскрипційний регуляторний елемент є послідовністю, яка модулює експресію трансгена, як необмежувальний приклад – будь-якою послідовністю, яка створює третинну структуру, яка посилює експресію трансгена.

В одному варіанті втілення посттранскрипційний регуляторний елемент включає WPRE (наприклад, SEQ ID NO: 08). В одному варіанті втілення сигнал поліаденілювання та термінації включає BGHполіA (наприклад, SEQ ID NO: 09). Додатково може застосовуватися будь-який цис-регуляторний елемент, відомий фахівцям у даній галузі, або їх комбінація, наприклад, висхідна енхансерна послідовність (USE) пізнього сигналу поліA SV40 або інші елементи посттранскрипційної обробки, включаючи, крім інших, ген тимідинкінази симплексного вірусу герпесу або вірус гепатиту В (HBV). В одному варіанті втілення довжина експресійної касети у напрямку від 5' до 3' є більшою за максимальну довжину яка є інкапсидованою у віріон AAV. В одному варіанті втілення довжина є більшою за 4,6 т.п.н., або більшою за 5 т.п.н., або більшою за 6 т.п.н., або більшою за 7 т.п.н.. Авторами наводяться приклади різних експресійних касет.

Експресійна касета може включати понад 4000 нуклеотидів, 5000 нуклеотидів, 10 000 нуклеотидів або 20 000 нуклеотидів, або 30 000 нуклеотидів, або 40 000 нуклеотидів або 50 000 нуклеотидів, або у будь-якому діапазоні приблизно від 4000 до 10 000 нуклеотидів або від 10 000 до 50 000 нуклеотидів, або більше за 50 000 нуклеотидів. У деяких варіантах втілення експресійна касета може включати трансген або нуклеїнову кислоту завдовжки від 500 до 50 000 нуклеотидів. У деяких варіантах втілення експресійна касета може включати трансген або нуклеїнову кислоту завдовжки від 500 до 75 000 нуклеотидів. У деяких варіантах втілення експресійна касета може включати трансген або нуклеїнову кислоту завдовжки від 500 до 10 000 нуклеотидів. У деяких варіантах втілення експресійна касета може включати трансген або нуклеїнову кислоту завдовжки від 1000 до 10 000 нуклеотидів. У деяких варіантах втілення експресійна касета може включати трансген або нуклеїнову кислоту завдовжки від 500 до 5 000 нуклеотидів. Вектори зкДНК не мають обмежень розміру інкапсидованих AAV векторів, а отже, забезпечують можливість доставлення експресійної касети великого розміру для забезпечення ефективної експресії трансгенів. У деяких варіантах втілення вектор зкДНК є позбавленим характерного для прокаріотів метилування.

Експресійна касета також може включати внутрішню ділянку посадки рибосоми (IRES) та/або елемент 2A. Цис-регуляторні елементи включають, крім іншого, промотор, рибоперемікач, ізолятор, міг-індуцибельний елемент, посттранскрипційний регуляторний елемент, специфічний до типу тканини та клітини промотор та енхансер. У деяких варіантах втілення ITR може діяти як промотор для трансгена. У деяких варіантах втілення вектор зкДНК включає додаткові компоненти для

регулювання експресії трансгена, наприклад, регулюючі перемикачі, які описуються авторами у розділі під назвою "Регулюючі перемикачі", для контролювання та регулювання експресії трансгена і може у разі потреби включати регулюючий перемикач, який є блокуючим перемикачем для забезпечення можливості контрольованої смерті клітини, яка включає вектор зкДНК.

Фіг. 1А - 1С схематично показують необмежувальні приклади векторів зкДНК або відповідні послідовності плазмід зкДНК. Вектори зкДНК є безкапсидними і можуть бути одержані з плазмиди, яка кодує у такому порядку: перший ITR, касету трансгена, що піддається експресії, та другий ITR, причому принаймні одна серед першої та/або другої послідовностей ITR є мутованою відносно відповідної послідовності ITR AAV2 дикого типу. Касета трансгена, що піддається експресії, в оптимальному варіанті включає один або декілька елементів у такому порядку: енхансер/промотор, репортер ORF (трансген), посттранскрипційний регуляторний елемент (наприклад, WPRE) та сигналу поліаденілування та термінації (наприклад, PolyA BGH).

Експресійна касета може включати будь-який потрібний трансген. До потрібних трансгенів відносяться, крім інших, нуклеїнові кислоти, які кодують поліпептиди, або некодуєчі нуклеїнові кислоти (наприклад, РНКі, міР і т. ін.), в оптимальному варіанті терапевтичні (наприклад, для медичного, діагностичного або ветеринарного застосування) або імуногенні (наприклад, для вакцин) поліпептиди. У деяких варіантах втілення трансгени в експресійній касеті кодують один або декілька поліпептидів, пептидів, рибозимів, пептидних нуклеїнових кислот, міРНК, РНКі, антисмислових олігонуклеотидів, антисмислових полінуклеотидів, антитіл, антиген-зв'язувальних фрагментів або будь-яку їх комбінацію. У деяких варіантах втілення трансген є терапевтичним геном або маркерним білком. У деяких варіантах втілення трансген є агоністом або антагоністом. У деяких варіантах втілення антагоніст є міметиком або антитілом або фрагментом антитіла або його антиген-зв'язувальним фрагментом, наприклад, нейтралізуючим антитілом або фрагментом антитіла і т. ін. У деяких варіантах втілення трансген кодує антитіло, включаючи антитіло повної довжини або фрагмент антитіла, як визначено авторами. У деяких варіантах втілення антитіло є антиген-зв'язувальним доменом або послідовністю варіабельного домену імуноглобуліну, як визначено авторами.

Зокрема, трансген може кодувати один або декілька терапевтичних агентів, включаючи, крім інших, наприклад, білки, поліпептиди, пептиди, ферменти, антитіла, антиген-зв'язувальні фрагменти, а також їх варіанти та/або активні фрагменти, для застосування у лікуванні, профілактиці та/або послабленні одного або декількох симптомів хвороби, дисфункції, пошкодження та/або порушення. Типові трансгени описуються авторами у розділі під назвою "Спосіб лікування".

Існує багато структурних особливостей векторів зкДНК, які відрізняються від векторів експресії на плазмідній основі. Вектори зкДНК можуть мати одну або декілька таких особливостей: відсутність первісної (тобто, не вставленої) бактеріальної ДНК, відсутність прокаріотного джерела реплікації, самодостатність, тобто, вони не потребують будь-яких послідовностей, крім двох ITR, включаючи сайти Рер-зв'язування та кінцевого розділення (RBS та TRS), та екзогенної послідовності між ITR, присутність послідовності ITR, яка утворює шпильки, еукаріотного походження (тобто, вони продукуються в еукаріотних клітинах), а також відсутність метилування ДНК бактеріального типу або взагалі будь-якого іншого метилування, яке вважається аномальним організмом-хазяїном ссавця. В цілому в оптимальному варіанті дані вектори не містять будь-яких прокаріотних ДНК, але передбачається, що деякі прокаріотні ДНК можуть бути вставлені як екзогенна послідовність, як необмежувальний приклад у промоторній або енхансерній ділянці. Ще однією важливою особливістю, яка відрізняє вектори зкДНК від плазмідних експресійних векторів, є те, що вектори зкДНК є одноланцюговими лінійними ДНК, які мають закриті кінці, тоді як плазмиди завжди є дволанцюговими ДНК.

Вектори зкДНК, які утворюють запропонованими авторами винаходу способами, в оптимальному варіанті мають лінійну й безперервну структуру, а не переривчасту структуру, як визначено шляхом аналізу з розщепленням рестрикційним ферментом (Фіг. 4D). Вважається, що лінійна та безперервна структура є стійкішою до атак клітинних ендонуклеаз, а також з меншою ймовірністю рекомбінується й викликає мутагенез. Таким чином, вектор зкДНК у лінійній та безперервній структурі є оптимальним варіантом втілення. Безперервний, лінійний, одноланцюговий внутрішньомолекулярний дуплексний вектор зкДНК може мати ковалентно зв'язані термінальні кінці, без послідовностей, які кодують капсидні білки AAV. Ці вектори зкДНК є структурно відмінними від плазмід (включаючи плазмиди зкДНК, описані авторами), які є циклічними молекулами дуплексних нуклеїнових кислот бактеріального походження. Комплементарні ланцюги плазмід можуть бути розділені після денатурації для утворення двох молекул нуклеїнових кислот, тоді як вектори зкДНК, маючи комплементарні ланцюги, є єдиною молекулою ДНК і, таким чином, навіть будучи денатурованими, залишаються єдиною молекулою. У деяких варіантах втілення вектори зкДНК, як описується авторами, можуть бути одержані без метилування основи ДНК прокаріотного типу, на відміну від плазмід. Таким чином, вектори зкДНК та зкДНК-плазмиди є відмінними як щодо структури (зокрема, лінійної на відміну від кільцевої), так і щодо способів, які застосовують для одержання та очищення цих різних об'єктів (див. нижче), а також з огляду на метилування їхньої ДНК, що відноситься до прокаріотного типу для зкДНК-плазмід й еукаріотного типу для вектора зкДНК.

Декілька переваг описаного авторами вектора зкДНК перед векторами експресії на плазмідній основі включають, крім інших, такі: 1) плазмиди містять послідовності бактеріальних ДНК і піддаються

прокаріотно-специфічному метилуванню, наприклад, метилуванню 6-метиладенозину та 5-метилцитозину, тоді як послідовності безкапсидного AAV вектора мають еукаріотне походження і не піддаються прокаріотно-специфічному метилуванню; в результаті безкапсидні AAV вектори з меншою ймовірністю викликають запальні та імунні реакції у порівнянні з плазмідами; 2) якщо плазміді вимагають присутності гена резистентності протягом процесу продукування, вектори зкДНК цього не вимагають; 3) якщо кільцева плазмідна не доставляється у ядро після введення у клітину і вимагає перевагання для уникнення розщеплення клітинними нуклеазами, вектори зкДНК містять вірусні цис-елементи, тобто, ITR, які надають резистентності до нуклеаз і можуть бути призначені для спрямування та доставлення у ядро. Існує припущення, що мінімальними визначальними елементами, які є незамінними для функціонування ITR, є Сайт Реп-зв'язування (RBS; 5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3' (SEQ ID NO: 531) для AAV2) та сайт кінцевого розділення (TRS; 5'-AGTTGG-3' (SEQ ID NO: 48) для AAV2) плюс варіабельна паліндромна послідовність, яка забезпечує можливість утворення шпильки; і 4) вектори зкДНК не мають перепредставлення динуклеотидів CpG, які часто містяться у плазмідах прокаріотного походження, про які відомо, що вони зв'язуються з представником Toll-подібної родини рецепторів, викликаючи опосередковану Т-клітинами імунну реакцію. Натомість описані авторами трансдукції безкапсидними AAV векторами можуть ефективно спрямовуватися на типи клітин та тканин, які важко піддаються трансдукції традиційними AAV віріонами з застосуванням різних реагентів доставлення.

ITR

Як розкривається авторами, вектори зкДНК містять гетерологічний ген, розташований між двома послідовностями інвертованих кінцевих повторів (ITR), які відрізняються один від одного (тобто, є асиметричними ITR). У деяких варіантах втілення принаймні один з ITR є модифікованим шляхом делеції, вставки та/або заміщення у порівнянні з послідовністю ITR дикого типу (наприклад, ITR AAV); і принаймні один з ITR включає функціональний сайт зв'язування Реп (RBS; наприклад, 5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3' для AAV2, SEQ ID NO: 531) та функціональний сайт кінцевого розділення (TRS; наприклад, 5'-AGTT-3', SEQ ID NO: 46.) В одному варіанті втілення принаймні один з ITR є нефункціональним ITR. В одному варіанті втілення різні ITR не є обидва ITR дикого типу з різних сіротипів.

Хоча ITR, представлені в описі та Прикладах, являють собою ITR AAV2, фахівцю у даній галузі стане зрозуміло, що, як зазначено вище, можна використовувати ITR з будь-якого відомого парвовірусу, наприклад, депендовірусу, такого, як AAV (наприклад, геном AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV 5, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV 11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAV-DJ та AAV-DJ8. Наприклад, NCBI: NC 002077; NC 001401; NC001729; NC001829; NC006152; NC 006260; NC 006261), химерні ITRs або ITR з будь-якого синтетичного AAV. У деяких варіантах втілення AAV може інфікувати теплокровних тварин, наприклад, аденоасоційовані віруси птахів (AAAV), великої рогатої худоби (BAAV), собачих, коней та овець. У деяких варіантах втілення ITR є взятим з парвовірусу B19 (Номер доступу в GenBank NC 000883), дрібного вірусу мишей (MVM) (Номер доступу в GenBank NC 001510); гусячого парвовірусу (Номер доступу в GenBank NC 001701); зміїного парвовірусу 1 (Номер доступу в GenBank NC 006148).

У деяких варіантах втілення послідовність ITR може бути взята з вірусів родини Parvoviridae, яка включає дві підродини: Parvovirinae, які інфікують хребетних, та Densovirinae, які інфікують комах. Підродина Parvovirinae (яка називається парвовірусами) включає рід Dependovirus, представники якого за більшості умов вимагають коінфекції хелперним вірусом, таким, як аденовірус або вірус герпесу, для продуктивної інфекції. Рід Dependovirus включає аденоасоційований вірус (AAV), який зазвичай інфікує людину (наприклад, сіротипи 2, 3A, 3B, 5 та 6) або приматів (наприклад, сіротипи 1 та 4), та споріднені віруси, які інфікують інших теплокровних тварин (наприклад, аденоасоційовані віруси великої рогатої худоби, собачих, коней та овець). Парвовіруси та інші представники родини Parvoviridae в цілому описуються у публікації Kenneth I. Berns, "Parvoviridae: The Viruses and Their Replication," Chapter 69 in *FIELDS VIROLOGY* (3d Ed. 1996).

Фахівцям у даній галузі відомо, що послідовності ITR мають спільну дволанцюгову структуру Холідея, яка зазвичай є Т-подібною або Y-подібною шпильковою структурою (див. наприклад, Фіг. 2A та Фіг. 3A), де кожен ITR утворюється двома паліндромними плечима або петлями (B-B' та C-C'), включеними у більше паліндромне плече (A-A'), та одноланцюговою D послідовністю (де порядок цих паліндромних послідовностей визначає фліп- або флоп-орієнтацію ITR), можна легко визначити відповідні модифіковані послідовності ITR будь-якого сіротипу AAV для застосування у векторі зкДНК або зкДНК-плазміді на основі типової послідовності ITR AAV2, представлені авторами. Див., наприклад, структурний аналіз та порівняння послідовностей ITR з різних сіротипів AAV (AAV1-AAV6), описаний у публікаціях 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.

Конкретні зміни та мутації в ITR детально описуються авторами, але в контексті ITR "змінений" або "мутований" означає, що нуклеотиди були вставленими, делетованими та/або заміщеними відносно послідовності дикого типу, контрольної або первісної послідовності ITR і можуть бути змінені відносно іншого фланкуючого ITR у векторі зкДНК, який має два фланкуючі ITR. Змінений або мутований ITR може бути підданим інженерії ITR. У контексті цього опису "підданий інженерії" стосується аспекту здійснення маніпуляцій з боку людини. Наприклад, поліпептид вважається "підданим інженерії", якщо

принаймні один аспект поліпептиду, наприклад, його послідовність, було піддано маніпуляції з боку людини таким чином, щоб він відрізнявся від аспекту, який існує у природі.

У деяких варіантах втілення ITR може бути синтетичним. В одному варіанті втілення синтетичний ITR створюється на основі послідовності ITR з більш ніж одного сіротипу AAV. В іншому варіанті втілення синтетичний ITR не включає жодної послідовності на основі AAV. У ще одному варіанті втілення синтетичний ITR зберігає структуру ITR, описану вище, хоча не має послідовностей з AAV або має лише деякі з них. У деяких аспектах а синтетичний ITR може преференційно взаємодіяти з Rep дикого типу або Rep конкретного сіротипу, або у деяких випадках не розпізнається Rep дикого типу, а розпізнається лише мутованим Rep.

Послідовності ITR мають спільну дволанцюгову структуру Холідея, яка зазвичай є Т-подібною або Y-подібною шпильковою структурою (див., наприклад, Фіг. 2А та Фіг. 3А), де кожен ITR утворюється двома паліндромними плечима або петлями (В-В' та С-С'), включеними у більше паліндромне плече (А-А'), та одноланцюговою D послідовністю (де порядок цих паліндромних послідовностей визначає фліп- або флоп-орієнтацію ITR). Фахівець у даній галузі зможе легко визначити послідовності ITR або модифіковані послідовності ITR будь-якого сіротипу AAV для застосування у векторі зкДНК або зкДНК-плазміді на основі типової послідовності ITR AAV2, представленої авторами. Див., наприклад, порівняння послідовностей ITR із різних сіротипів AAV (AAV1-AAV6 й AAV птахів (AAAV) й AAV великої рогатої худоби (BAAV)), які описуються у публікації Grimm et al., J. Virology, 2006; 80(1); 426 - 439; які демонструють% ідентичності лівого ITR AAV2 з лівим ITR з інших сіротипів: AAV-1 (84 %), AAV-3 (86 %), AAV-4 (79 %), AAV-5 (58 %), AAV-6 (лівий ITR) (100 %) та AAV-6 (правий ITR) (82 %).

Відповідно, хоча ITR AAV2 використовуються як типові ITR в описаних авторами векторах зкДНК, описаний авторами вектор зкДНК може бути одержаний з застосуванням або на основі ITR будь-якого відомого сіротипу AAV, включаючи, наприклад, сіротип 1 AAV (AAV1), сіротип 2 AAV (AAV2), сіротип 4 AAV (AAV4), сіротип 5 AAV (AAV5), сіротип 6 AAV (AAV6), сіротип 7 AAV (AAV7), сіротип 8 AAV (AAV8), сіротип 9 AAV (AAV9), сіротип 10 AAV (AAV10), сіротип 11 AAV (AAV11) або сіротип 12 AAV (AAV12). Фахівець у даній галузі зможе визначити відповідну послідовність в інших сіротипах відомими засобами. Наприклад, визначивши, чи відбувається зміна у ділянці А, А', В, В', С, С' чи D, і визначивши відповідну ділянку в іншому сіротипі. Можна скористатися BLAST® (Basic Local Вирівнювання Search Tool) або іншими програмами вирівнювання ділянок гомології у стані за замовчуванням для визначення відповідної послідовності. Винахід також забезпечує популяції та множини векторів зкДНК, які включають ITR з комбінації різних сіротипів AAV – тобто, один ITR може бути з одного сіротипу AAV, а інший ITR може бути з іншого сіротипу. Без прив'язування до конкретної теорії, в одному варіанті втілення один ITR може бути взятий або одержаний на основі послідовності ITR AAV2, а інший ITR вектора зкДНК може бути взятий або одержаний на основі будь-якої однієї або декількох послідовностей ITR сіротипу 1 AAV (AAV1), сіротипу 4 AAV (AAV4), сіротипу 5 AAV (AAV5), сіротипу 6 AAV (AAV6), сіротипу 7 AAV (AAV7), сіротипу 8 AAV (AAV8), сіротипу 9 AAV (AAV9), сіротипу 10 AAV (AAV10), сіротипу 11 AAV (AAV11) або сіротип 12 AAV (AAV12).

Будь-який парвовірус ITR може застосовуватись як ITR або як базовий ITR для модифікації. В оптимальному варіанті парвовірус є депендовірусом. У ще кращому варіанті – AAV. Вибраний сіротип може ґрунтуватися на тканинному тропізмі сіротипу. AAV2 має широкий тканинний тропізм, AAV1 преференційно спрямовується на нейрони та скелетні м'язи, а AAV5 преференційно спрямовується на нейрони, пігментні клітини епітелію сітківки та фоторецептори. AAV6 преференційно спрямовується на скелетні м'язи та легені. AAV8 преференційно спрямовується на печінку, скелетні м'язи, серце та підшлункові тканини. AAV9 преференційно спрямовується на печінку, скелетну та легеневу тканину. В одному варіанті втілення модифікований в основі ITR лежить ITR AAV2. Наприклад, він є вибраним з групи, до якої відносяться: SEQ ID NO:2 і SEQ ID NO:52. В одному варіанті втілення кожного з цих аспектів векторний полінуклеотид включає пару ITR, вибрану з групи, до якої відносяться: SEQ ID NO: 1 і SEQ ID NO: 52; і SEQ ID NO: 2 і SEQ ID NO: 51. В одному варіанті втілення кожного з цих аспектів векторний полінуклеотид або невірусні, безкапсидні ДНК-вектори з ковалентно закритими кінцями включають пару різних ITR, вибраних з групи, до якої відносяться: SEQ ID NO: 101 і SEQ ID NO: 102; SEQ ID NO: 103, і SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, і SEQ ID NO: 106; SEQ ID NO: 107, і SEQ ID NO: 108; SEQ ID NO: 109, і SEQ ID NO: 110; SEQ ID NO: 111, і SEQ ID NO: 112; SEQ ID NO: 113 і SEQ ID NO: 114; і SEQ ID NO: 115 і SEQ ID NO: 116. У деяких варіантах втілення модифікований ITR є вибраним серед ITR або часткових послідовностей ITR SEQ ID NO: 2, 52, 63, 64, 101-499 або 545-547.

У деяких варіантах втілення вектор зкДНК може включати ITR з модифікацією в ITR, яка відповідає будь-якій з модифікацій у послідовностях ITR або часткових послідовностях ITR показаних у будь-яких одній або декількох представлених авторами Таблицях 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10А та 10В, або послідовностях, показаних на Фіг. 26А або 26В.

У деяких варіантах втілення зкДНК може утворювати внутрішньомолекулярну дуплексну вторинну структуру. Вторинна структура першого ITR та асиметричний другий ITR наводяться для прикладу у контексті ITR дикого типу (див., наприклад, ФІГУРИ 2А, 3А, 3С) та модифікованих структур ITR (див. наприклад, Фіг. 2В та ФІГУРИ 3В, 3Д). Вторинні структури виводять або прогнозують на основі послідовностей ITR плазмід, яку застосовують для одержання вектора зкДНК. Типові вторинні структури модифікованих ITR, у яких частина структури "петля на стеблі" є видаленою, показано на ФІГУРАХ 9А - 25В та ФІГУРАХ 26А - 26В, а також показано у Таблицях 10А та 10В. Типові вторинні

структури модифікованих ITR, які включають єдине стебло та дві петлі, показано на ФІГУРАХ 9А - 13В. Типову вторинну структуру модифікованого ITR з єдиним стеблом та єдиною петлею показано на Фіг. 14. У деяких варіантах втілення вторинна структура може бути виведена, як показано авторами, з застосуванням термодинамічних способів на основі правил найближчих сусідів, які дозволяють прогнозувати стійкість структури, яку кількісно визначають шляхом складання зміни термодинамічного потенціалу. Наприклад, структура може бути спрогнозована шляхом знаходження структури з найнижчим термодинамічним потенціалом. У деяких варіантах втілення застосовують алгоритм, описаний у публікації Reuter, J. S., & Mathews, D. H. (2010) RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. BMC Bioinformatics. 11,129 і втілений у програмі RNAstructure (за адресою у всесвітній мережі: ["rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/index.html"](http://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/index.html)), для прогнозування структури ITR. Алгоритм також може включати як параметри зміни термодинамічного потенціалу при 37°C, так і параметри зміни ентальпії, взяті з експериментальної літератури, що дозволяє прогнозувати конформаційну стійкість за довільної температури. З застосуванням програми визначення структури РНК деякі з модифікованих структур ITR можуть бути спрогнозовані як Т-подібні структури "петля на стеблі" з розрахунковою вільною енергією Гіббса (ΔG) розгортання за фізіологічних умов, як показано на ФІГУРАХ 3А - 3D. З застосуванням програми визначення структури РНК прогнозують три нижчезазначені типи модифікованих ITR, у яких вільна енергія Гіббса при розгортанні є вищою у порівнянні з ITR AAV2 дикого типу (-92,9 ккал/моль): (а) запропоновані авторами модифіковані ITR зі структурою одне плече/одна непарна петля за прогнозом мають вільну енергію Гіббса при розгортанні від -85 до -70 ккал/моль; (б) запропоновані авторами модифіковані ITR з єдиною шпильковою структурою за прогнозом мають вільну енергію Гіббса при розгортанні від -70 до -40 ккал/моль; (в) запропоновані авторами модифіковані ITR зі структурою з двома плечима за прогнозом мають вільну енергію Гіббса при розгортанні від -90 до -70 ккал/моль. Без прив'язування до будь-якої теорії, структури з вищою вільною енергією Гіббса легше розгортаються для реплікації реплікаційними білками Rep 68 або Rep 78. Таким чином, модифіковані ITR, які мають вищу вільну енергію Гіббса при розгортанні, наприклад, зі структурою одне плече/одна непарна петля, єдиною шпильковою структурою або зрізаною структурою, зазвичай реплікуються ефективніше у порівнянні з ITR дикого типу.

В одному варіанті втілення лівий ITR вектора зкДНК є модифікованим або мutowаним відносно структури ITR AAV дикого типу (wt), а правий ITR являє собою ITR AAV дикого типу. В одному варіанті втілення правий ITR вектора зкДНК є модифікованим відносно структури ITR AAV дикого типу, а лівий ITR являє собою ITR AAV дикого типу. У такому варіанті втілення модифікація ITR (наприклад, лівий або правий ITR) може бути генерована шляхом делеції, вставки або заміщення одного або декількох нуклеотидів з ITR дикого типу, одержаного з геному AAV.

ITR, які застосовуються згідно з даним винаходом, можуть піддаватися або не піддаватися розкладанню, і для застосування у векторах зкДНК в оптимальному варіанті вибирають послідовності AAV, причому перевагу віддають сіротипам 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 і 9. ITR AAV, які піддаються розкладанню, не вимагають послідовності ITR дикого типу (наприклад, ендегенна або дикого типу послідовність ITR AAV може бути змінена шляхом вставки, делеції, зрізання та/або міссенс-мутацій), якщо кінцевий повтор опосередковує потрібні функції, наприклад, реплікацію, упаковку вірусу, інтеграцію та/або рятування провірусу і т. ін. Зазвичай, але не обов'язково, ITR відносяться до одного сіротипу AAV, наприклад, а послідовності ITR вектора зкДНК є взятими з AAV2. ITR можуть бути синтетичними послідовностями, які функціонують як інвертовані кінцеві повтори AAV, такі як "послідовність дубль-D", як описується у патенті США № 5,478,745, виданому Samulski et al. Хоча це не обов'язково, ITR можуть бути взяті з одного парвовірусу, наприклад, обидві послідовності ITR є взятими з AAV2.

В одному варіанті втілення зкДНК може включати структуру ITR, яка є мutowаною відносно одного з описаних авторами ITR дикого типу, але в якій мutowаний або модифікований ITR все одно зберігає функціональний сайт зв'язування Rep (RBE або RBE') та сайт кінцевого розділення (trs). В одному варіанті втілення мутантний зкДНК ITR включає функціональний сайт білка реплікації (RPS-1), і у продукуванні використовується здатний до реплікації білок, який зв'язується з сайтом RPS-1.

В одному варіанті втілення принаймні один з ITR є дефектним ITR щодо зв'язування та/або нікування Rep. В одному варіанті втілення дефект складає принаймні 30% відносно редукційного ITR дикого типу, в інших варіантах втілення він складає принаймні 35%..., 50%..., 65%..., 75%..., 85%..., 90%..., 95%..., 98%..., або повністю є позбавленим функції, або має будь-який проміжний показник. Клітини-хазяїни не експресують вірусні капсидні білки, і полінуклеотидна векторна матриця є позбавленою будь-яких кодуєчих послідовностей вірусного капсиду. В одному варіанті втілення полінуклеотидні векторні матриці та клітини-хазяїни є позбавленими капсидних генів AAV, і утворений в результаті білок також не кодує і не експресує капсидні гени інших вірусів. Крім того, у конкретному варіанті втілення молекула нуклеїнової кислоти також є позбавленою кодуєчих послідовностей Rep-білка AAV.

У деяких варіантах втілення структурний елемент ITR може бути будь-яким структурним елементом, який бере участь у функціональній взаємодії ITR з великим Rep-білком (наприклад, Rep 78 або Rep 68). У деяких варіантах втілення структурний елемент забезпечує селективність взаємодії ITR з великим Rep-білком, тобто, принаймні частково визначає, який Rep-білок функціонально

взаємодіє з ITR. В інших варіантах втілення структурний елемент фізично взаємодіє з великим Рер-білком, коли Рер-білок є зв'язаним з ITR. Кожен структурний елемент може бути, наприклад, вторинною структурою ITR, нуклеотидною послідовністю ITR, проміжком між двома або більшою кількістю елементів або комбінацією будь-яких з вищезазначених прикладів. В одному варіанті втілення структурні елементи є вибраними з групи, до якої відносяться плече А і А', плече В і В', плече С і С', плече D, сайт зв'язування Рер (RBE) і RBE' (тобто, комплементарна послідовність RBE) та сайт кінцевого розділення (trs).

Більше конкретно, здатність структурного елемента до функціональної взаємодії з конкретним Рер-білком може бути змінена шляхом модифікації структурного елемента. Наприклад, нуклеотидна послідовність структурного елемента може бути модифікована у порівнянні з послідовністю ITR дикого типу. В одному варіанті втілення структурний елемент (наприклад, плече А, плече А', плече В, плече В', плече С, плече С', плече D, RBE, RBE' та trs) ITR може бути видалений і замінений на структурний елемент дикого типу з іншого парвовірусу. Наприклад, замінна структура може бути взята з AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, змійного парвовірусу (наприклад, парвовірусу королівського пітона), парвовірусу великої рогатої худоби, парвовірусу кози, парвовірусу птахів, парвовірусу собачих, парвовірусу коней, парвовірусу креветок, парвовірусу свиней або AAV комах. Наприклад, ITR може бути ITR AAV2, і плече А або А' або RBE може бути заміщеним структурним елементом з AAV5. В іншому прикладі ITR може бути ITR AAV5, і плечі С або С', RBE та trs можуть бути замінені на структурний елемент з AAV2. В іншому прикладі ITR AAV може бути ITR AAV5 з плечима В і В', замінені на плечі В і В' ITR AAV2.

Лише для прикладу у Таблиці 1 показано типові модифікації принаймні одного нуклеотиду (наприклад, делеція, вставка та/або заміщення) у ділянках модифікованих ITR, де Х вказує на модифікацію принаймні однієї нуклеїнової кислоти (наприклад, делецію, вставку та/або заміщення) у цьому відрізку відносно відповідного ITR дикого типу. У деяких варіантах втілення будь-яка модифікація принаймні одного нуклеотиду (наприклад, делеція, вставка та/або заміщення) у будь-якій з ділянок С і/або С' і/або В і/або В' зберігає три послідовні Т-нуклеотиди (тобто, ТТТ) у принаймні одній кінцевій петлі. Наприклад, якщо в результаті модифікації утворюється будь-яка з таких послідовностей: ITR з одним плечем (наприклад, одне плече С-С' або одне плече В-В'), або модифіковане плече С-В' або плече С'-В, або ITR з двома плечима, причому принаймні одне плече є зрізаним (наприклад, зрізане плече С-С' і/або зрізане плече В-В'), принаймні єдине плече або принаймні одне з плечей ITR з двома плечима (де одне плече може бути зрізаним) зберігає три послідовні Т-нуклеотиди (тобто, ТТТ) у принаймні одній кінцевій петлі. У деяких варіантах втілення зрізане плече С-С' і/або зрізане плече В-В' має три послідовні Т-нуклеотиди (тобто, ТТТ) у кінцевій петлі.

Таблиця 1: Типові комбінації модифікацій принаймні одного нуклеотиду (наприклад, делеція, вставка та/або заміщення) в різних ділянках В-В' і С-С' або плечах ITR (Х означає нуклеотидну модифікацію, наприклад, додавання, делецію або заміщення принаймні одного нуклеотиду в ділянці).

Таблиця 1

В-ділянка	В'-ділянка	С-ділянка	С'-ділянка
Х			
	Х		
Х	Х		
		Х	
			Х
		Х	Х
Х		Х	
Х			Х
	Х	Х	
	Х		Х
Х	Х	Х	
Х	Х		Х
Х		Х	Х
	Х	Х	Х
Х	Х	Х	Х

У деяких варіантах втілення модифікований ITR для застосування згідно з винаходом може включати будь-яку з комбінацій модифікацій, показаних у Таблиці 1, а також модифікацію принаймні одного нуклеотиду у будь-якій одній або декількох ділянках, вибраних серед таких позицій: між А' і С, між С і С', між С' і В, між В і В' і між В' і А. У деяких варіантах втілення будь-яка модифікація принаймні одного нуклеотиду (наприклад, делеція, вставка та/або заміщення) у ділянках С або С' або В або В' все одно зберігає кінцеву петлю структури "петля на стеблі". У деяких варіантах втілення будь-яка модифікація принаймні одного нуклеотиду (наприклад, делеція, вставка та/або заміщення) між С і С' і/або В і В' зберігає три послідовні Т-нуклеотиди (тобто, ТТТ) у принаймні одній кінцевій петлі.

петлі. В альтернативних варіантах втілення будь-яка модифікація принаймні одного нуклеотиду (наприклад, делеція, вставка та/або заміщення) між С і С' і/або В і В' зберігає три послідовні А нуклеотиди (тобто, ААА) у принаймні одній кінцевій петлі. У деяких варіантах втілення модифікований ITR для застосування згідно з винаходом може включати будь-яку з комбінацій модифікацій, показаних у Таблиці 1, а також модифікацію принаймні одного нуклеотиду (наприклад, делецію, вставку та/або заміщення) у будь-яких одній або декількох ділянках, вибраних серед: А', А та/або D. Наприклад, у деяких варіантах втілення модифікований ITR для застосування згідно з винаходом може включати будь-яку з комбінацій модифікацій, показаних у Таблиці 1, а також модифікацію принаймні одного нуклеотиду (наприклад, делецію, вставку та/або заміщення) у ділянці А. У деяких варіантах втілення модифікований ITR для застосування згідно з винаходом може включати будь-яку з комбінацій модифікацій, показаних у Таблиці 1, а також модифікацію принаймні одного нуклеотиду (наприклад, делецію, вставку та/або заміщення) у ділянці А'. У деяких варіантах втілення модифікований ITR для застосування згідно з винаходом може включати будь-яку з комбінацій модифікацій, показаних у Таблиці 1, а також модифікацію принаймні одного нуклеотиду (наприклад, делецію, вставку та/або заміщення) у ділянці А та/або А'. У деяких варіантах втілення модифікований ITR для застосування згідно з винаходом може включати будь-яку з комбінацій модифікацій, показаних у Таблиці 1, а також модифікацію принаймні одного нуклеотиду (наприклад, делецію, вставку та/або заміщення) у ділянці D.

В одному варіанті втілення нуклеотидна послідовність структурного елемента може бути модифікована (наприклад, шляхом модифікації 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 або 20 або більше нуклеотидів або будь-якої кількості в цих межах) для одержання модифікованого структурного елемента. В одному варіанті втілення авторами наводяться конкретні модифікації в ITR (наприклад, SEQ ID NO: 2, 52, 63, 64, 101 - 499 або 545 - 547). У деяких варіантах втілення ITR може бути модифікований (наприклад, шляхом модифікації 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 або 20 або більше нуклеотидів або будь-якої кількості в цих межах). В інших варіантах втілення ITR може мати принаймні 80%, принаймні 85%, принаймні 90%, принаймні 95%, принаймні 96%, принаймні 97%, принаймні 98%, принаймні 99% або більше ідентичності послідовності з одним з модифікованих ITR SEQ ID NO: 469 - 499 або 545 - 547 або RBE-вмісним відрізком плеча А-А' та плечей С-С' та В-В' SEQ ID NO: 101 - 134 або 545 - 547.

У деяких варіантах втілення модифікований ITR може включати, наприклад, видалення або делецію всього конкретного плеча, наприклад, усього або частини плеча А-А', або усього або частини плеча В-В' або усього або частини плеча С-С', або, в альтернативному варіанті, видалення 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або більше пар основ, які утворюють стебло петлі, якщо кінцева петля, що кепує стебло (наприклад, єдине плече), ще є присутньою (наприклад, див. ITR-6). У деяких варіантах втілення модифікований ITR може включати видалення 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або більше пар основ з плеча В-В'. У деяких варіантах втілення модифікований ITR може включати видалення 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або більше пар основ з плеча С-С'. У деяких варіантах втілення модифікований ITR може включати видалення 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або більше пар основ з плеча С-С' та видалення 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або більше пар основ з плеча В-В'. Передбачається будь-яка комбінація видалення пар основ, наприклад, 6 пар основ можуть бути видалені у плечі С-С' і 2 пари основ у плечі В-В'. Як пояснювальний приклад ФІГУРИ 13А - 13В показують типовий модифікований ITR з принаймні 7 парами основ, делетованих з кожної серед С-частини та С'-частини, заміщення нуклеотиду у петлі між ділянками С і С' і делеція принаймні однієї пари основ з кожної з ділянок В та В' таким чином, щоб модифікований ITR включав два плеча, причому принаймні одне плече (наприклад, С-С') є зрізаним. У цьому прикладі слід зазначити, що оскільки модифікований ITR включає делецію принаймні однієї пари основ з кожної з ділянок В і В', плече В-В' також є зрізаним відносно ITR дикого типу.

У деяких варіантах втілення, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або більше комплементарних пар основ видаляються з кожної серед С-частини та С'-частини плеча С-С' таким чином, що плече С-С' є зрізаним. Тобто, якщо основа видаляється у С-частині плеча С-С', комплементарну пару основ у частині С' видаляють, таким чином, зрізаючи плече С-С'. У таких варіантах втілення 2, 4, 6, 8 або більше пар основ видаляються з плеча С-С' таким чином, що плече С-С' є зрізаним. В альтернативних варіантах втілення 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або більше пар основ видаляються з С-частини плеча С-С' таким чином, що залишається лише С'-частина плеча. В альтернативних варіантах втілення 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або більше пар основ видаляються з С'-частини плеча С-С' таким чином, що залишається лише С-частина плеча.

У деяких варіантах втілення, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або більше комплементарних пар основ видаляються з кожної серед В-частини та В'-частини плеча В-В' таким чином, що плече В-В' є зрізаним. Тобто, якщо основа видаляється у В-частині плеча В-В', комплементарну пару основ у В'-частині видаляють, таким чином, зрізаючи плече В-В'. У таких варіантах втілення 2, 4, 6, 8 або більше пар основ видаляються з плеча В-В' таким чином, що плече В-В' є зрізаним. В альтернативних варіантах втілення 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або більше пар основ видаляються з В-частини плеча В-В' таким чином, що залишається лише В' частина плеча. В альтернативних варіантах втілення 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або більше пар основ видаляються з В'-частини плеча В-В' таким чином, що залишається лише В частина плеча.

У деяких варіантах втілення модифікований ITR може мати від 1 до 50 (наприклад, 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 або 50) нуклеотидних делецій відносно послідовності ITR дикого типу повної довжини. У деяких варіантах втілення модифікований ITR може мати від 1 до 30 нуклеотидних делецій відносно послідовності ITR дикого типу повної довжини. У деяких варіантах втілення модифікований ITR має від 2 до 20 нуклеотидних делецій відносно послідовності ITR дикого типу повної довжини.

У деяких варіантах втілення модифікований ITR утворює дві протилежні асиметричні за довжиною структури "стебло-петля", наприклад, С-С' петля має довжину, відмінну від довжини петлі В-В'. У деяких варіантах втілення, одна з протилежних асиметричних за довжиною структур "стебло-петля" модифікованого ITR має стеблову частину С-С' і/або В-В' в межах від 8 до 10 пар основ завдовжки та петльову частину (наприклад, між С-С' або між В-В'), яка має від 2 до 5 неспарених дезоксирибонуклеотидів. У деяких варіантах втілення одна асиметрична за довжиною структура "стебло-петля" модифікованого ITR має стеблову частину С-С' і/або В-В', меншу за 8 або меншу за 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 пар основ завдовжки, та петльову частину (наприклад, між С-С' або між В-В'), яка має 0-5 нуклеотидів. У деяких варіантах втілення модифікований ITR з асиметричною за довжиною структурою "стебло-петля" має стеблову частину С-С' і/або В-В', меншу за 3 пари основ завдовжки.

У деяких варіантах втілення модифікований ITR не містить будь-яких нуклеотидних делецій у RBE-вмісній частині ділянок А або А', таким чином, щоб не заважати реплікації ДНК (наприклад, зв'язуванню з RBE Rep-білком, або нікуванню у сайті кінцевого розділення). У деяких варіантах втілення модифікований ITR, включений для застосування згідно з винаходом, має одну або декілька делецій у ділянці В, В', С і/або С', як описується авторами. Декілька необмежувальних прикладів модифікованих ITR показано на ФІГУРАХ 9А - 26В.

У деяких варіантах втілення модифікований ITR може включати делецію плеча В-В', таким чином, що плече С-С' зберігається. Наприклад, див. типовий ITR-2 (лівий) й ITR-2 (правий), показані на ФІГУРАХ 9А - 9В й ITR-4 (лівий), й ITR-4 (правий) (ФІГУРИ 11А - 11В). У деяких варіантах втілення модифікований ITR може включати делецію плеча С-С' таким чином, що плече В-В' зберігається. Наприклад, див. типовий ITR-3 (лівий) й ITR-3 (правий), показані на ФІГУРАХ 10А - 10В. У деяких варіантах втілення модифікований ITR може включати делецію плеча В-В' і плеча С-С' таким чином, що єдина структура "стебло-петля" зберігається. Наприклад, див. типовий ITR-6 (лівий) й ITR-6 (правий), показані на ФІГУРАХ 14А - 14В, й ITR-21 й ITR-37. У деяких варіантах втілення модифікований ITR може включати делецію ділянки С' таким чином, що зрізана С-петля та плече В-В' зберігаються. Наприклад, див. типовий ITR-1 (лівий) й ITR-1 (правий), показані на ФІГУРАХ 15А - 15В. Подібним чином у деяких варіантах втілення модифікований ITR може включати делецію ділянки С таким чином, що зрізана С'-петля та плече В-В' зберігаються. Наприклад, див. типовий ITR-5 (лівий), й ITR-5 (правий), показані на ФІГУРАХ 16А - 16В.

У деяких варіантах втілення модифікований ITR може включати делецію пар основ в одній або декількох з таких структур: С-частині, С'-частина, В-частина або В'-частині, таким чином, щоб відбувалося спарювання комплементарних основ між С-В'-частинами та С'-В-частинами для утворення єдиного плеча. Наприклад, див. ITR-10 (правий) й ITR-10 (лівий) (ФІГУРИ 12А-12В).

У деяких варіантах втілення додатково до модифікації в одному або декількох нуклеотидах у ділянках С, С', В і/або В' модифікований ITR для застосування згідно з винаходом може включати модифікацію (наприклад, делецію, заміщення або додавання) принаймні 1, 2, 3, 4, 5, 6 нуклеотидів у будь-яких одній або декількох ділянках, вибраних серед: між А' і С, між С і С', між С' і В, між В і В' і між В' і А. Наприклад, нуклеотид між В' і С у модифікованому правому ITR може бути замінений з пА на G, С або А, або делетований, або один або декілька нуклеотидів можуть бути додані; нуклеотид між С' і В у модифікованому лівому ITR може бути замінений з Т на G, С або А, або делетований, або один або декілька нуклеотидів можуть бути додані.

У деяких варіантах втілення згідно з даним винаходом вектор зкДНК не має модифікованого ITR, який складається з нуклеотидної послідовності, вибраної серед будь-яких із послідовностей: SEQ ID NO: 550 - 557. У деяких варіантах втілення згідно з даним винаходом вектор зкДНК не має модифікованого ITR, який включає нуклеотидну послідовність, вибрану серед будь-яких із послідовностей: SEQ ID NO: 550 - 557.

У деяких варіантах втілення вектор зкДНК включає регулюючий перемикач, як розкривається авторами, та вибраний модифікований ITR, який має нуклеотидну послідовність, вибрану з будь-якої групи, до якої відносяться: SEQ ID NO: 550 - 557.

В іншому варіанті втілення структура структурного елемента може бути модифікована. Наприклад, структурний елемент може мати зміну висоти стебла та/або кількості нуклеотидів у петлі. Наприклад, висота стебла може складати приблизно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 або 9 нуклеотидів або більше, або будь-яке число в цих межах. В одному варіанті втілення висота стебла може складати від приблизно 5 нуклеотидів до приблизно 9 нуклеотидів і функціонально взаємодіє з Rep. В іншому варіанті втілення висота стебла може складати приблизно 7 нуклеотидів і функціонально взаємодіє з Rep. В іншому прикладі петля може мати 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 нуклеотидів або більше, або будь-яке число в цих межах.

В іншому варіанті втілення кількість сайтів зв'язування GAGY або пов'язаних з GAGY сайтів зв'язування у межах RBE або подовженої RBE може бути збільшена або зменшена. В одному прикладі

RBE або подовжена RBE може включати 1, 2, 3, 4, 5 або 6 або більше сайтів зв'язування GAGY або будь-яке число в цих межах. Кожен сайт зв'язування GAGY незалежно може бути саме послідовністю GAGY або послідовністю, подібною до GAGY, якщо послідовність є достатньою для зв'язування з Рер-білком.

В іншому варіанті втілення проміжок між двома елементами (такими, як, крім інших, RBE та шпилька) може бути змінений (наприклад, збільшений або зменшений) для зміни функціональної взаємодії з великим Рер-білком. Наприклад, проміжок може складати приблизно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 або 21 нуклеотид або більше, або будь-яке число в цих межах.

Описаний авторами вектор зкДНК може включати структуру ITR, яка є модифікованою відносно описаної авторами структури ITR AAV2 дикого типу, але зберігає функціональну частину RBE, trs та RBE'. Фіг. 2А та Фіг. 2В показують один можливий механізм дії сайту trs у межах частини структури ITR дикого типу вектора зкДНК. У деяких варіантах втілення вектор зкДНК містить одну або декілька полінуклеотидних послідовностей функціонального ITR, які включають сайт Рер-зв'язування (RBS; 5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3' (SEQ ID NO: 531) для AAV2) та сайт кінцевого розділення (TRS; 5'-AGTT (SEQ ID NO: 46)). У деяких варіантах втілення, принаймні один ITR (дикого типу або модифікований ITR) є функціональним. В альтернативних варіантах втілення, в яких вектор зкДНК включає два модифіковані ITR, які є відмінними або асиметричними відносно один одного, принаймні один модифікований ITR є функціональним, і принаймні один модифікований ITR є нефункціональним.

У деяких варіантах втілення вектор зкДНК не має модифікованого ITR, вибраного з будь-якої послідовності, яка складається або по суті складається з: SEQ ID NO: 500 - 529, як запропоновано авторами. У деяких варіантах втілення вектор зкДНК не має ITR, вибраного з послідовності, вибраної серед SEQ ID NO: 500 - 529.

У деяких варіантах втілення модифікований ITR (наприклад, лівий або правий ITR) вектора зкДНК, як описано авторами, має модифікації у межах петльового плеча, зрізаного плеча або спейсера. Типові послідовності ITR, які мають модифікації у межах петльового плеча, зрізаного плеча або спейсера, є переліченими у Таблиці 2.

У деяких варіантах втілення модифікований ITR (наприклад, лівий або правий ITR) вектора зкДНК, як описано авторами, має модифікації у межах петльового плеча та зрізаного плеча. Типові послідовності ITR, які мають модифікації у межах петльового плеча та зрізаного плеча, є переліченими у Таблиці 3.

У деяких варіантах втілення модифікований ITR (наприклад, лівий або правий ITR) вектора зкДНК, як описано авторами, має модифікації у межах петльового плеча та спейсера. Типові послідовності ITR, які мають модифікації у межах петльового плеча та спейсера, є переліченими у Таблиці 4.

У деяких варіантах втілення модифікований ITR (наприклад, лівий або правий ITR) вектора зкДНК, як описано авторами, має модифікації у межах зрізаного плеча та спейсера. Типові послідовності ITR, які мають модифікації у межах зрізаного плеча та спейсера, є переліченими у Таблиці 5.

У деяких варіантах втілення модифікований ITR (наприклад, лівий або правий ITR) вектора зкДНК, як описано авторами, має модифікації у межах петльового плеча, зрізаного плеча та спейсера. Типові послідовності ITR, які мають модифікації у межах петльового плеча, зрізаного плеча та спейсера, є переліченими у Таблиці 6.

У деяких варіантах втілення ITR (наприклад, лівий або правий ITR) модифіковано таким чином, що він включає найнижчу енергію розгортання ("низькоенергетична структура"). Низька енергія знижуватиме вільну енергію Гіббса у порівнянні з ITR дикого типу. Типові послідовності ITR, які є модифікованими для низької (тобто, зниженої) енергії розгортання, представлено у Таблиці 7 - 9.

У деяких варіантах втілення модифікований ITR є вибраним з будь-якого або з комбінації показаних у Таблиці 2-9, 10А або 10В.

Таблиця 2: послідовності ITR з модифікаціями у петльовому плечі, зрізаному плечі або спейсері. До них відноситься послідовність RBS GCGCGCTCGCTCGCTC (SEQ ID NO: 531) на 5' кінці та комплементарна послідовність RBE' GAGCGAGCGAGCGCGC (SEQ ID NO: 536) на більшості 3' кінця.

Таблиця 2

SEQ ID	Модифікована ділянка	Послідовність	ΔG	№ стр.
135	Зрізане плече	GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCGGCGACCAAGGTGCGCCGAAGC	-73,6	1
136		CCGGGCTGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC		
137		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCGGCGACCAAGGTGCGCCGACAC	-73,7	3
138		CCGGGTGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC		
139		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCGGCGACCAAGGTGCGCCGACGA	-74,2	1
		CCGGTGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-75,7	2
		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCGGCGACCAAGGTGCGCCGACGC		
		AAGTGGGCGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-75,2	1
		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCGGCGACCAAGGTGCGCCGACGC		
		CATGGCGGCGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC		

Таблиця 2

SEQ ID	Модифікована ділянка	Послідовність	ΔG	№ стр.
140		GDCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAGGTCGCCCGAAG ACCGGCTCGCTCACTGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,1	1
141		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACAC ACGTGTGGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-74,2	1
142		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGA CATGTGGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-73,3	2
143		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAGGTCGCCCGAAGC ACGTGTGGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-74,1	1
144		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAGGTCGCCCGAAAC CCGGTTGGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,1	1
145		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAGGTCGCCCGAAGC CATGGCTGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-73,6	1
146		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACAA CCGGTTGGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-73,0	1
147		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACAC CATGGTGGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-73,7	1
148		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGA ACGTTGGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-73,7	1
149		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGC AATTGGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-75,7	1
150		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAGGTCGCCCGAAAA CCGGTTGGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,1	1
151		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAGGTCGCCCGAAG AAGTTCTGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,1	1
152		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAGGTCGCCCGAAGC AATTGCTGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-74,1	1
153		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACAA ACGTTTGGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-73,0	1
154		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGA AATTGGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-73,7	2
155		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAGGTCGCCCGAAGC AATTGCTGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-74,1	1
156		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAGGTCGCCCGAAAC CATGGTTGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,1	1
157		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACAA CATGTTGGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-73,0	1
158		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAGGTCGCCCGAAG ACATGTCTGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,1	2
159		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACAC AATTGTGGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-74,2	1
160		GDCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAGGTCGCCCGAAAA ACGTTTTGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,1	1
161		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAGGTCGCCCGAAAA CATGTTTGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,1	1
162		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAGGTCGCCCGAAAC AATTGTTGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,1	1
163		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAGGTCGCCCGAAG AAATTTCTGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,1	1
164		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACAA AATTTTGGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-73,0	1
165		GDGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAGGTCGCCCGAAAA AATTTTGGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,1	1
166	Спейсер	GCGCGCTCGCTCGCTCGCTGAGGCCGGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGC CCGGGGGGGCTCAGCGAGCGAGCGAGCGCGC	-76,7	1
167		GCGCGCTCGCTCGCTCAATGAGGCCGGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGC CCGGGGGGGCTCATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,9	1

Таблиця 2

SEQ ID	Модифікована ділянка	Послідовність	ΔG	№ стр.
168		GCGCGCTCGCTCGCTCAACGAGGCCGCGGCGACCAAGGTCGCCGACGC CCGGGCGGCGCTCGGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-76,7	1
169		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCGGGCGACCAAGGTCGCCGACGC CCGGGCGGCGCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,9	1
170		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGCGGCCGGGCGACCAAGGTCGCCGACGC CCGGGCGGCGCGCCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-77,3	2
171		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAAGCGGGGCGACCAAGGTCGCCGACGC CCGGGCGGCGCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,8	1
172		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGACCGGCGACCAAGGTCGCCGACGC CCGGGCGGCTCTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-73,1	1
173		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGAGGCCGGGCGACCAAGGTCGCCGACGC CCGGGCGGCGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-74,7	1
174		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGAGGCCGGGCGACCAAGGTCGCCGACGC CCGGGCGGCGCTCGCGAGCGAGCGAGCGCGC	-78,2	2
175		GCGCGCTCGCTCGCTCGCTAAGGCCGGGCGACCAAGGTCGCCGACGC CCGGGCGGCGCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,5	1
176		GCGCGCTCGCTCGCTCGCTGCGGCCGGGCGACCAAGGTCGCCGACGC CCGGGCGGCGCGCCAGCGAGCGAGCGAGCGCGC	-78,8	2
177		GCGCGCTCGCTCGCTCGCTGAAGCGGGGCGACCAAGGTCGCCGACGC CCGGGCGGCGCTTAGCGAGCGAGCGAGCGCGC	-74,3	1
178		GCGCGCTCGCTCGCTCGCTGAGACCGGGCGACCAAGGTCGCCGACGC CCGGGCGGCTCTAGCGAGCGAGCGAGCGCGC	-74,6	1
179		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGAGGCCGGGCGACCAAGGTCGCCGACGC CCGGGCGGCGCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-76,9	1
180		GCGCGCTCGCTCGCTCGATAAGGCCGGGCGACCAAGGTCGCCGACGC CCGGGCGGCGCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,4	1
181		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGCGGCCGGGCGACCAAGGTCGCCGACGC CCGGGCGGCGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-73,8	2
182		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGAAGCGGGGCGACCAAGGTCGCCGACGC CCGGGCGGCGCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,3	1
183		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGAGACCGGGCGACCAAGGTCGCCGACGC CCGGGCGGCTCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,6	1
184		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAAGGCCGGGCGACCAAGGTCGCCGACGC CCGGGCGGCGCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-74,5	1
185		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGGGGGCGGGCGACCAAGGTCGCCGACGC CCGGGCGGCGCGCGCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-79	2
186		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGGAAGCGGGGCGACCAAGGTCGCCGACGC CCGGGCGGCGCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-74,5	1
189		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGGAGACGGGCGACCAAGGTCGCCGACGC CCGGGCGGCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-74,8	1
187		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGGGGGCGGGCGACCAAGGTCGCCGACGC CCGGGCGGCGCGCGCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-79	2
188		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGGAAGCGGGGCGACCAAGGTCGCCGACGC CCGGGCGGCGCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-74,5	1
189		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGGAGACGGGCGACCAAGGTCGCCGACGC CCGGGCGGCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-74,8	1
190		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGGGCGGGCGACCAAGGTCGCCGACGC CCGGGCGGCGCGCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-76,9	2
200		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAAAGCGGGGCGACCAAGGTCGCCGACGC CCGGGCGGCGCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,1	1
201		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGACGGGGCGACCAAGGTCGCCGACGC CCGGGCGGCGCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-69,1	2
202		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAGCGGGCGACCAAGGTCGCCGACGC CCGGGCGGCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-74,8	1
203		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGGACGGGGCGACCAAGGTCGCCGACGC CCGGGCGGCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-74,8	1

Таблиця 2

SEQ ID	Модифікована ділянка	Послідовність	ΔG	№ стр.
204		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAAACGGGGGACCAAGGTGCCCCGACG CCCGGGCGGTTCTCTCGAGCGAGCGAGCGGCGC	-72,4	1
205		GCGCGCTCGCTCGCTCAAGAGAAACGGGGGACCAAGGTGCCCCGACG CCCGGGCGGTTCTCTTGAGCGAGCGAGCGGCGC	-70,6	1
206		GCGCGCTCGCTCGCTCAGAGAAACGGGGGACCAAGGTGCCCCGACGCG CCCGGGCGGTTCTCTGAGCGAGCGAGCGGCGC	-72,2	1
207		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAGAAACGGGGGACCAAGGTGCCCCGACGCG CCCGGGCGGTTCTASTGAGCGAGCGAGCGGCGC	-70,8	1
208		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGGAACGGGGGACCAAGGTGCCCCGACGCG CCCGGGCGGTTCCASTGAGCGAGCGAGCGGCGC	-72,8	1
209		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAAACGGGGGACCAAGGTGCCCCGACGCG CCCGGGCGGTTTCACTGAGCGAGCGAGCGGCGC	-70,4	1
210		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCGGGGACCAAGGTGCCCCGACG CCCGGGCGGCCCCCGGAGCGAGCGAGCGGCGC	-80,3	2
211		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAACGGGGGACCAAGGTGCCCCGACGCG CCCGGGCGGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGGCGC	-65,8	1
212	Петл. плече	GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCAGGCGACCAAGGTGCGCTGACGCG CCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGGCGC	-73,7	1
213		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGAGCGACCAAGGTGCGCTGACGCG CCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGGCGC	-73,1	1
214		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGAGCGACCAAGGTGCGCTGACGCG CCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGGCGC	-73,1	2
215		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGAGACCAAGGTCTCCCGACGCG CCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGGCGC	-73,9	1
216		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCAACCAAGGTTGCCCGACGCG CCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGGCGC	-73,4	1
217		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGGGGCGCAAGGCGCCCGACGCG CCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGGCGC	-77,3	2
218		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGGGAACAAAGTTGCCCCGACGCG CCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGGCGC	-72,8	2
219		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGGACAAAATGTGCCCCGACGCG CCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGGCGC	-73,5	1
220		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCAAGCGACCAAGGTGCGTTGACGCG CCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGGCGC	-71,3	1
221		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCAAACGACCAAGGTGCTTTGACGCG CCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGGCGC	-68,9	1
222		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCAAAAGACCAAGGTCTTTTGACGCG CCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGGCGC	-67,3	2
223		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCAAAAACCAAGGTTTTTTGACGCG CCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGGCGC	-64,6	2
224		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCAAAAAGCCAAAGGCTTTTTGACGCG CCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGGCGC	-67	2
225		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCAAAAGACAAAGTCTTTTGACGCG CCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGGCGC	-64,9	1
226		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCAAAAGAAAAATTCCTTTTGACGCG CCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGGCGC	-63,1	1
227		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCAAAAAAATTTTCTTTTGACGCGC CCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGGCGC	-60,4	1
228		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGAAAAAAATTTTCTTTTGACGCG CCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGGCGC	-62,2	1
229		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGAAAGAAAAATTCCTTTTGACGCG CCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGGCGC	-67,3	1
230		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGAAGAAAAATTCCTTTTGACGCG CCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGGCGC	-69,7	2
231		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGAGAAAAATTCCTTTTGACGCG CCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGGCGC	-71,9	1

Таблиця 2

SEQ ID	Модифікована ділянка	Послідовність	ΔG	№ стр.
232		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGGAAAAATTCGCGCCGACGC C CGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-73,4	2
233		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGGAAAAATTCGCGCCGACGC C CGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-71,0	2

Таблиця 3: модифіковані послідовності ITR з модифікаціями у петльовому плечі та зрізаному плечі

Таблиця 3

SEQ ID	Модифікована ділянка	Послідовність	ΔG	№ стр.
234	Петл. плече та зрізане плече	GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCAGGCGACCAAGGTCGCTGACAC C CGGGTGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,2	2
235		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCAGGCGACCAAGGTCGCTGACGC CATGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-73,7	1
236		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCAGGCGACCAAGGTCGCTGACGA CATGTGCGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-71,8	1
237		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCAGGCGACCAAGGTCGCTGACGA ACGTTGCGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,2	1
238		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCAGGCGACCAAGGTCGCTGAAGC AATTGCTGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,6	1
239		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGGCCAAAGGCCGCCGACAC C CGGGTGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-75,8	2
240		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGGCCAAAGGCCGCCGACGC CATGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-77,3	1
241		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGGCCAAAGGCCGCCGACG ACATGTGCGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-75,4	1
242		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGGCCAAAGGCCGCCGACG AAGTTGCGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-75,8	1
243		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGGCCAAAGGCCGCCGAAG CAATTGCTGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-76,2	1
244		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGGACAAAATGTGCGCCGACAC C CGGGTGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-72	1
245		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGGACAAAATGTGCGCCGACGC CATGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-73,5	1
246		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGGACAAAATGTGCGCCGACGA CATGTGCGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-71,6	2
247		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGGACAAAATGTGCGCCGACGA ACGTTGCGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-72	2
248		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGGACAAAATGTGCGCCGAAGC AATTGCTGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,4	1
249		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCAAAAGACCAAGGTCCTTTGACAC C CGGGTGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-65,8	3
250		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCAAAAGACCAAGGTCCTTTGACGC CATGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-67,3	2
251		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCAAAAGACCAAGGTCCTTTGACGA CATGTGCGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-65,4	2
252		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCAAAAGACCAAGGTCCTTTGACGA ACGTTGCGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-65,8	2
253		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCAAAAGACCAAGGTCCTTTGAAGC AATTGCTGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-66,2	1
254		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCAAAAAAAAAATTTTTTGAACC C CGGGTGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-59,6	2
255		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCAAAAAAAAAATTTTTTGAAGC ATGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-60,4	1

Таблиця 3

SEQ ID	Модифікована ділянка	Послідовність	ΔG	№ стр.
256		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCAAAAAATTTTTTTGACGA CATGTGGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-59,8	1
257		GDGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCAAAAAATTTTTTTGACGA ACGTTGGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-58,9	2
258		GDGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCAAAAAATTTTTTTGAAGC AATTGCTGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-59,3	2
259		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCAGAAAAATCTGCCGACAC CCGGGTGGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-70,4	1
260		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCAGAAAAATCTGCCGAGCGC CATGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-71,9	1
261		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCAGAAAAATCTGCCGACGA CATGTGGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-70	1
262		GDGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCAGAAAAATCTGCCGACGA ACGTTGGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-70,4	1
263		GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCAGAAAAATCTGCCGAAGC AATTGCTGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-70,8	1

Таблиця 4: послідовності ITR з модифікаціями у петльовому плечі та спейсері

Таблиця 4

SEQ ID	Модифікована ділянка	Послідовність	ΔG	№ стр.
264	Петл. плече та спейсер	GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCAGGGCAGCCAAAGGTGCGCTGACGC CCGGGCGGCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-71,4	1
265		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCGGGGCGGCCAAAGGTGCGCTGACGC CCGGGCGGCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-75	2
266		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCGGGGCGACAAAATGTGCGCTGACGC CCGGGCGGCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-71,2	1
267		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCAAAAGACCAAAGGTCTTTTGACGC CCGGGCGGCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-65	2
268		GDGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCAAAAAATTTTTTTGACGCC CGGGCGGCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-58,1	1
269		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCGGGGCAGAAAAATCTGCCGACGC CCGGGCGGCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-69,6	1
270		GDGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCCAGGCGACCAAAGGTGCGCTGACGC CCGGGCGGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,3	2
271		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCGGGCGGCCAAAGGTGCGCTGACGC CCGGGCGGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-75,9	3
272		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCGGGCGACAAAATGTGCGCTGACGC CCGGGCGGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,1	2
273		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCCAAAAGACCAAAGGTCTTTTGACGC CCGGGCGGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-65,9	3
274		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCCAAAAAATTTTTTTGACGC CCGGGCGGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-59	2
275		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCGGGCAGAAAAATCTGCCGAGCGC CCGGGCGGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-70,5	2
276		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAACAGGCGACCAAAGGTGCGCTGACGC CCGGGCGGTTCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-70,9	1
277		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAACGGGGCGGCCAAAGGTGCGCTGACGC CCGGGCGGTTCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-74,5	1
278		GDGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAACGGGGCGACAAAATGTGCGCTGACGC CCGGGCGGTTCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-70,7	1
279		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAACAAAAGACCAAAGGTCTTTTGACGC CCGGGCGGTTCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-64,5	2
280		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAACAAAAAATTTTTTTGACGC CCGGGCGGTTCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-57,6	1

Таблиця 4

SEQ ID	Модифікована ділянка	Послідовність	ΔG	№ стр.
281		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAACCGGGGACAGAAAAATTTCTGCCCGACG CCGGGGCGGTTCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-69,1	1
282		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCAGGGGACCAAGGTGCGCTGACG CCGGGGCGGCCCCGCGAGCGAGCGAGCGCGC	-78,8	2
283		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCGCGGGGCGCCAAAGGCGCCCGACG CCCGGGCGGCCCCGCGAGCGAGCGAGCGCGC	-82,4	3
284		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCGCGGGGACAAATGTGCGCCGACG CCCGGGCGGCCCCGCGAGCGAGCGAGCGCGC	-78,6	2
285		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGGCAAAAGACCAAGGTCTTTTGACGC CCGGGGCGGCCCCGCGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,4	3
286		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCAAAAAAAATTTTTTTGACGC CCGGGGCGGCCCCGCGAGCGAGCGAGCGCGC	-65,5	1
287		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCGCGGGGACAGAAAAATTTCTGCCCGACG CCGGGGCGGCCCCGCGAGCGAGCGAGCGCGC	-77	2
288		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAACCGGCGACCAAGGTGCGCTGACGC CCGGGGCGGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-64,3	1
289		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAACCGGGCGGCCAAAGGCGCCCGACGC CCGGGGCGGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-67,9	1
290		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAACCGGGCGACAAATGTGCGCCGACGC CCGGGGCGGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-64,1	1
291		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAACCAAAAGACCAAGGTCTTTTGACGC CCGGGGCGGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-57,9	2
292		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAACCAAAAAAAATTTTTTTGACGCC CGGGCGGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-51	1
293		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAACCGGGGACAGAAAAATTTCTGCCCGACGC CCGGGGCGGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-62,5	1

Таблиця 5: послідовності ITR з модифікаціями у зрізаному плечі та спейсери

Таблиця 5

SEQ ID	Модифікована ділянка	Послідовність	ΔG	№ стр.
294	Зрізане плече та спейсер	GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCGGGGGACCAAGGTGCGCCGACAC CCGGGTGGCCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-71,4	1
295		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCGGGGGACCAAGGTGCGCCGACGC CATGGCGGCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,9	1
296		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCGGGGGACCAAGGTGCGCCGACGA CATGTCGGCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-71	1
297		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCGGGGGACCAAGGTGCGCCGACGA ACGTTGCGCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-71,4	1
298		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCGGGGGACCAAGGTGCGCCGAAGC AATTGCTGCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-71,8	1
299		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCGGGGACCAAGGTGCGCCGACAC CCGGGTGGCCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,3	2
300		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCGGGGACCAAGGTGCGCCGACGC CATGGCGGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-73,8	1
301		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCGGGGACCAAGGTGCGCCGACGA CATGTCGGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-71,9	1
302		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCGGGGACCAAGGTGCGCCGACGA ACGTTGCGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,3	1
303		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCGGGGACCAAGGTGCGCCGAAGC AATTGCTGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,7	1
304		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAACCGGGGACCAAGGTGCGCCGACAC CCGGGTGGTCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-70,9	1
305		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAACCGGGGACCAAGGTGCGCCGACGC CATGGCGGTTCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,4	1

Таблиця 5

SEQ ID	Модифікована ділянка	Послідовність	ΔG	№ стр.
306		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAAACCGGGCGACCAAAGGTCGCCGACGA CATGTCGGTTCCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-70,5	1
307		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAAACCGGGCGACCAAAGGTCGCCGACGA ACGTTGCGTTCCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-70,9	1
308		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAAACCGGGCGACCAAAGGTCGCCGACGA AATTGCTGTTCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-71,3	1
309		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCGACAC CCGGTGSGCCCCGCGAGCGAGCGAGCGCGC	-78,8	1
310		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCGACGC CATGGCGGGCCCCGCGAGCGAGCGAGCGCGC	-80,3	1
311		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCGACGA CATGTCGGCCCCGCGAGCGAGCGAGCGCGC	-78,4	1
312		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCGACGA ACGTTGCGCCCCGCGAGCGAGCGAGCGCGC	-78,8	1
313		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCGACGA AATTGCTGCCCCGCGAGCGAGCGAGCGCGC	-79,2	1
314		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAACCGGGCGACCAAAGGTCGCCGACAC CCGGTGSGTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-64,3	1
315		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAACCGGGCGACCAAAGGTCGCCGACGC CATGGCGGTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-65,8	1
316		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAACCGGGCGACCAAAGGTCGCCGACGA CATGTCGGTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-63,9	1
317		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAACCGGGCGACCAAAGGTCGCCGACGA ACGTTGCGTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-64,3	1
318		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAACCGGGCGACCAAAGGTCGCCGACGA AATTGCTGTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-64,7	1

Таблиця 6: послідовності ITR з модифікаціями у петльовому плечі, зрізаному плечі та спейсері

Таблиця 6

SEQ ID	Модифікована ділянка	Послідовність	ΔG	№ стр.
319	Петл. плече, зрізане плече та спейсер	GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCAGGCGACCAAAGGTCGCTGACAC CCGGTGSGCCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-69,9	2
320		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCAGGCGACCAAAGGTCGCTGACGC CATGGCGGCCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-71,4	1
321		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCAGGCGACCAAAGGTCGCTGAAGA CATGTCGGCCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-69,5	1
322		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCAGGCGACCAAAGGTCGCTGACGA ACGTTGSGCCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-69,9	1
323		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCAGGCGACCAAAGGTCGCTGAAGC AATTGCTGCCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-70,3	1
324		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCAGGCGACCAAAGGTCGCCGACAC CCGGTGSGCCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-73,5	2
325		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCAGGCGACCAAAGGTCGCCGACGC CATGGCGGCCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-75	1
326		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCAGGCGACCAAAGGTCGCCGACGA CATGTCGGCCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-73,1	1
327		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCAGGCGACCAAAGGTCGCCGACGA ACGTTGSGCCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-73,5	1
328		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCAGGCGACCAAAGGTCGCCGACGA AATTGCTGCCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-73,9	1
329		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCAGGCGACCAAATGTCGCCGACAC CCGGTGSGCCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-69,7	1

Таблиця 6

SEQ ID	Модифікована ділянка	Послідовність	ΔG	№ стр.
330		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCBGGGCGACAAAATGTGCCCCGACGCGCATGGGCGGCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-71,2	1
331		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCBGGGCGACAAAATGTGCCCCGACGCGCATGTGCGGCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-69,3	2
332		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCBGGGCGACAAAATGTGCCCCGACGCGACGTTGCGGCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-69,7	2
333		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCGGGCGACAAAATGTGCCCCGAAGCAATTGCTGCCCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-70,1	1
334		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCAAAAGACCAAAGGTCTTTTGACACC CGGGTGGCCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-63,5	2
335		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCAAAAGACCAAAGGTCTTTTGACGCC ATGGCGGCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-65	2
336		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCAAAAGACCAAAGGTCTTTTGACGAC ATGTGCGGCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-63,1	2
337		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCAAAAGACCAAAGGTCTTTTGACGAA CGTTGCGGCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-63,5	2
338		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCAAAAGACCAAAGGTCTTTTGACGA ATTGCTGCCCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-63,9	1
339		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCAAAAAAAAAATTTTTTTTGACACC CGGGTGGCCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-57,3	2
340		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCAAAAAAAAAATTTTTTTTGACGCC ATGGCGGCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-58,1	1
341		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCAAAAAAAAAATTTTTTTTGACGAC ATGTGCGGCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-57,5	1
342		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCAAAAAAAAAATTTTTTTTGACGAA CGTTGCGGCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-56,6	2
343		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCAAAAAAAAAATTTTTTTTGAGCA ATTGCTGCCCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-57	2
344		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCGGGCGAGAAAAATCTGCCGACACC CGGGTGGCCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-68,1	1
345		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCGGGCGAGAAAAATCTGCCGACGC CATGGCGGCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-69,6	1
346		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCGGGCGAGAAAAATCTGCCGACGA CATGTGCGGCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-67,7	1
347		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCGGGCGAGAAAAATCTGCCGACGA ACGTTGCGGCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-68,1	1
348		GCGCGCTCGCTCGCTCACTAAGGCCGGGCGAGAAAAATCTGCCGAAGC AATTGCTGCCCTTAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	-68,5	1
349		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCCAGGCGACCAAAGGTGCGCTGACAC CCGGGTGGCCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-70,8	3
350		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCCAGGCGACCAAAGGTGCGCTGACGC CATGGCGGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,3	1
351		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCCAGGCGACCAAAGGTGCGCTGACGA CATGTGCGGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-70,4	1
352		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCCAGGCGACCAAAGGTGCGCTGACGA ACGTTGCGGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-70,8	1
353		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCCAGGCGACCAAAGGTGCGCTGAAGC AATTGCTGCCCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-71,2	1
354		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCCGGGCGGCCAAAGGCCGCCGACAC CCGGGTGGCCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-74,4	3
355		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCCGGGCGGCCAAAGGCCGCCGACGC CATGGCGGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-75,9	1
356		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCCGGGCGGCCAAAGGCCGCCGACGA CATGTGCGGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-74	1
357		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCCGGGCGGCCAAAGGCCGCCGACGA ACGTTGCGGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-74,4	1
358		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCCGGGCGGCCAAAGGCCGCCGAAGC AATTGCTGCCCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-74,8	1

Таблиця 6

SEQ ID	Модифікована ділянка	Послідовність	ΔG	№ стр.
359		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCCGGGGGACAAAATGTCGCCCGACAC CCGGGTGGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-70,6	2
360		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCCGGGGGACAAAATGTCGCCCGAGGC CATGGCGGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,1	1
361		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCCGGGGGACAAAATGTCGCCCGAGGA CATGTGGGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-70,2	2
362		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCCGGGGGACAAAATGTCGCCCGAGGA ACGTTGGGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-70,6	2
363		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCCGGGGGACAAAATGTCGCCCGAAGC AATTGCTGCCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-71	1
364		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCCAAAAGACCAAAGGTCTTTGACAC CCGGGTGGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-64,4	3
365		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCCAAAAGACCAAAGGTCTTTGAGCG CATGGCGGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-65,9	2
366		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCCAAAAGACCAAAGGTCTTTGAGGA CATGTGGGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-64	2
367		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCCAAAAGACCAAAGGTCTTTGAGGA ACGTTGGGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-64,4	2
368		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCCAAAAGACCAAAGGTCTTTGAAGC AATTGCTGCCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-64,8	1
369		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCCAAAAAATAATTTTTTTGACACC CCGGGTGGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-58,2	2*
370		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCCAAAAAATAATTTTTTTGACGCC ATGGCGGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-59	1
371		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCCAAAAAATAATTTTTTTGACGAC ATGTGGGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-58,4	1
372		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCCAAAAAATAATTTTTTTGACGA ACGTTGGGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-57,5	2
373		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCCAAAAAATAATTTTTTTGAAGC AATTGCTGCCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-57,9	2
374		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCCGGGGCAGAAAAATTCGCCCGACAC CCGGGTGGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-69	2
375		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCCGGGGCAGAAAAATTCGCCCGAGGC CATGGCGGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-70,5	1
376		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCCGGGGCAGAAAAATTCGCCCGAGGA CATGTGGGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-68,6	1
377		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCCGGGGCAGAAAAATTCGCCCGAGGA ACGTTGGGCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-69	1
378		GCGCGCTCGCTCGCTCGATGGGGCCGGGGCAGAAAAATTCGCCCGAAGC AATTGCTGCCTCATCGAGCGAGCGAGCGCGC	-69,4	1
379		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAACCAAGGACCAAAAGGTGCTGACAC CCGGGTGGTTCTCTGAGCGAGCGAGCGCGC	-69,4	2
380		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAACCAAGGACCAAAAGGTGCTGAGGC CATGGCGTTCTCTGAGCGAGCGAGCGCGC	-70,9	1
381		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAACCAAGGACCAAAAGGTGCTGAGGA CATGTGGTTCTCTGAGCGAGCGAGCGCGC	-69	1
382		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAACCAAGGACCAAAAGGTGCTGAGGA ACGTTGGTTCTCTGAGCGAGCGAGCGCGC	-69,4	1
383		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAACCAAGGACCAAAAGGTGCTGAAGC AATTGCTGTTCTCTGAGCGAGCGAGCGCGC	-69,8	1
384		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAACCGGGCGGCCAAAGGCCGCCGACAC CCGGGTGGTTCTCTGAGCGAGCGAGCGCGC	-73	1
385		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAACCGGGCGGCCAAAGGCCGCCGAGGC CATGGCGTTCTCTGAGCGAGCGAGCGCGC	-74,5	1
386		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAACCGGGCGGCCAAAGGCCGCCGAGG ACATGTCGGTTCTCTGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,6	1

Таблиця 6

SEQ ID	Модифікована ділянка	Послідовність	ΔG	№ стр.
387		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAAACCGGGGCGGCCAAAGGCGCCGACG AACGTTGGTTCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-73	1
388		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAAACCGGGGCGGCCAAAGGCGCCGACG CAATTGCTGTTCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-73,4	1
389		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAAACCGGGGCGACAAAATGTCGCCGACAC CCGGGTGGTTCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-69,2	1
390		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAAACCGGGGCGACAAAATGTCGCCGACG CATGGCGGTTCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-70,7	1
391		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAAACCGGGGCGACAAAATGTCGCCGACGA CATGTGGTTCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-69,8	2
392		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAAACCGGGGCGACAAAATGTCGCCGACGA ACGTTGCGTTCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-69,2	2
393		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAAACCGGGGCGACAAAATGTCGCCGACG AATTGCTGTTCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-69,6	1
394		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAAACCAAAAGACCAAAAGGTCTTTGACAC CCGGGTGGTTCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-63	2
395		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAAACCAAAAGACCAAAAGGTCTTTGACG CATGGCGGTTCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-64,5	2
396		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAAACCAAAAGACCAAAAGGTCTTTGACGA CATGTGGTTCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-62,6	2
397		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAAACCAAAAGACCAAAAGGTCTTTGACGA ACGTTGCGTTCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-63	2
398		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAAACCAAAAGACCAAAAGGTCTTTGAAGC AATTGCTGTTCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-63,4	1
399		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAAACCAAAAAAAAAAATTTTTTTGACACC CCGGGTGGTTCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-56,8	2
400		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAAACCAAAAAAAAAAATTTTTTTGACGCC ATGGCGGTTCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-57,6	1
401		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAAACCAAAAAAAAAAATTTTTTTGACGA CATGTGGTTCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-57	1
402		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAAACCAAAAAAAAAAATTTTTTTGACGA ACGTTGCGTTCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-56,1	2
403		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAAACCAAAAAAAAAAATTTTTTTGAAGC AATTGCTGTTCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-56,5	2
404		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAAACCGGGGCGAAAAATTCGCCGACAC CCGGGTGGTTCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-67,6	1
405		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAAACCGGGGCGAAAAATTCGCCGACG CATGGCGGTTCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-69,1	1
406		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAAACCGGGGCGAAAAATTCGCCGACGA CATGTGGTTCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-67,2	1
407		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAAACCGGGGCGAAAAATTCGCCGACGA ACGTTGCGTTCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-67,6	1
408		GCGCGCTCGCTCGCTCGAGAGAAACCGGGGCGAAAAATTCGCCGACG AATTGCTGTTCTCTCGAGCGAGCGAGCGCGC	-68	1
409		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCAGGCGACCAAAAGGTGCGCTGACAC CCGGGTGGCCCGCGAGCGAGCGAGCGCGC	-77,3	2
410		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCAGGCGACCAAAAGGTGCGCTGACG CATGGCGGCCCGCGAGCGAGCGAGCGCGC	-78,8	1
411		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCAGGCGACCAAAAGGTGCGCTGACGA CATGTGGCCCGCGAGCGAGCGAGCGCGC	-76,9	1
412		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCAGGCGACCAAAAGGTGCGCTGACGA ACGTTGCGGCCCGCGAGCGAGCGAGCGCGC	-77,3	1
413		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCAGGCGACCAAAAGGTGCGCTGAAGC AATTGCTGCCCGCGAGCGAGCGAGCGCGC	-77,7	1
414		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCAGGCGACCAAAAGGCGGCCGACAC CCGGGTGGCCCGCGAGCGAGCGAGCGCGC	-80,9	2
415		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCAGGCGGCCAAAGGCGGCCGACG CATGGCGGCCCGCGAGCGAGCGAGCGCGC	-82,4	1

Таблиця 6

SEQ ID	Модифікована ділянка	Послідовність	ΔG	№ стр.
416		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCGGGCGGCCAAAGGCGCCCGACG ACATGTGCGCCCCCGGAGCGAGCGAGCGCGC	-80,5	1
417		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCGGGCGGCCAAAGGCGCCCGACG AAGGTTGCGCCCCCGGAGCGAGCGAGCGCGC	-80,9	1
418		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCGGGCGGCCAAAGGCGCCCGAAG CAATTGCTGCCCCCGGAGCGAGCGAGCGCGC	-81,3	1
419		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCGGGCGGCCAAATGTGCGCCGACAC CGGGGTGGCCCCCGGAGCGAGCGAGCGCGC	-77,1	1
420		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCGGGCGGCCAAATGTGCGCCGAGCG CATGGCGGCCCCCGGAGCGAGCGAGCGCGC	-78,6	1
421		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCGGGCGGCCAAATGTGCGCCGACGA CATGTGCGCCCCCGGAGCGAGCGAGCGCGC	-76,7	2
422		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCGGGCGGCCAAATGTGCGCCGACGA ACGTTGCGCCCCCGGAGCGAGCGAGCGCGC	-77,1	2
423		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCGGGCGGCCAAATGTGCGCCGAGC AATTGCTGCCCCCGGAGCGAGCGAGCGCGC	-77,5	1
424		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCAAAAGACCAAAGGTCTTTTGACAC CGGGGTGGCCCCCGGAGCGAGCGAGCGCGC	-70,9	3
425		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCAAAAGACCAAAGGTCTTTTGACGC CATGGCGGCCCCCGGAGCGAGCGAGCGCGC	-72,4	2
426		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCAAAAGACCAAAGGTCTTTTGACGA CATGTGCGCCCCCGGAGCGAGCGAGCGCGC	-70,5	2
427		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCAAAAGACCAAAGGTCTTTTGACGA ACGTTGCGCCCCCGGAGCGAGCGAGCGCGC	-70,9	2
428		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCAAAAGACCAAAGGTCTTTTGAAGC AATTGCTGCCCCCGGAGCGAGCGAGCGCGC	-71,3	1
429		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCAAAAAAAAAATTTTTTTTGACCC CGGGTGGCCCCCGGAGCGAGCGAGCGCGC	-64,7	2
430		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCAAAAAAAAAATTTTTTTTGACGCC ATGGCGGCCCCCGGAGCGAGCGAGCGCGC	-65,5	1
431		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCAAAAAAAAAATTTTTTTTGACGA CATGTGCGCCCCCGGAGCGAGCGAGCGCGC	-64,9	1
432		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCAAAAAAAAAATTTTTTTTGACGA ACGTTGCGCCCCCGGAGCGAGCGAGCGCGC	-64	2
433		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCAAAAAAAAAATTTTTTTTGAAGC AATTGCTGCCCCCGGAGCGAGCGAGCGCGC	-64,4	2
434		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCGGGCAGAAAAATCTGCCCGACAC CGGGTGGCCCCCGGAGCGAGCGAGCGCGC	-75,5	1
435		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCGGGCAGAAAAATCTGCCCGACGC CATGGCGGCCCCCGGAGCGAGCGAGCGCGC	-77	1
436		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCGGGCAGAAAAATCTGCCCGACGA CATGTGCGCCCCCGGAGCGAGCGAGCGCGC	-75,1	1
437		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCGGGCAGAAAAATCTGCCCGACGA ACGTTGCGCCCCCGGAGCGAGCGAGCGCGC	-75,5	1
438		GCGCGCTCGCTCGCTCGCGGGGGCCGGGCAGAAAAATCTGCCCGAAGC AATTGCTGCCCCCGGAGCGAGCGAGCGCGC	-75,9	1
439		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAACAGGCGACCAAAGGTGCTGACAC CGGGTGGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-62,8	2
440		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAACAGGCGACCAAAGGTGCTGACGC CATGGCGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-64,3	1
441		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAACAGGCGACCAAAGGTGCTGACGA CATGTGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-62,4	1
442		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAACAGGCGACCAAAGGTGCTGACGA ACGTTGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-62,8	1
443		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAACAGGCGACCAAAGGTGCTGAAGC AATTGCTTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-63,2	1
444		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAACGGGCGGCCAAAGGCGCCCGACAC CGGGTGGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-66,4	1

Таблиця 6

SEQ ID	Модифікована ділянка	Послідовність	ΔG	№ стр.
445		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAAACCGGGCGGCCAAAGGCCGCCGAGCGC CATGGCGGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-67,9	1
446		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAAACCGGGCGGCCAAAGGCCGCCGAGCGA CATGTCGGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-66	1
447		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAAACCGGGCGGCCAAAGGCCGCCGAGCGA ACGTTGCGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-66,4	1
448		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAAACCGGGCGGCCAAAGGCCGCCGAGCGA AATTGCTGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-66,8	1
449		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAAACCGGGCGGCCAAATGTGCCCGACAC CCGGGTGGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-62,6	1
450		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAAACCGGGCGGCCAAATGTGCCCGAGCGC CATGGCGGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-64,1	1
451		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAAACCGGGCGGCCAAATGTGCCCGAGCGA CATGTCGGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-62,2	2
452		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAAACCGGGCGGCCAAATGTGCCCGAGCGA ACGTTGCGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-62,6	2
453		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAAACCGGGCGGCCAAATGTGCCCGAAGC AATTGCTGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-63	1
454		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAAACCAAAAGACCAAGGTCTTTTGACACC CCGGTGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-56,4	2
455		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAAACCAAAAGACCAAGGTCTTTTGACGCC ATGGCGGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-57,9	2
456		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAAACCAAAAGACCAAGGTCTTTTGACGAC ATGTGCGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-56	2
457		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAAACCAAAAGACCAAGGTCTTTTGACGA ADGTTGCGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-56,4	2
458		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAAACCAAAAGACCAAGGTCTTTTGAGC AATTGCTGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-56,8	1
459		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAAACCAAAAGACCAAGGTCTTTTGACACC CCGGTGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-50,2	2
460		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAAACCAAAAGACCAAGGTCTTTTGAGGCC ATGGCGGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-51	1
461		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAAACCAAAAGACCAAGGTCTTTTGACGAC ATGTGCGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-50,4	1
462		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAAACCAAAAGACCAAGGTCTTTTGACGAA CGTTGCGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-49,5	2
463		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAAACCAAAAGACCAAGGTCTTTTGAGCA AATTGCTGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-49,9	1
464		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAAACCGGGCAGAAAAATCTGCCCGACAC CCGGGTGGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-61	1
465		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAAACCGGGCAGAAAAATCTGCCCGAGCGC CATGGCGGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-62,5	1
466		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAAACCGGGCAGAAAAATCTGCCCGAGCGA CATGTCGGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-60,6	1
467		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAAACCGGGCAGAAAAATCTGCCCGAGCGA ACGTTGCGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-61	1
468		GCGCGCTCGCTCGCTCAATAAAAACCGGGCAGAAAAATCTGCCCGAAGC AATTGCTGTTTTATTGAGCGAGCGAGCGCGC	-61,4	1

Як розкривається авторами, модифікований ITR може бути генерований таким чином, щоб включати делецію, вставку або заміщення одного або декількох нуклеотидів із ITR дикого типу, взятого з геному AAV у порівнянні з модифікованим ITR може бути генерований шляхом генетичної модифікації під час розмноження у плазміді в *Escherichia coli* або як геном бакуловірусу в клітинах *Spodoptera frugiperda*, або іншими біологічними способами, наприклад, *in vitro*, із застосуванням полімеразної ланцюгової реакції або хімічного синтезу.

У деяких варіантах втілення модифікований ITR включає делецію, вставку або заміщення одного або декількох нуклеотидів із ITR AAV2 дикого типу (лівий) (SEQ ID NO: 51) або ITR AAV2 дикого типу (правий) (SEQ ID NO: 1). Зокрема, один або декілька нуклеотидів є делетованими, вставленими або заміщеними з В-С' або С-С' Т-подібної структури "петля на стеблі". Крім того, модифікований ITR не

включає будь-якої модифікації у Rep-зв'язувальних елементах (RBE) і сайті кінцевого розділення (trs) ITR AAV2 дикого типу, хоча RBE'(TTT) може бути присутньою або відсутньою, залежно від того, чи було матрицю піддано одному циклу реплікації, що перетворює триплет AAA на комплементарну RBE' – TTT.

Для прикладу наведено три типи модифікованого ITRS – (1) модифікований ITR, який має структуру з найменшою енергією, що включає одне плече й одну непарну петлю ("структура одне плече/одна непарна петля"); (2) модифікований ITR, який має структуру з найменшою енергією з однією шпилькою ("одношпилькова структура"); та (3) модифікований ITR, який має структуру з найменшою енергією з двома плечима, одне з яких є зрізаним ("зрізана структура").

Модифікований ITR зі структурою одне плече/одна непарна петля

ITR дикого типу може бути модифікований таким чином, щоб утворювати вторинну структуру, яка включає одне плече й одну непарну петлю (тобто, "структуру одне плече/одна непарна петля"). Вільна енергія Гіббса (ΔG) розгортання структури може становити від -85 ккал/моль до -70 ккал/моль. Представлені типові структури модифікованих ITR.

Модифіковані ITR, які прогнозовано утворюють структуру одне плече/одна непарна петля, можуть включати делецію, вставку або заміщення одного або декількох нуклеотидів із ITR дикого типу у послідовностях, які утворюють плече В і В' та/або плече С і С'. Модифікований ITR може бути генерований шляхом генетичної модифікації або біологічного та/або хімічного синтезу.

Наприклад, лівий та правий ITR-2, як представлено на ФІГУРАХ 9А - 9В (SEQ ID NO:101 і 102), є генерованими таким чином, щоб мати делецію двох нуклеотидів із плеча С-С' і делецію 16 нуклеотидів з плеча В-В' в ITR AAV2 дикого типу. Три нуклеотиди, які залишаються у плечі В-В' модифікованого ITR, не утворюють комплементарного спарювання. Таким чином, лівий та правий ITR-2 мають структуру з найменшою енергією з С-С' з одним плечем й однією непарною петлею. Вільна енергія Гіббса розгортання структури прогнозується на рівні приблизно -72,6 ккал/моль.

Лівий та правий ITR-3, як представлено на ФІГУРАХ 10А та 10В (SEQ ID NO: 103 та 104), є генерованими таким чином, щоб включати делеції 19 нуклеотидів у плечі С-С' з ITR AAV2 дикого типу. Три нуклеотиди, які залишаються у плечі В-В' модифікованого ITR, не утворюють комплементарного спарювання. Таким чином, лівий та правий ITR-3 мають структуру з найменшою енергією з одне плече В-В' та однією непарною петлею. Вільна енергія Гіббса розгортання структури прогнозується на рівні приблизно -74,8 ккал/моль.

Лівий та правий ITR-4, як представлено на ФІГУРАХ 11А та 11В (SEQ ID NO: 105 та 106), є генерованими таким чином, щоб включати делеції 19 нуклеотидів у плечі В-В' з ITR AAV2 дикого типу. Три нуклеотиди, які залишаються у плечі В-В' модифікованого ITR, не утворюють комплементарного спарювання. Таким чином, лівий та правий ITR-4 мають структуру з найменшою енергією з С-С' з одним плечем та однією непарною петлею. Вільна енергія Гіббса розгортання структури прогнозується на рівні приблизно -76,9 ккал/моль.

Лівий та правий ITR-10, як представлено на ФІГУРАХ 12А та 12В (SEQ ID NO: 107 та 108), є генерованими таким чином, щоб включати 8 нуклеотидних делецій у плечі В-В' з ITR AAV2 дикого типу. Нуклеотиди, які залишаються у плечах В-В' та С-С', утворюють нові комплементарні зв'язки між мотивами В та С' (ITR-10 лівий) або між мотивами С та В' (ITR-10 правий). Таким чином, лівий та правий ITR-10 мають структуру з найменшою енергією з єдиним плечем В-С' або С-В' та однією непарною петлею. Вільна енергія Гіббса розгортання структури прогнозується на рівні приблизно -83,7 ккал/моль.

Лівий та правий ITR-17, як представлено на ФІГУРАХ 13А та 13В (SEQ ID NO: 109 та 110), є генерованими таким чином, щоб включати 14 нуклеотидних делецій у плечі С-С' з ITR AAV2 дикого типу. Вісім нуклеотидів, які залишаються у плечі С-С', не утворюють комплементарні зв'язки. В результаті лівий та правий ITR-17 мають структуру з найменшою енергією з одним плечем В-В' та однією непарною петлею. Вільна енергія Гіббса розгортання структури прогнозується на рівні приблизно -73,3 ккал/моль.

Послідовності ITR дикого типу, ліва та права (вгорі) і різні модифіковані ліві та праві ITR (внизу), які прогнозовано мають утворювати структуру одне плече/одна непарна петля, є вирівняними та представленими нижче у Таблиці 7.

Таблиця 7: Вирівнювання ITR дикого типу та модифікованих ITR (ITR-2, ITR-3, ITR-4, ITR-10 й ITR-17) зі структурою одне плече/одна непарна петля.

Таблиця 7

Модифікований ITR (SEQ ID NO)	Вирівнювання послідовностей ITR дикого типу; WT-L ITR (SEQ ID NO: 540) або WT-R ITR (SEQ ID NO: 17) (верхня послідовність) у порівнянні з модифікованими послідовностями ITR (SEQ ID NO: 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110) (нижні послідовності))	ΔG (ккал/моль)
-------------------------------	---	------------------------

Таблиця 7

Модифікований ITR (SEQ ID NO)	Вирівнювання послідовностей ITR дикого типу; WT-L ITR (SEQ ID NO: 540) або WT-R ITR (SEQ ID NO: 17) (верхня послідовність) у порівнянні з модифікованими послідовностями ITR (SEQ ID NO: 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110) (нижні послідовності))	ΔG (ккал/моль)
Лівий ITR-2 (SEQ: 101)	<pre> 10 20 30 40 50 60 GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGCAAAAGCCCGGGCTCGGGCGACCTTTGG : GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGAAA--CCCGGGCT--GCG----- 10 20 30 40 70 80 90 TCGCCCGGCTCACTGAGCGAGCGAGCGCGC : -----CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC 50 60 70 </pre>	-72,6
Правий ITR-2 (SEQ: 102)	<pre> 10 20 30 40 50 GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAGGTCGCCCGACG--CCCGGGCGGC : GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGC-----GCACGCCCGGGTTTCCCGGGCGGC 10 20 30 40 60 70 80 CTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC : CTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC 50 60 70 </pre>	-72,6
Лівий ITR-3 (SEQ: 103)	<pre> 10 20 30 40 50 60 GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGCAAAAGCCCGGGCTCGGGCGACCTTTGG : GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCC-----TCGGGCGACCTTTGG 10 20 30 40 70 80 90 TCGCCCGGCTCACTGAGCGAGCGAGCGCGC : TCGCCCGGCTCACTGAGCGAGCGAGCGCGC 50 60 70 </pre>	-74,8
Правий ITR-3 (SEQ: 104)	<pre> 10 20 30 40 50 60 GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCGGCTT : GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAGGTCGCCCGACG-----GCCT 10 20 30 40 50 70 80 CAGTGAGCGAGCGAGCGCGC : CAGTGAGCGAGCGAGCGCGC 60 70 </pre>	-74,8

Таблиця 7

Модифікований ITR (SEQ ID NO)	Вирівнювання послідовностей ITR дикого типу; WT-L ITR (SEQ ID NO: 540) або WT-R ITR (SEQ ID NO: 17) (верхня послідовність) у порівнянні з модифікованими послідовностями ITR (SEQ ID NO: 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110) (нижні послідовності)	ΔG (ккал/моль)
Лівий ITR-4 (SEQ: 105)	<pre> 10 20 30 40 50 60 GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGG : GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGG----- 10 20 30 40 70 80 90 TCGCCCGGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC : -----CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC 50 60 70 </pre>	-76,9
Правий ITR-4 (SEQ: 106)	<pre> 10 20 30 40 50 60 GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCCGGGCGAGCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCGGCTT : GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCG-----ACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCTT 10 20 30 40 50 70 80 CAGTGAGCGAGCGAGCGCGC : CAGTGAGCGAGCGAGCGCGC 60 70 </pre>	-76,9
Лівий ITR-10 (SEQ: 107)	<pre> 10 20 30 40 50 60 GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGG : GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCG-----TTT-- 10 20 30 40 50 70 80 90 TCGCCCGGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC : --GCCCGGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC 60 70 80 </pre>	-83,7
Правий ITR-10 (SEQ: 108)	<pre> 10 20 30 40 50 GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAG---GTGCGCCGAC---GCCCGG : GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCG---AAAGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGG 10 20 30 40 50 60 70 80 GCGCGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC : GCGCGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC 60 70 80 </pre>	-83,7

Таблиця 7

Модифікований ITR (SEQ ID NO)	Вирівнювання послідовностей ITR дикого типу; WT-L ITR (SEQ ID NO: 540) або WT-R ITR (SEQ ID NO: 17) (верхня послідовність) у порівнянні з модифікованими послідовностями ITR (SEQ ID NO: 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110) (нижні послідовності))	ΔG (ккал/моль)
Лівий ITR-17 (SEQ: 109)	<pre> 15 20 30 40 50 60 GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCGCGCGGGCAAGCGCGGGCGTCGGGCGACCTTTGG : GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCGG-----AAA-----CGTCGGGCGACCTTTGG 15 20 30 40 75 80 90 TCGCCCGGCGCTCACTGAGCGGAGCGAGCGCGC : TCGCCCGGCGCTCACTGAGCGGAGCGAGCGCGC 50 60 70 </pre>	-73,3
Правий ITR-17 (SEQ: 110)	<pre> 10 20 30 40 50 60 GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGCGCGGGCGACCAAGGTCGCCCGACGCGCGGGCGGCGCT : GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGCGCGGGCGACCAAGGTCGCCCGACGCTTT---CGGCGCT 10 20 30 40 50 75 80 CAGTGAGCGGAGCGAGCGCGC : CAGTGAGCGGAGCGAGCGCGC 60 70 </pre>	-73,3

Модифікований ITR з єдиною шпильковою структурою

ITR дикого типу може бути модифікований таким чином, щоб мати структуру з найменшою енергією, включаючи одношпилькову структуру. Вільна енергія Гіббса (ΔG) розгортання структури може становити від -70 ккал/моль до -40 ккал/моль. Представлено типові структури модифікованих ITR і ФІГУРАХ 14А та 14В.

Модифіковані ITR, які прогнозовано мають утворювати єдину шпилькову структуру, можуть включати делецію, вставку або заміщення одного або декількох нуклеотидів з ITR дикого типу у послідовностях, які утворюють плече В і В' та/або плече С і С'. Модифікований ITR може бути генерований шляхом генетичної модифікації або біологічного та/або хімічного синтезу.

Наприклад, лівий та правий ITR-6, як представлено на ФІГУРАХ 14А та 14В (SEQ ID NO: 111 і 112), включають 40 нуклеотидних делецій у плечах В-В' і С-С' з ITR AAV2 дикого типу. Нуклеотиди, які залишаються у модифікованому ITR, прогнозовано мають утворювати єдину шпилькову структуру. Вільна енергія Гіббса розгортання структури становить приблизно -54,4 ккал/моль.

Послідовності ITR дикого типу ITR-6 (лівий та правий) є вирівняними та представленими нижче у Таблиці 8.

Таблиця 8: Вирівнювання ITR дикого типу та модифікований ITR-6 з єдиною шпильковою структурою.

Таблиця 8

Модифікований ITR (SEQ ID NO)	Вирівнювання послідовностей ITR дикого типу; WT-L ITR (SEQ ID NO: 540) або WT-R ITR (SEQ ID NO: 17) (верхня послідовність)) у порівнянні з модифікованим ITR-6 (SEQ ID NO: 111; ITR-6, лівий) (SEQ ID NO: 112, ITR-6, правий) (нижня послідовність)	ΔG (ккал/моль)
-------------------------------	---	------------------------

Таблиця 8

Модифікований ITR (SEQ ID NO)	Вирівнювання послідовностей ITR дикого типу; WT-L ITR (SEQ ID NO: 540) або WT-R ITR (SEQ ID NO: 17) (верхня послідовність)) у порівнянні з модифікованим ITR-6 (SEQ ID NO: 111; ITR-6, лівий) (SEQ ID NO: 112, ITR-6, правий) (нижня послідовність)	ΔG (ккал/моль)
Лівий ITR-6 (SEQ: 111)	<pre> 10 20 30 40 50 60 GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCGCGCGGGGAAAGCGCGCGCTCGGCGACCTTTGG : GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGC-----AAAGCC----- 10 20 30 70 80 90 TCGCGCGGCGCTCAGTGAGCGGAGCGAGCGCGC : -----TCAGTGAGCGGAGCGAGCGCGC 40 50 </pre>	-54,4
Правий ITR-6 (SEQ: 112)	<pre> 80 70 60 50 40 30 , GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCGCGCGGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTTCGCGCGGCT : , GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGC-----TTTG-----CCT 10 20 20 10 , CAGTGAGCGGAGCGAGCGCGC (SEQ ID NO: 543) : , CAGTGAGCGGAGCGAGCGCGC (SEQ ID NO: 544) 40 50 </pre>	-54,4

Модифікований ITR зі зрізаною структурою

ITR дикого типу може бути модифікований таким чином, щоб мати структуру з найменшою енергією, яка включає два плеча, одне з яких є зрізаним. Їхня вільна енергія Гіббса (ΔG) розгортання становить від -90 до -70 ккал/моль. Таким чином, їхні значення вільної енергії Гіббса розгортання є нижчими за показники ITR AAV2 дикого типу.

Модифіковані ITR можуть включати делецію, вставку або заміщення одного або декількох нуклеотидів із ITR дикого типу у послідовностях, які утворюють плече В і В' та/або плече С і С'. У деяких варіантах втілення модифікований ITR може включати, наприклад, видалення всієї конкретної петлі, наприклад, петлі А-А', петлі В-В' або петлі С-С', або, в альтернативному варіанті, видалення 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або більше пар основ, які утворюють стебло петлі, якщо кінцева петля на кінці стебла ще є присутньою. Модифікований ITR може бути генерований шляхом генетичної модифікації або біологічного та/або хімічного синтезу.

Типові структури модифікованих ITR зі зрізаною структурою представлені на ФІГУРАХ 15А - 15В.

Послідовності різних модифікованих ITR, які прогнозовано мають утворювати зрізану структуру, є вирівняними для порівняння з послідовністю ITR дикого типу та представленими нижче у Таблиці 9.

Таблиця 9: Вирівнювання ITR дикого типу та модифікованих ITR (ITR-5, ITR-7, ITR-8, ITR-9, ITR-11, ITR-12, ITR-13, ITR-14, ITR-1 й ITR-16) зі зрізаною структурою.

Таблиця 9

Модифікований ITR (SEQ ID NO)	Вирівнювання послідовностей: ITR дикого типу; WT-L ITR (SEQ ID NO: 540) або WT-R ITR (SEQ ID NO: 17) (верхня послідовність) у порівнянні з модифікованими ITR (SEQ ID NO: 115-134) (нижні послідовності)	ΔG (ккал/моль)
-------------------------------	--	------------------------

Таблиця 9

Модифікований ITR (SEQ ID NO)	Вирівнювання послідовностей: ITR дикого типу; WT-L ITR (SEQ ID NO: 540) або WT-R ITR (SEQ ID NO: 17) (верхня послідовність) у порівнянні з модифікованими ITR (SEQ ID NO: 115-134) (нижні послідовності)	ΔG (ккал/моль)
Лівий ITR-5 (SEQ: 115)	<pre> 10 20 30 40 50 60 GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGGGACCTTTGG : GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGC-----GCCCGGGCGTCGGGGGACCTTTGG 10 20 30 40 70 80 90 TCGCCCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC : TCGCCCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC (SEQ ID NO: 545) 50 60 70 </pre>	-73,4
Правий ITR-5 (SEQ: 116)	<pre> 10 20 30 40 50 60 GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAGGTCGCCCGAGCGCCGGGGGCGCT : GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAGGTCGCCCGAGCGCCGGGGCG-CCT 10 20 30 40 50 70 80 CAGTGAGCGAGCGAGCGCGC : CAGTGAGCGAGCGAGCGCGC 60 70 </pre>	-73,4
Лівий ITR-7 (SEQ: 117)	<pre> 10 20 30 40 50 60 GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGGGACCTTTGG : GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGGGAC--TTTG 10 20 30 40 50 70 80 90 TCGCCCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC : TCGCCCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC 60 70 80 </pre>	-89,6
Правий ITR-7 (SEQ: 118)	<pre> 10 20 30 40 50 GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAGGTCGCCCGAGCGCCCGGC----- : GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACAAA--GTCGCCCGAGCGCCCGGGCTTTGC 10 20 30 40 50 60 70 80 -----GGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC : CCGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC 60 70 80 </pre>	-89,6

Таблица 9

Модифікований ITR (SEQ ID NO)	Вирівнювання послідовностей: ITR дикого типу; WT-L ITR (SEQ ID NO: 540) або WT-R ITR (SEQ ID NO: 17) (верхня послідовність) у порівнянні з модифікованими ITR) (SEQ ID NO: 115-134) (нижні послідовності)	ΔG (ккал/моль)
Лівий ITR-8 (SEQ: 119)	<pre> 10 20 30 40 50 60 GC GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGG ::: GC GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGA--TTT-- 10 20 30 40 50 70 80 90 TCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC ::: TCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC 60 70 80 </pre>	-86,9
Правий ITR-8 (SEQ: 120)	<pre> 10 20 30 40 50 GC GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCGAACAAAGGTCCGCCGACGCCCGGGC----- ::: GC GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCGA--AAA--TCGCCCGACGCCCGGGCTTTGC 10 20 30 40 50 60 70 80 -----GGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC ::: CGGGCGGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC 60 70 80 </pre>	-86,9
Лівий ITR-9 (SEQ: 121)	<pre> 10 20 30 40 50 60 GC GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGG ::: GC GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCG----TT-- 10 20 30 40 50 70 80 90 TCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC ::: TCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC 60 70 80 </pre>	-85,0
Правий ITR-9 (SEQ: 122)	<pre> 10 20 30 40 50 60 GC GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGG ::: GC GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGAAA--CCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGG 10 20 30 40 50 70 80 90 TCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC ::: TCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC 60 70 80 </pre>	-85,0

Таблица 9

[illegible]

Таблица 9

[illegible]

Таблица 9

[illegible]

Додаткові типові модифіковані ITR у кожному із зазначених класів для застосування згідно з винаходом представлені у Таблицях 10А та 10В. Прогнозовану вторинну структуру правих модифікованих ITR у Таблиці 10А показано на Фіг. 26А, а прогнозовану вторинну структуру лівих модифікованих ITR у Таблиці 10В показано на Фіг. 26В.

Таблиця 10А та Таблиця 10В показують типові праві та ліві модифіковані ITR.

Таблиця 10А: Типові модифіковані праві ITR. Ці типові модифіковані праві ITR можуть включати RBE GCGCGCTCGCTCGCTC-3' (SEQ ID NO: 531), спейсер ACTGAGGC (SEQ ID NO: 532), комплемент

спейсера GCCTCAGT (SEQ ID NO: 535) та RBE' (тобто, комплемент до RBE) GAGCGAGCGAGCGCGC (SEQ ID NO: 536).

Таблиця 10А

Типові праві модифіковані ITR

Конструкт ITR	Послідовність	SEQ ID NO:
ITR-18 Правий	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCGCACGCCCCGGGTTTCCCGGGCGGCCTCAGTG AGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	469
ITR-19 Правий	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCGGACGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAG TGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	470
ITR-20 Правий	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCGGGGCGACCAAGGTGCGCCGACGCCCCGGG CGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	471
ITR-21 Правий	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCTTTGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCT GCCTGCAGG	472
ITR-22 Правий	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCGGGGCGACAAAGTGCCTCGCCGACGCCCCGGGCTT TGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCA GG	473
ITR-23 Правий	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCGGGGCGAAAAATCGCCCGACGCCCCGGGCTTTG CCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	474
ITR-24 Правий	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCGGGGCGAAACGCCCCGACGCCCCGGGCTTTGCC CGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	475
ITR-25 Правий	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCGGGGCGAAAGCCCCGACGCCCCGGGCTTTGCCCG GGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	476
ITR-26 Правий	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCGGGGCGACCAAGGTGCGCCGACGCCCCGGG TTTCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCA GG	477
ITR-27 Правий	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCGGGGCGACCAAGGTGCGCCGACGCCCCGGTT TCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	478
ITR-28 Правий	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCGGGGCGACCAAGGTGCGCCGACGCCCCGTTT CGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	479
ITR-29 Правий	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCGGGGCGACCAAGGTGCGCCGACGCCCCTTTG GGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	480
ITR-30 Правий	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCGGGGCGACCAAGGTGCGCCGACGCCCCTTGG CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	481
ITR-31 Правий	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCGGGGCGACCAAGGTGCGCCGACGCTTTGCG GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	482
ITR-32 Правий	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCGGGGCGACCAAGGTGCGCCGACGTTTCGGC CTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	483

Типові праві модифіковані ITR

Конструкт ITR	Послідовність	SEQ ID NO:
ITR-49 Правий	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCCCCGACGGCCTCA GTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	99
ITR-50 Правий	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCCCCGACGGCCTCGGCGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	100

Таблиця 10В: Типові модифіковані ліві ITR. Ці типові модифіковані ліві ITR можуть включати RBE GCGCGCTCGCTCGCTC-3' (SEQ ID NO: 531), спейсер ACTGAGGC (SEQ ID NO: 532), комплемент спейсера GCCTCAGT (SEQ ID NO: 535) та комплемент RBE (RBE') GAGCGAGCGAGCGCGC (SEQ ID NO: 536).

Таблиця 10В

Типові модифіковані ліві ITR

ITR-33 Лівий	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGCCGGGA AACC CGGGCGTGCGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGG AGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCT	484
ITR-34 Лівий	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGTCGGGCG ACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAG GGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCT	485
ITR-35 Лівий	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGC AAAGCCCCGGGCGTCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAG GGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCT	486
ITR-36 Лівий	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCG TCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC AGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCT	487
ITR-37 Лівий	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCAAAGCCTCA GTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACT AGGGGTTCT	488
ITR-38 Лівий	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGC AAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACTTTGTGCCCCGGCCTCAGTGAGCGA GCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCT	489
ITR-39 Лівий	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGC AAAGCCCCGGGCGTCGGGCGATTTTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGC GAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCT	490
ITR-40 Лівий	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGC AAAGCCCCGGGCGTCGGGCGTTTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCT	491
ITR-41 Лівий	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGC AAAGCCCCGGGCGTCGGGCTTTGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAG CGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCT	492
ITR-42 Лівий	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGA AACCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGA GCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCT	493
ITR-43 Лівий	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGAA ACCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGC GAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCT	494

Типові модифіковані ліві ITR

ITR-44 Лівий	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGAAA CGGGCGTCCGGCCGACCTTTGGTCCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGA GCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGGTTCCT	495
ITR-45 Лівий	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCAAAG GGCGTCCGGCCGACCTTTGGTCCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGC GCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGGTTCCT	496
ITR-46 Лівий	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCAAAGG CGTCCGGCCGACCTTTGGTCCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC GCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGGTTCCT	497
ITR-47 Лівий	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCAAAGCG TCCGGCCGACCTTTGGTCCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC AGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGGTTCCT	498
ITR-48 Лівий	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGAAACGTC GGGCGACCTTTGGTCCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA GAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGGTTCCT	499

У варіантах втілення згідно з даним винаходом описаний авторами вектор зкДНК не має модифікованих ITR, які мають нуклеотидну послідовність, вибрану серед будь-яких із групи SEQ ID NO: 550, 551, 552, 553, 553, 554, 555, 556, 557.

За умови, що вектор зкДНК має модифікований ITR, який має одну з модифікацій в ділянці В, В', С або С', як описано у SEQ ID NO: 550 - 557, як визначено у будь-яких одному або декількох пунктах формули цієї заявки, або в межах будь-якого винаходу, який визначається у змінній формулі, яка у майбутньому може бути подана в цій заявці або у будь-якому похідному від неї патенті, і за умови, що закони відповідної країни або країн, яких стосуються ці пункти формули, ми цим зберігаємо за собою право на відмову у вищезгаданому описі від пунктів формули даної заявки або будь-якого похідного від неї патенту настільки, наскільки це є необхідним для запобігання анулюванню даної заявки або будь-якого похідного від неї патенту.

Наприклад, без обмеження ми зберігаємо за собою право на відмову від будь-якого з нижчезазначених предметів від будь-якого пункту формули даної заявки, існуючої або з можливими змінами у майбутньому, або будь-якого похідного від неї патенту:

модифікований ITR, вибраний з будь-якої групи, до якої відносяться: SEQ ID NO: 2, 52, 63 64, 113, 114, 550, 551; 552, 553, 553, 554, 555, 556, 557, який використовують у векторі зкДНК без регулюючого перемикача

вищезазначені модифіковані ITR у п. А, у векторі зкДНК без регуляторної послідовності, і в яких гетерологічна нуклеїнова кислота кодує ABCA4, USA2A var1, VEGFR, CEP290, BDD Фактор VIII (FVIII), Фактор VIII, vWF_His, vWF, лецитинхолестерин-ацетилтрансферазу, PAH, G6PC або CFTR

Без обмежень автори заявляють, що вищевказане застереження про збереження права на відмову стосується принаймні пунктів 1 - 57 цієї заявки та всіх абзаців, включаючи, крім інших, абзаци, викладені у [0027] і [00397].

Регуляторні елементи.

Вектори зкДНК можуть бути одержані з експресійних конструктів, які також можуть включати конкретну комбінацію цис-регуляторні елементи. Цис-регуляторні елементи включають, крім іншого, промотор, рибоперемикач, ізолятор, тіг-індуцибельний елемент, посттранскрипційний регуляторний елемент, специфічний до типу тканини та клітини промотор та енхансер. У деяких варіантах втілення ITR може діяти як промотор для трансгена. У деяких варіантах втілення вектор зкДНК включає додаткові компоненти для регулювання експресії трансгена, наприклад, регулюючі перемикачі, як описується авторами, для регулювання експресії трансгена, або блокуючий перемикач, який може знищувати клітину, яка включає вектор зкДНК.

Вектори зкДНК можуть бути одержані з експресійних конструктів, які також можуть включати конкретну комбінацію цис-регуляторні елементи, такі, як посттранскрипційний регуляторний елемент WHP (WPRE) (наприклад, SEQ ID NO: 8) та PolyA BGH (SEQ ID NO: 9). Підходящі експресійні касети для застосування в експресійних конструктах не обмежуються обмеженням пакування, що накладається вірусним капсидом. Експресійні касети згідно з даним винаходом включають промотор, який може впливати на загальний рівень експресії, а також специфічність клітин. Для експресії трансгена вони можуть включати високоактивний негайно-ранній промотор вірусного походження. Експресійні касети можуть містити тканиноспецифічні еукаріотні промотори для обмеження експресії трансгена конкретними типами клітин і зниження токсичного впливу та імунних реакцій, які є результатом нерегульованої, ектопічної експресії. В оптимальних варіантах втілення експресійна касета може містити синтетичний регуляторний елемент, такий, як CAG промотор (SEQ ID NO: 3).

CAG промотор включає (i) ранній енхансерний елемент цитомегаловірусу (CMV), (ii) промотор, перший екзон та перший інтрон гена бета-актину курей і (iii) акцептор сплайсингу гена бета-глобіну кроля. В альтернативному варіанті експресійна касета може містити промотор альфа-1-антитрипсину (AAT) (SEQ ID NO: 4 або SEQ ID NO: 74), печінково-специфічний (LP1) промотор (SEQ ID NO: 5 або SEQ ID NO: 16) або Промотор гена людського фактора елонгації -1 альфа (EF1a) (наприклад, SEQ ID NO: 6 або SEQ ID NO: 15). У деяких варіантах втілення експресійна касета включає один або декілька конститутивних промоторів, наприклад, LTR промотор ретровірусного вірусу саркоми Рауса (RSV) (необов'язково з енхансером RSV) або негайно-ранній промотор цитомегаловірусу (CMV) (необов'язково з енхансером CMV, наприклад, SEQ ID NO: 22). В альтернативному варіанті можуть застосовуватися індукційний промотор, нативний промотор для трансгена, тканиноспецифічний промотор або різні промотори, відомі фахівцям у даній галузі.

Підходящі промотори, включаючи описані вище, можуть мати вірусне походження і, таким чином, можуть називатися вірусними промоторами, або ж вони можуть бути взятими з будь-якого організму, включаючи прокаріотні або еукаріотні організми. Підходящі промотори можуть застосовуватися для започаткування експресії РНК-полімеразою (наприклад, pol I, pol II, pol III). До типових промоторів відносяться, крім інших, ранній промотор SV40, вірусу пухлини молочної залози мишей довгий кінцевий повтор (LTR) промотор; головний пізній промотор аденовірусу (Ad MLP); промотор вірусу простого герпесу (HSV), промотор цитомегаловірусу (CMV), такий, як Ділянка негайно-раннього промотора CMV (CMVIE), промотор вірусу саркоми Рауса (RSV), малий ядерний промотор U6 людини (U6, наприклад, SEQ ID NO: 18) (Miyagishi et al., Nature Biotechnology 20, 497 - 500 (2002)), посилений промотор U6 (наприклад, Xia et al., Nucleic Acids Res. 2003 Sep. 1; 31(17)), промотор H1 людини (H1) (наприклад, SEQ ID NO: 19), промотор CAG, промотор альфа-1-антитрипсину людини (HAAT) (наприклад, SEQ ID NO: 21), і т. ін. У варіантах втілення ці промотори є зміненими у їхньому низхідному інтроні, що містить кінець для включення один або декілька сайтів розщеплення нуклеазами. У варіантах втілення ДНК, що містить сайт(и) розщеплення нуклеазами, є чужорідною для ДНК промотора.

Промотор може включати одну або декілька специфічних транскрипційних регуляторних послідовностей для додаткового посилення експресії та/або для зміни його просторової експресії та/або часової експресії. Промотор також може включати віддалені енхансерні або репресорні елементи, які можуть розташовуватися за декілька тисяч пар основ від сайту початку транскрипції. Промотор може бути взятий з джерел, до яких відносяться віруси, бактерії, гриби, рослини, комахи та тварини. Промотор може регулювати експресію генного компонента конститутивно або диференційно стосовно клітини, тканини або органа, де відбувається експресія, або стосовно стадії розвитку, на якій відбувається експресія, або у відповідь на зовнішні подразники, такі, як фізіологічні стреси, патогени, іони металів або індукуючі агенти. Типовими прикладами промоторів є промотор бактеріофага T7, промотор бактеріофага T3, промотор SP6, промотор lac-оперону, tac-промотор, пізній промотор SV40, ранній промотор SV40, RSV-LTR промотор, промотор CMV IE, ранній промотор SV40 або пізній промотор SV40 та промотор CMV IE, а також промотори, перелічені нижче. Такі промотори та/або енхансери можуть застосовуватися для експресії будь-якого потрібного гена, наприклад, молекул, призначених для генної інженерії, донорної послідовності, терапевтичних білків і т. ін.). Наприклад, вектор може включати промотор, який є функціонально зв'язаним з нуклеїновокислотною послідовністю, яка кодує терапевтичний білок. Промотор, функціонально зв'язаний з послідовністю, яка кодує терапевтичний білок, може бути промотором з вірусу мавп 40 (SV40), промотором вірусу пухлини молочної залози мишей (MMTV), промотором вірусу імунodefіциту людини (HIV), таким, як промотор довгого кінцевого повтору (LTR) вірусу імунodefіциту великої рогатої худоби (BIV), промотором вірусу Молоні, промотором вірусу лейкозу птахів (ALV), промотором цитомегаловірусу (CMV), таким, як негайно-ранній промотор CMV, промотором вірусу Епштейна-Барр (EBV) або промотором вірусу саркоми Рауса (RSV). Промотор також може бути промотором з людського гена, такого як людський убіквітин C (hUbC), людський актин, людський міозин, людський гемоглобін, креатин м'язів людини або людський металотіонеїн. Промотор також може бути тканиноспецифічним промотором, таким, як печінково-специфічний промотор, такий, як альфа-1-антитрипсин людини (HAAT), природний або синтетичний. В одному варіанті втілення доставлення у печінку досягають з застосуванням специфічного до ендогенного ApoE спрямування композиції, яка включає вектор зДНК, до гепатоцитів через рецептор ліпопротеїну низької густини (LDL), присутній на поверхні гепатоциту.

В одному варіанті втілення застосовуваний промотор є нативним промотором гена, який кодує терапевтичний білок. Промотори та інші регуляторні послідовності для відповідних генів, які кодують терапевтичні білки, є відомими серед фахівців і були охарактеризовані. Використовувана промоторна ділянка також може включати одну або декілька додаткових регуляторних послідовностей (наприклад, нативних), наприклад, енхансерів, (наприклад, SEQ ID NO: 22 і SEQ ID NO: 23).

Необмежувальні приклади підходящих промоторів для застосування згідно з даним винаходом є CAG промотор, наприклад (SEQ ID NO: 3), HAAT промотор (SEQ ID NO: 21), промотор EF1- α людини (SEQ ID NO: 6) або фрагмент EF1 промотора (SEQ ID NO: 15), IE2 промотор (наприклад, SEQ ID NO: 20) та промотор EF1- α щура (SEQ ID NO: 24).

Послідовності поліаденілування: Послідовність, яка кодує послідовність поліаденілування, може

бути включена у вектор зкДНК для стабілізації мРНК, експресованої з вектора зкДНК, та для сприяння ядерному експорту та трансляції. В одному варіанті втілення вектор зкДНК не включає послідовність поліаденілування. В інших варіантах втілення вектор включає принаймні 1, принаймні 2, принаймні 3, принаймні 4, принаймні 5, принаймні 10, принаймні 15, принаймні 20, принаймні 25, принаймні 30, принаймні 40, принаймні 45, принаймні 50 або більше аденіндинуклеотидів. У деяких варіантах втілення поліаденілування послідовність включає приблизно 43 нуклеотидів, приблизно 40 - 50 нуклеотидів, приблизно 40 - 55 нуклеотидів, приблизно 45 - 50 нуклеотидів, приблизно 35-50 нуклеотидів, або будь-яке число в цих межах.

Експресійні касети можуть включати послідовність поліаденілування, відому фахівцям у даній галузі, або її варіант, такий, як природна послідовність, виділена з BGHrA великої рогатої худоби (наприклад, SEQ ID NO: 74) або вірус SV40pA (наприклад, SEQ ID NO: 10), або синтетична послідовність (наприклад, SEQ ID NO: 27). Деякі експресійні касети також можуть включати пізній сигнал поліА SV40 перед послідовністю енхансера (USE). У деяких варіантах втілення USE застосовують у комбінації з SV40pA або гетерологічним сигналом поліА.

Експресійні касети також можуть включати посттранскрипційний елемент для підвищення експресії трансгена. У деяких варіантах втілення застосовують посттранскрипційний регуляторний елемент (WPRE) вірусу гепатиту бабаків (WHP) (наприклад, SEQ ID NO: 8) для підвищення експресії трансгена. Можуть застосовуватися й інші елементи посттранскрипційної обробки, такі, як посттранскрипційний елемент з гена тимідинкінази симплексного вірусу герпесу або вірусу гепатиту В (HBV). Секреторні послідовності можуть бути зв'язані з трансгенами, наприклад, послідовності VH-02 та VK-A26, наприклад, SEQ ID NO: 25 та SEQ ID NO: 26.

Регулюючі перемикачі

Молекулярний регулюючий перемикач генерує вимірну зміну стану у відповідь на сигнал. Такі регулюючі перемикачі можуть ефективно комбінуватися з векторами зкДНК, як описано авторами, для контролювання виходу вектора зкДНК. У деяких варіантах втілення вектор зкДНК включає регулюючий перемикач, який служить для точного регулювання експресії трансгена. Наприклад, він може виконувати функцію біоізоляції вектора зкДНК. У деяких варіантах втілення перемикач є перемикачем "УВІМКНЕННЯ/ВИМКНЕННЯ", призначеним для запуску або припинення (тобто, перекриття) експресії потрібного гена у зкДНК у контрольований і регульований спосіб. У деяких варіантах втілення перемикач може включати "блокуючий перемикач", який морже давати клітині, яка включає вектор зкДНК, команду на запрограмовану смерть відразу після активації перемикача.

Бінарні регулюючі перемикачі

У деяких варіантах втілення вектор зкДНК включає регулюючий перемикач, який може служити для контрольованої модуляції експресії трансгена. У такому варіанті втілення експресійна касета, розташована між ITR вектора зкДНК, може додатково включати регуляторну ділянку, наприклад, промотор, цис-елемент, репресор, енхансер і т. ін., яка є функціонально зв'язаною з потрібним геном, де регуляторна ділянка регулюється одним або кількома кофакторами або екзогенними агентами. Відповідно, в одному варіанті втілення лише у разі, якщо один або декілька кофакторів або екзогенних агентів є присутніми у клітині, відбуватиметься транскрипція та експресія потрібного гена з вектора зкДНК. В іншому варіанті втілення один або декілька кофакторів або екзогенних агентів можуть застосовуватися для дерепресування транскрипції та експресії потрібного гена.

Будь-які нуклеїновокислотні регуляторні ділянки, відомі фахівцям у даній галузі, можуть застосовуватися у векторі зкДНК, призначеному для включення регулюючого перемикача. Наприклад, регуляторні ділянки можуть модулюватися низькомолекулярними перемикачами або індукцйбельним або репресованими промоторами. Необмежувальними прикладами індукцйбельних промоторів є індуквані гормонами або індуквані металами промотори. До інших типових індукцйбельних промоторних/енхансерних елементів відносяться, крім інших, індукований RU486 промотор, індукований екдизоном промотор, індукований рапаміцином промотор та металотіонеїновий промотор. Можуть застосовуватися класичні перемикачі на основі тетрацикліну або інші перемикачі на основі антибіотиків, включаючи описані в літературі (Fussenegger et al., Nature Biotechnol. 18: 1203 - 1208 (2000)).

В. Низькомолекулярні регулюючі перемикачі

Різні традиційні низькомолекулярні регулюючі перемикачі є відомими фахівцям у даній галузі і можуть комбінуватися з описаними авторами векторами зкДНК для утворення контрольованого регулюючим перемикачем вектора зкДНК. У деяких варіантах втілення регулюючий перемикач може бути вибраний серед будь-яких з нижчезазначених або їх комбінації: пари ортогонального ліганду/ядерного рецептора, наприклад, варіанта ретиноїдного рецептора/LG335 і GRQCIMFI, разом зі штучним промотором, який контролює експресію функціонально зв'язаного трансгена, наприклад, як описано у публікації Taylor, et al. BMC Biotechnology 10 (2010): 15; підданих інженерії стероїдних рецепторів, наприклад, модифікованого рецептора прогестерону з С-кінцевим зрізанням, що не може зв'язуватися з прогестероном, але зв'язується з RU486 (міфепристон) (патент США № 5,364,791); екдизонового рецептора з Drosophila та їхніх екдистероїдних лігандів (Saez, et al., PNAS, 97(26)(2000), 14512 - 14517; або перемикача, який контролюється антибіотиком триметопримом (TMP), як описується у публікації Sando R 3rd; Nat Methods. 2013, 10(11): 1085 - 8.

Інші регулюючі перемикачі на основі малих молекул, відомі фахівцям у даній галузі, також

передбачаються для застосування з метою контролю трансгенної експресії зкДНКі, до них відносяться, крім інших, ті, що описуються у публікації Buskirk et al., *Cell; Chem and Biol.*, 2005; 12(2); 151 - 161; чутливий до абсцизової кислоти вмикач; такий, як описується у публікації Liang, F.-S., et al., (2011) *Science Signaling*, 4(164); чутливі до екзогенного L-аргініну вмикачі, такі, як описані у публікації Hartenbach, et al. *Nucleic Acids Research*, 35(20), 2007, синтетичні чутливі до жовчної кислоти вмикачі, такі, як описані у публікації Rössger et al., *Metab Eng.* 2014, 21: 81 – 90; чутливі до біотину вмикачі такі, як описані у публікації Weber et al., *Metab. Eng.* 2009 Mar; 11(2): 117 – 124; подвійні чутливі до харчової добавки бензоату/ваніліну регулюючі перемикачі, такі, як описані у публікації Xie et al., *Nucleic Acids Research*, 2014; 42(14); e116; чутливі до 4-гідрокситамоксифену перемикачі, такі, як описані у публікації Giuseppe et al., *Molecular Therapy*, 6(5), 653 – 663; чутливі до флавоноїду (флоретину) регулюючі перемикачі, такі, як описані у публікації Gitzinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2009 Jun 30; 106(26): 10638 – 10643.

У деяких варіантах втілення регулюючий перемикач для контролю трансгена або експресований вектором зкДНК є перемикачем активації проліків, таким, як описується у патентах США 8,771,679 і 6,339,070.

До типових регулюючих перемикачів для застосування у векторах зкДНК відносяться, крім інших, представлені у Таблиці 11.

С. Регулюючі перемикачі з "кодом доступу"

У деяких варіантах втілення регулюючим перемикачем може бути "перемикач з кодом доступу" або "схема з кодом доступу". Перемикачі з кодом доступу дозволяють точно налаштовувати контроль експресії трансгена з вектора зкДНК у разі виникнення конкретних умов – тобто, комбінації умов, які мають бути наявними для експресії та/або пригнічення трансгена. Наприклад, для того, щоб відбулася експресія трансгена, повинні бути наявними принаймні умови А та В. Регулюючим перемикачем з кодом доступу може бути будь-яка кількість умов, наприклад, принаймні 2 або принаймні 3, або принаймні 4, або принаймні 5, або принаймні 6, або принаймні 7 або більше умов мають бути наявними для того, щоб відбулася експресія трансгена. У деяких варіантах втілення мають бути наявними принаймні 2 умови (наприклад, умови А, В), у деяких варіантах втілення мають бути наявними принаймні 3 умови (наприклад, А, В і С або А, В і D). Наприклад, для того, щоб відбулася експресія гена з зкДНК, яка має регулюючий перемикач з кодом доступу "ABC", повинні бути наявними умови А, В і С. Умови А, В і С можуть бути такими: умовою А є наявність стану або хвороби, умовою В є гормональна реакція, і умовою С є реакція на експресію трансгена. Як типовий приклад, якщо трансгеном є інсулін, Умова А є наявною якщо суб'єкт має діабет, Умова В є наявною, якщо рівень цукру в крові є високим, і Умовою С є рівень ендogenousного інсуліну, який не експресується у потрібній кількості. Щойно рівень цукру знижується, або досягається потрібний рівень інсуліну, трансген (наприклад, інсулін) вимикається знову, доки не виникнуть 3 умови, які знову його вмикають. В іншому типовому прикладі якщо трансгеном є ЕРО, Умовою А є наявність хронічної хвороби нирок (СКД), Умова В виникає, якщо суб'єкт має гіпоксичні стани у нирках, Умовою С є порушення рекрутингу продукуючих еритропоетин клітин (ЕРС); або, в альтернативному варіанті, активація HIF-2 є порушеною. Щойно рівень кисню підвищується, або досягається потрібний рівень ЕРО, трансген (наприклад, ЕРО) знову вимикається, доки не виникнуть 3 умови, які знову його вмикають.

Регулюючі перемикачі з кодом доступу застосовують для точного налаштування експресії трансгена з вектора зкДНК. Наприклад, регулюючий перемикач з кодом доступу може бути модульним, тобто, включати багато перемикачів, наприклад, тканиноспецифічний, індукцибельний промотор, який вмикається лише за наявності певного рівня метаболіту. У такому варіанті втілення для того, щоб відбулася експресія трансгена з вектора зкДНК, повинен бути присутній індукцибельний агент (умова А) у потрібному типі клітин (умова В), і метаболіт має бути на рівні, або нижчим або вищим за певний пороговий рівень (Умова С). В альтернативних варіантах втілення регулюючий перемикач з кодом доступу може бути передбачений таким чином, що експресія трансгена відбувається за наявності умов А та В, але вимикається за наявності умови С. Такий варіант втілення застосовують тоді, коли Умова С виникає як прямий результат експресованого трансгена – тобто, Умова С служить як позитивний зворотний зв'язок для петлі на вимкнення експресії трансгена з вектора зкДНК, коли трансген отримав достатній потрібний терапевтичний ефект.

У деяких варіантах втілення регулюючий перемикач з кодом доступу, включений для застосування у векторі зкДНК, розкривається в документі WO2017/059245, де описується перемикач, який називається "перемикачем з кодом доступу" або "схемою з кодом доступу" або "блокуючим перемикачем з кодом доступу", який є синтетичним біологічним циклом, який використовує гібридні фактори транскрипції (TF) для побудови складних навколишніх вимог для виживання клітин. Регулюючі перемикачі з кодом доступу, описані в документі WO2017/059245, є особливо корисними для застосування у векторах зкДНК, оскільки вони є модульними і піддаються індивідуальному налаштуванню, як стосовно навколишніх умов, які контролюють активацію схеми, так і у модулях виведення, які контролюють долю клітини. Крім того, схема з кодом доступу має конкретну функцію для застосування у векторах зкДНК, оскільки без відповідних молекул з "кодом доступу" експресія трансгена допускається лише за наявності потрібних заданих умов. Якщо з клітиною виникає якась проблема, або з якоїсь причини подальша експресія трансгена не вимагається, може бути задіяний відповідний блокуючий перемикач (тобто, аварійний вимикач).

У деяких варіантах втілення регулюючий перемикач з кодом доступу або "схема з кодом доступу", що передбачається для застосування у векторі зкДНК, включає гібридні фактори транскрипції (TF) для розширення діапазону та складності навколишніх сигналів, які застосовують для визначення умов біоізоляції. На відміну від аварійного вимикача, який запускає смерть клітини за наявності заданої умови, "схема з кодом доступу" забезпечує можливість виживання клітин або експресію трансгена за наявності конкретного "коду доступу" і може бути легко перепрограмована для того, щоб експресія трансгена та/або виживання клітини могли відбуватися лише за наявності заданої навколишньої умови або коду доступу.

В одному аспекті система "коду доступу", яка обмежує ріст клітин наявністю заданого набору з принаймні двох вибраних агентів, включає один або декілька нуклеїновокислотних конструктів, які кодують модулі експресії, які включають: i) модуль експресії токсину, що кодує токсин, який є токсичним для клітини-хазяїна, причому послідовність, яка кодує токсин, є функціонально зв'язаною з промотором P1, який пригнічується шляхом зв'язування першого гібридного репресорного білка hRP1; ii) модуль експресії першого гібридного репресорного білка, який кодує перший гібридний репресорний білок hRP1, причому експресія hRP1 контролюється AND-елементом, утвореним двома гібридними факторами транскрипції hTF1 та hTF2, зв'язування або активність якого реагує на агенти A1 та A2, відповідно, таким чином, що обидва агенти A1 та A2 вимагаються для експресії hRP1, причому за відсутності A1 або A2 експресія hRP1 є недостатньою для пригнічення промоторного модуля токсину P1 та продукування токсину, таким чином, щоб клітина-хазяїн знищувалася. У цій системі кожен з гібридних факторів hTF1, hTF2 і hRP1 включає модуль чутливості до середовища з одного фактора транскрипції та модуль розпізнавання ДНК з іншого фактора транскрипції, що робить зв'язування відповідного регулюючого перемикача з кодом доступу чутливим до присутності агента середовища, A1 або A2, який відрізняється від того, який відповідні субодиниці зазвичай мають зв'язувати у природі.

Відповідно, вектор зкДНК може включати "регулюючу схему з кодом доступу", яка вимагає присутності та/або відсутності специфічних молекул для активації вихідного модуля. У деяких варіантах втілення, у яких гени, які кодують клітинні токсини, є розташованими у вихідному модулі, ця регулююча схема з кодом доступу може бути застосована не лише для регулювання експресії трансгена, але й для створення механізму блокуючого перемикача, в якому схема знищує клітину, якщо клітина поводить себе у небажаний спосіб (наприклад, залишає конкретне середовище, визначене сенсорними доменами, або змінюється на інший тип клітини). В одному необмежувальному прикладі модулярність гібридних факторів транскрипції, архітектури схеми та вихідного модуля дозволяє переконфігурувати схему для чутливості до інших навколишніх сигналів, для реагування на навколишні сигнали в інші способи та для контролювання інших функцій у клітині додатково до індукованої смерті клітин, як стане зрозуміло фахівцям у даній галузі.

Будь-які та всі описані авторами комбінації регулюючих перемикачів, наприклад, низькомолекулярні перемикачі, перемикачі на основі нуклеїнових кислот, низькомолекулярні-нуклеїновокислотні гібридні перемикачі, перемикачі посттранскрипційної регуляції трансгенів, радіаційно-контрольовані перемикачі посттрансляційної регуляції, опосередковані гіпоксією перемикачі та інші регулюючі перемикачі, відомі фахівцям у даній галузі, як розкривається авторами, можуть застосовуватись у регулюючому перемикачі з кодом доступу, як розкривається авторами. Регулюючі перемикачі, передбачені для застосування, також обговорюються в оглядовій статті Kis et al., J R Soc Interface. 12: 20141000 (2015), і є зведеними у Таблиці 1 цієї статті. У деяких варіантах втілення регулюючий перемикач для застосування у системі коду доступу може бути вибраний серед будь-яких або комбінації перемикачів з Таблиці 11.

D. Регулюючі перемикачі на основі нуклеїнових кислот для контролю експресії трансгена

У деяких варіантах втілення регулюючий перемикач для контролю трансгена, який експресується зкДНК, ґрунтується на контрольному механізмі на основі нуклеїнової кислоти. Типові нуклеїновокислотні контрольні механізми є відомими фахівцям у даній галузі і передбачаються для застосування. Наприклад, такі механізми включають рибоперемикачі, такі, як описані наприклад, у документах US2009/0305253, US2008/0269258, US2017/0204477, WO2018026762A1, патенті США 9,222,093 і заявці EP288071, а також розкриваються в огляді Villa JK et al., Microbiol Spectr. 2018 May; 6(3). Також до них відносяться чутливі до метаболітів біодатчики транскрипції, такі, як описані в документах WO2018/075486 і WO2017/147585. Інші відомі фахівцям у даній галузі механізми, передбачені для застосування, включають сайленсинг трансгена молекулою міРНК або РНКі (наприклад, міРНК, кшРНК). Наприклад, вектор зкДНК може включати регулюючий перемикач, який кодує молекулу РНКі, яка є комплементарною трансгену, який експресується вектором зкДНК. Коли така РНКі експресується навіть якщо трансген експресується вектором зкДНК, вона пригнічується молекулою комплементарної РНКі, а коли РНКі не експресується при експресії трансгена вектором зкДНК, трансген не пригнічується РНКі. Такий приклад молекули РНКі, яка контролює експресію гена, або як регулюючого перемикача розкривається в документі US2017/0183664. У деяких варіантах втілення регулюючий перемикач включає репресор, який блокує експресію трансгена з вектора зкДНК. У деяких варіантах втілення перемикач увімкнення/вимкнення є перемикачем на основі малої активуючої транскрипції РНК (STAR), наприклад, такої, як описана у публікаціях Chappell J. et al., Nat Chem Biol. 2015 Mar; 11(3): 214 - 20; та Chappell et al., Microbiol Spectr. 2018 May; 6(3). У деяких

варіантах втілення регулюючим перемикачем є toehold-перемикач, такий, як описується в документах US2009/0191546, US2016/0076083, WO2017/087530, US2017/0204477, WO2017/075486 та публікації Green et al, Cell, 2014; 159(4); 925 - 939.

У деяких варіантах втілення регулюючий перемикач є тканинспецифічним автоматичним регулюючим перемикачем, наприклад, як описано в документі US2002/0022018, і, таким чином, регулюючий перемикач спеціально вимикає експресію трансгена у сайті, де експресія трансгена, якби відбулася, була б несприятливою. У деяких варіантах втілення регулюючий перемикач є системою оборотної експресії гена рекомбінази, наприклад, як розкривається в документі US2014/0127162 та патенті США 8,324,436.

У деяких варіантах втілення регулюючий перемикач для контролю трансгена або потрібного гена, який експресується вектором зкДНК є гібридом контрольного механізму на основі нуклеїнової кислоти та низькомолекулярної регуляторної системи. Такі системи є добре відомими серед фахівців у даній галузі і передбачаються для застосування згідно з винаходом. Прикладами таких регулюючих перемикачів є, крім інших, система LTRi або система "Lac-Tet-PHKi", наприклад, як розкривається в документі US2010/0175141 й у публікації Deans T. et al., Cell., 2007, 130(2); 363 - 372, документі WO2008/051854 та патенті США 9,388,425.

У деяких варіантах втілення регулюючий перемикач для контролю трансгена або потрібного гена, який експресується вектором зкДНК, включає циклічну перестановку, як розкривається у патенті США 8,338,138. У такому варіанті втілення молекулярний перемикач є багатостановим, тобто, здатен перемикатися між принаймні двома станами, або, в альтернативному варіанті, двостановим, тобто, в "увімкненому", або у "вимкненому" стані, наприклад, здатним або не здатним до випромінювання світла, здатним або не здатним до зв'язування, здатним або не здатним до каталізу, здатним або не здатним до перенесення електронів, і т. д. В іншому аспекті молекулярний перемикач використовує зливу молекулу, і, таким чином, перемикач є здатним перемикатися між більш ніж двома станами. Наприклад, у відповідь на конкретний пороговий стан, який демонструється вставленою послідовністю або акцепторною послідовністю, відповідна інша послідовність злиття може демонструвати низку станів (наприклад, діапазон зв'язувальної активності, діапазон ферментного каталізу і т. ін.). Таким чином, замість перемикання між "увімкненим" та "вимкненим" станами злита молекула може демонструвати поетапну відповідь на подразник.

У деяких варіантах втілення регулюючий перемикач на основі нуклеїнової кислоти може бути вибраний серед будь-яких або з комбінації перемикачів з Таблиці 11.

Е. Посттранскрипційні та посттрансляційні регулюючі перемикачі

У деяких варіантах втілення регулюючий перемикач для контролю трансгена або потрібного гена, який експресується вектором зкДНК, є система посттранскрипційної модифікації. Наприклад, такий регулюючий перемикач може бути аптазним рибоперемикачем, який є чутливим до тетрацикліну або теофіліну, як розкривається в документах US2018/0119156, GB201107768, WO2001/064956A3, патенті EP 2707487 та публікації Beilstein et al., ACS Synth. Biol., 2015, 4 (5), pp 526 – 534; Zhong et al., Elife. 2016 Nov 2; 5. pii: e18858. У деяких варіантах втілення передбачається, що фахівець у даній галузі зможе кодувати трансген та інгібіторну міРНК, яка містить чутливий до ліганду (вимикаючий перемикач) аптамер, кінцевим результатом чого є чутливий до ліганду вмикаючий перемикач.

У деяких варіантах втілення регулюючий перемикач для контролю трансгена або потрібного гена, який експресується вектором зкДНК, є системою посттрансляційної модифікації. В альтернативних варіантах втілення потрібний ген або білок експресується як пробілок або препробілок або має елемент відповіді на сигнал (SRE) або дестабілізуючий домен (DD), приєднаний до експресованого білка, що перешкоджає правильному складанню та/або активності білка, доки не відбудеться посттрансляційна модифікація. У разі дестабілізуючого домену (DD) або SRE дестабілізуючий домен піддається посттрансляційному розщепленню у присутності екзогенного агента або малої молекули. Фахівець у даній галузі може застосовувати такі способи контролю, як розкривається у патенті США 8,173,792 та заявці РСТ WO2017180587. Інші посттранскрипційні контрольні перемикачі, передбачені для застосування у векторі зкДНК для контролювання активності функціонального трансгена, описуються у публікаціях Rakhit et al., Chem Biol. 2014; 21(9): 1238 - 52 та Navarro et al., ACS Chem Biol. 2016; 19; 11(8): 2101 – 2104A.

У деяких варіантах втілення регулюючий перемикач для контролю трансгена або потрібного гена, який експресується вектором зкДНК, є системою посттрансляційної модифікації, яка включає чутливий до ліганду інтеїни у кодуючу трансген послідовність, таким чином, що трансген або експресований білок інгібується перед сплайсингом. Наприклад, це було продемонстровано з використанням як 4-гідрокситамоксифену, так і тиреоїдного гормону (див., наприклад, патенти США 7,541,450, 9,200,045; 7,192,739, публікації Buskirk, et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jul 20; 101(29): 10505 – 10510; ACS Synth Biol. 2016 Dec 16; 5(12): 1475 – 1484; та 2005 Feb; 14(2): 523 – 532. У деяких варіантах втілення регулюючий перемикач на посттранскрипційній основі може бути вибраний серед будь-яких або з комбінації перемикачів з Таблиці 11.

Ф. Інші типові регулюючі перемикачі

Будь-який відомий регулюючий перемикач може застосовуватися у векторі зкДНК для контролю генної експресії трансгена, який експресується вектором зкДНК, включаючи ті, що викликаються змінами середовища. Додатковими прикладами є, крім інших: спосіб VOC згідно з Suzuki et al.,

Scientific Reports 8; 10051 (2018); розширення генетичного коду та нефізіологічна амінокислота; перемикачі увімкнення/вимкнення, контрольовані випромінюванням або ультразвуком (див., наприклад, Scott S et al., Gene Ther. 2000 Jul; 7(13): 1121 - 5; патенти США 5,612,318; 5,571,797; 5,770,581; 5,817,636; і документ WO1999/025385A1. У деяких варіантах втілення регулюючий перемикач контролюється імплантованою системою, наприклад, як розкривається у патенті США 7,840,263; документі US2007/0190028A1, у якій експресія гена контролюється однією або кількома формами енергії, включаючи електромагнітну енергію, яка активує промотори, функціонально зв'язані з трансгеном у векторі зкДНК.

У деяких варіантах втілення регулюючий перемикач, передбачений для застосування у векторі зкДНК, є опосередкованим гіпоксією або стрес-активованим перемикачем, наприклад, таким, як описано в документі WO1999060142A2, патентах США 5,834,306; 6,218,179; 6,709,858; US2015/0322410; публікації Greco et al., (2004) Targeted Cancer Therapies 9, S368, а також елементи FROG, TOAD і NRSE й елементи умовно індукцйбельного сайленсингу, включаючи елементи гіпоксичної реакції (HRE), елементи запальної реакції (IRE) й активовані механічним подразненням елементи (SSAE), наприклад, як розкривається у патенті США 9,394,526. Такий варіант втілення застосовують для увімкнення експресії трансгена з вектора зкДНК після ішемії або в ішемічних тканинах і/або пухлинах.

У деяких варіантах втілення регулюючий перемикач, передбачений для застосування у векторі зкДНК, є оптогенетичним (наприклад, контрольованим світлом) регулюючим перемикачем, наприклад, таким, як один з перемикачів, які розглядаються у публікації Polevskaya et al., BMC Neurosci. 2018; 19 (Suppl 1): 12, і також є передбаченими для застосування згідно з винаходом. У таких варіантах втілення вектор зкДНК може включати генетичні елементи, які є чутливими до світла і можуть регулювати експресію трансгена у відповідь на довжину хвиль у видимому діапазоні (наприклад, синьому, ближньому інфрачервоному). Вектори зкДНК, які включають оптогенетичні регулюючі перемикачі, застосовують при експресії трансгена у місцях організму, які можуть отримувати такі джерела світла, наприклад, шкірі, очах, м'язах і т. ін., а також вони можуть застосовуватися, коли вектори зкДНК експресують трансгени у внутрішніх органах та тканинах, якщо світловий сигнал забезпечується підходящими засобами (наприклад, імплантованим пристроєм, як розкривається авторами). Такі оптогенетичні регулюючі перемикачі включають застосування реагуючих на світло елементів або індукованого світлом транскрипційного ефектора (LITE) (наприклад, описаного в документі 2014/0287938), системи увімкнення світла (наприклад, описаної у публікації Wang et al., Nat Methods. 2012 Feb 12; 9(3): 266 - 9; про яку відомо, що вона забезпечує можливість *in vivo* контролю експресії трансгена інсуліну, системи Cry2/CIB1 (наприклад, як описано у публікації Kennedy et al., Nature Methods; 7, 973 – 975 (2010); та системи FKF1/GIGANTEA (наприклад, як описано у публікації Yazawa et al., Nat Biotechnol. 2009 Oct; 27(10): 941 - 5).

Г. Блокуючі перемикачі

Інші варіанти втілення винаходу стосуються вектора зкДНК, який включає блокуючий перемикач. Блокуючий перемикач, як розкривається авторами, дозволяє знищувати клітину, яка включає вектор зкДНК, або піддає її запрограмованій смерті для остаточного усунення включеного вектора зкДНК з системи суб'єкта. Фахівцям у даній галузі стане зрозуміло, що застосування блокуючих перемикачів у векторах зкДНК згідно з винаходом зазвичай має поєднуватися з націленням вектора зкДНК на обмежену кількість клітин, які суб'єкт може у прийнятних межах втратити, або на тип клітин, у яких вимагається апоптоз (наприклад, ракові клітини). В усіх аспектах "блокуючий перемикач", як розкривається авторами, передбачено для забезпечення швидкого й надійного знищення клітини, яка включає вектор зкДНК, за відсутності вхідного сигналу виживання або іншого зазначеного стану. Іншими словами, блокуючий перемикач, який кодується вектором зкДНК згідно з винаходом, може обмежувати виживання клітини, яка включає вектор зкДНК, середовищем, визначеним конкретними вхідними сигналами. Такі блокуючі перемикачі виконують біологічну функцію біоізоляції, якщо виникає потреба у видаленні вектора зкДНК з організму суб'єкта або для того, щоб гарантувати, що він не експресуватиме кодований трансген. Відповідно, блокуючі перемикачі є синтетичними біологічними схемами у векторі зкДНК, які пов'язують навколишні сигнали з умовним виживанням клітини, яка включає вектор зкДНК. У деяких варіантах втілення різні вектори зкДНК можуть бути побудовані таким чином, щоб мати різні блокуючі перемикачі. Це дозволяє контролювати, які експресуючі трансген клітини мають бути знищені, якщо застосовуються суміші векторів зкДНК.

У деяких варіантах втілення вектор зкДНК може включати блокуючий перемикач, який є модульною схемою біологічного стримування. У деяких варіантах втілення блокуючий перемикач, що передбачається для застосування у векторі зкДНК, розкривається в документі WO2017/059245, де описується перемикач, який називається "аварійним блокуючим перемикачем", який включає взаємно інгібуючу структуру з принаймні двох репресованих послідовностей, таким чином, щоб сигнал середовища пригнічував активність другої молекули у конструкті (наприклад, фактор транскрипції, що зв'язується з малою молекулою, застосовують для забезпечення стану "виживання" через пригнічення продукування токсину). У клітинах, які включають вектор зкДНК, який включає аварійний блокуючий перемикач, після втрати сигналу середовища схема остаточно перемикається на стан "смерті", у якому токсин стає пригніченим, що веде до продукування токсину, який знищує клітину. В іншому варіанті втілення передбачено синтетичний біологічний цикл, який називається "схемою з кодом

доступу" або "блокуючим перемикачем з кодом доступу", у якому використовуються гібридні фактори транскрипції (TF) для побудови складних навколишніх вимог для виживання клітин. Аварійні та блокуючі перемикачі з кодом доступу, описані в документі WO2017/059245, є особливо корисними для застосування у векторах зкДНК, оскільки вони є модульними і піддаються індивідуальному налаштуванню, як стосовно навколишніх умов, які контролюють активацію схеми, так і у модулях виведення, які контролюють долю клітини. При належному виборі токсинів, включаючи, крім інших, ендонуклеазу, наприклад, EcoRI, схеми з кодом доступу, присутні у векторі зкДНК, можуть застосовуватися не лише для знищення клітини-хазяїна, що включає вектор зкДНК, але й для знищення її геному та супровідних плазмід.

Інші блокуючі перемикачі, відомі фахівцям у даній галузі, передбачаються для застосування у векторі зкДНК, як розкривається авторами, наприклад, як розкривається в документах US2010/0175141; US2013/0009799; US2011/0172826; US2013/0109568, а також блокуючі перемикачі, які розкриваються у публікаціях 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; та Reinshagen et al., *Science Translational Medicine*, 2018, 11.

Відповідно, у деяких варіантах втілення вектор зкДНК може включати нуклеїновокислотний конструкт блокуючого перемикача, який включає нуклеїнову кислоту, яка кодує ефекторний токсин або репортерний білок, причому експресія ефекторного токсину (наприклад, білка смерті) або репортерного білка контролюється заданим станом. Наприклад, заданим станом може бути присутність агента середовища, такого, як, наприклад, екзогенний агент, без якого клітина не зможе експресувати ефекторний токсин (наприклад, білок смерті) і бути знищеною. В альтернативних варіантах втілення заданим станом є присутність двох або більшої кількості агентів середовища, наприклад, клітина може вижити лише тоді, коли забезпечуються два або більше необхідних екзогенних агентів, і без будь-якого з них клітина, яка включає вектор зкДНК, знищується.

У деяких варіантах втілення вектор зкДНК є модифікованим таким чином, щоб включати блокуючий перемикач для руйнування клітин, які включають вектор зкДНК, для ефективного припинення *in vivo* експресії трансгена, який експресується вектором зкДНК (наприклад, терапевтичного гена, білка або пептиду і т. ін.). Зокрема, вектор зкДНК є підданим подальшій генній інженерії для експресії білка-перемикача, який не є функціональним у клітинах ссавців за нормальних фізіологічних умов. Лише після введення медикаменту або створення навколишніх умов, які є специфічно націленими на цей білок-перемикач, клітина, яка експресує білок-перемикач, руйнується, таким чином, припиняючи експресію терапевтичного білка або пептиду. Наприклад, повідомлялося, що клітини, які експресують HSV-тимідинкіназу, можуть бути знищені після введення медикаментів, таких, як ганцикловір та цитозиндезамінази. Див., наприклад, Dey and Evans, *Suicide Gene Therapy by Herpes Simplex Virus-1 Thymidine Kinase (HSV-TK)*, у *Targets in Gene Therapy*, видавництво You (2011); та Beltinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(15): 8699 - 8704 (1999). У деяких варіантах втілення вектор зкДНК може включати блокуючий перемикач міПНК, який називається DISE (Смерть, викликана видаленням гена виживання) (Murmman et al., *Oncotarget*. 2017; 8: 84643 - 84658. *Induction of DISE in ovarian cancer cells in vivo*).

У деяких аспектах аварійний блокуючий перемикач є біологічною схемою або системою, яка робить клітинну реакцію чутливою до заданого стану, такого, як відсутність агента у середовищі росту клітин, наприклад, екзогенного агента. Така схема або система може включати нуклеїновокислотний конструкт, який включає модулі експресії, які утворюють аварійну регулюючу схему, чутливу до заданого стану, конструкт, який включає модулі експресії, які утворюють регулюючу схему, причому конструкт включає:

i) модуль експресії першого репресорного білка, причому перший репресорний білок зв'язується зі зв'язувальним елементом нуклеїнової кислоти першого репресорного білка і пригнічує транскрипцію з кодуючої послідовності, яка включає зв'язувальний елемент першого репресорного білка, і пригнічувальна активність першого репресорного білка є чутливою до інгібування першим екзогенним агентом, причому присутність або відсутність першого екзогенного агента встановлює заданий стан;

ii) модуль експресії другого репресорного білка, причому другий репресорний білок зв'язується зі зв'язувальним елементом нуклеїнової кислоти другого репресорного білка і пригнічує транскрипцію з кодуючої послідовності, яка включає зв'язувальний елемент другого репресорного білка, причому другий репресорний білок відрізняється від першого репресорного білка; та

iii) модуль експресії ефектора, який включає нуклеїновокислотну послідовність, яка кодує ефекторний білок, функціонально зв'язаний з генетичним елементом, який включає зв'язувальний елемент для другого репресорного білка, таким чином, що експресія другого репресорного білка викликає пригнічення експресії ефектора з модуля експресії ефектора, причому другий модуль експресії включає зв'язувальний елемент нуклеїнової кислоти першого репресорного білка, який дозволяє пригнічувати транскрипцію другого репресорного білка, коли елемент зв'язується першим репресорним білком, причому відповідні модулі утворюють регулюючу схему, таким чином, що за відсутності першого екзогенного агента перший репресорний білок продукується з модуля експресії першого репресорного білка і пригнічує транскрипцію з модуля експресії другого репресорного білка, таким чином, що пригнічення експресії ефектора другим репресорним білком послаблюється, що в результаті веде до експресії ефекторного білка, але у присутності першого екзогенного агента

активність першого репресорного білка інгібується, що забезпечує можливість експресії другого репресорного білка, що підтримує експресію ефекторного білка у "вимкненому" стані, таким чином, що схемою вимагається перший екзогенний агент для підтримання експресії ефекторного білка у "вимкненому" стані, і видалення або відсутність першого екзогенного агента припиняє експресію ефекторного білка.

У деяких варіантах втілення ефектор є токсином або білком, який викликає програму смерті клітин. Може застосовуватися будь-який білок, який є токсичним для клітини-хазяїна. У деяких варіантах втілення токсин знищує лише клітини, в яких він експресується. В інших варіантах втілення токсин знищує інші клітини того самого організму-хазяїна. В аварійному блокуючому перемикачі можуть застосовуватися будь-які з багатьох продуктів, які призводять до загибелі клітин. Особливо корисними є агенти, які інгібують реплікацію ДНК, трансляцію білка або інші процеси, або, наприклад, ті, які розщеплюють нуклеїнову кислоту клітини-хазяїна. Для виявлення ефективного механізму знищення клітин-хазяїнів після активації схеми випробували декілька генів токсинів, які безпосередньо пошкоджують ДНК або РНК клітини-хазяїна. Випробували *ecoRI*²¹ ендонуклеази, інгібітор ДНК-гірази *ccdB*²² та токсин рибонуклеазного типу *mazF*²³, оскільки вони є добре дослідженими, є нативними для *E. coli* і забезпечують низку механізмів знищення. Для підвищення стійкості схеми та забезпечення незалежного способу залежної від схеми смерті клітин система може бути додатково пристосована для експресії, наприклад, націленої протеази або нуклеази, яка створює подальші перешкоди для репресора, що підтримує ген смерті у "вимкненому" стані. Після втрати або видалення сигналу виживання пригнічення гена смерті ще ефективніше усувається, наприклад, через активне руйнування репресорного білка або його перенесення. Як необмежувальні приклади, *mf-Lon* протеазу використовували не лише для руйнування *lacI*, але й націлювання на незамінні білки для руйнування. Тег руйнування *mf-Lon pdt#1* може додаватися до 3' кінця п'яти незамінних генів, білкові продукти яких є особливо чутливими до руйнування *mf-Lon*²⁰, і життєздатність клітин вимірювали після видалення АТс. Серед випробуваних незамінних генів-мішеней ген синтезу пептидоглікану *murC* забезпечував найміцніший і найшвидший фенотип смерті клітин (пропорція виживання < 1 x 10⁻⁴ протягом 6 годин).

У контексті даного опису термін "заданий початковий чинник" стосується агента або стану, який впливає на активність поліпептиду фактора транскрипції у відомий спосіб. Зазвичай такі агенти можуть зв'язуватися і/або змінювати конформацію поліпептиду фактора транскрипції для того, щоб таким чином модифікувати активність поліпептиду фактора транскрипції. Прикладами заданих початкових чинників є, крім інших, агенти впливу навколишнього середовища, які не вимагаються для виживання даного організму-хазяїна (тобто, за відсутності синтетичного біологічного циклу, як описується авторами). Умови, які можуть забезпечувати заданий початковий чинник, включають, наприклад температуру, наприклад, у випадках, якщо активність одного або декількох факторів є чутливою до температури, наявності або відсутності світла, включаючи світло даного спектра довжини хвиль, та концентрація газу, солі, металу або мінералу. До агентів впливу навколишнього середовища відносяться, наприклад, низькомолекулярні, біологічні агенти, такі, як феромони, гормони, фактори росту, метаболіти, поживні речовини і т. ін. та їхні аналоги; концентрація хімічних речовин, побічні продукти середовища, іони металів та інші подібні молекули або агенти; рівень світла; температура; механічне навантаження або тиск; або електричні сигнали, такі, як струм та напруга.

У деяких варіантах втілення застосовують репортери для кількісного визначення сили або активності сигналу, який приймається модулями або запрограмованими синтетичними біологічними циклами згідно з винаходом. У деяких варіантах втілення репортери можуть бути злитими всередині рамки з іншими кодуючими білками послідовностями для визначення місця розташування білка у клітині або організмі. Люциферази можуть застосовуватися як ефекторні білки для різних описаних авторами варіантів втілення, наприклад, вимірювання рівня експресії гена, оскільки клітини зазвичай не мають або майже не мають фонові люмінесценції за відсутності люциферази. В інших варіантах втілення ферменти, які продукують забарвлені субстрати, можуть бути кількісно визначені з застосуванням спектрофотометрів або інших інструментів, які можуть вимірювати оптичну густину, включаючи зчитувачі планшетів. Так само, як люциферази, такі ферменти, як β -галактозидаза, можуть застосовуватися для вимірювання низького рівня експресії гена, оскільки вони зазвичай посилюють низькі сигнали. У деяких варіантах втілення ефекторний білок може бути ферментом, який може руйнувати або іншим чином знищувати даний токсин. У деяких варіантах втілення ефекторний білок може бути пахучим ферментом, який перетворює субстрат на пахучий продукт. У деяких варіантах втілення ефекторний білок може бути ферментом, який фосфорилує або дефосфорилує малі молекули або інші білки, або ферментом, який метилує або деметилує інші білки або ДНК.

У деяких варіантах втілення ефекторний білок може бути рецептором, лігандом або літичним білком. Рецептори зазвичай мають три домени: позаклітинний домен для зв'язування лігандів, таких, як білки, пептиди та малі молекули, трансмембранний домен та внутрішньоклітинний або цитоплазматичний домен, який часто може брати участь у події трансдукції сигналу певного типу, наприклад фосфорилуванні. У деяких варіантах втілення застосовують послідовності генів-транспортів, каналних генів або насосних генів як ефекторні білки. Необмежувальні приклади та послідовності ефекторних білків для застосування з блокуючими перемикачами, як описується авторами, містяться у Реєстрі стандартних біологічних частин у всесвітній мережі на сторінці parts.igem.org.

У контексті цього опису "модуючий білок" означає білок, який модулює експресію з заданої нуклеїновокислотної послідовності. Модуючі білки включають, наприклад, фактори транскрипції, включаючи, крім інших, транскрипційні активатори та репресори, та білки, які зв'язуються з фактором транскрипції або модифікують його та впливають на його активність. У деяких варіантах втілення модулюючий білок включає, наприклад, протеазу, яка розщеплює фактор білка, задіяний у регуляції експресії з заданої нуклеїновокислотної послідовності. Оптимальними модулюючими білками є модульні білки, в яких, наприклад, елементи або домени, які зв'язуються з ДНК та вхідним агентом або реагують на них, піддаються відокремленню та перенесенню, таким чином, щоб, наприклад, злиття домену зв'язування ДНК першого модулюючого білка з реагуючим на вхідний агент доменом другого в результаті утворювало новий білок, який зв'язується з послідовністю ДНК, розпізнаною першим білком, проте є чутливим до вхідного агента, на який зазвичай реагує другий білок. Відповідно, у контексті даного опису термін "модуючий поліпептид", більш конкретно "репресорний поліпептид" включає, додатково до зазначених поліпептидів, наприклад, "LacI (репресорний) поліпептид", варіанти або похідні таких поліпептидів, які реагують на інший вхідний агент або його варіант. Таким чином, у разі LacI-поліпептиду включаються мутанти або варіанти LacI, які зв'язуються з агентами, відмінними від лактози або IPTG. Широке коло таких агентів є відомим фахівцям у даній галузі.

. Типові регулюючі перемикачі: ^bON – перемикання через ефектор; без усунення ефектора, який забезпечує вимкнений стан. ^cOFF – перемикання через ефектор; без усунення ефектора, який забезпечує увімкнений стан. ^dЛіганд або інший фізичний подразник (наприклад, температура, електромагнітне випромінювання, електричний струм), який стабілізує перемикач в увімкненому або вимкненому стані. ^eОзначає номер посилання, вказаний у публікації Kis et al., J R Soc Interface. 12: 20141000 (2015), причому стаття та наведені в ній посилання включаються до цього опису шляхом посилання.

Таблиця 11

№	Назва	ON перем. ^b	OFF перем. ^c	Походження	Ефектор ^d	Посилання ^e
Транскрипційні перемикачі						
1	ABA	так	ні	<i>Arabidopsis thaliana</i> , дріжджі	абсцизова кислота	[19]
2	AIR	так	ні	<i>Aspergillus nidulans</i>	ацетальдегід	[20]
3	ART	так	ні	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	l-аргінін	[21]
4	BEARON, BEAROFF	так	так	<i>Campylobacter jejuni</i>	жовчна кислота	[22]
5	BirA-tTA	ні	так	<i>Escherichia coli</i>	біотин (вітамін H)	[23]
6	BIT	так	ні	<i>Escherichia coli</i>	біотин (вітамін H)	[24]
7	Cry2-CIB1	так	ні	<i>Arabidopsis thaliana</i> , дріжджі	синє світло	[25]
8	CTA, CTS	так	так	<i>Comamonas testosteroni</i> , <i>Homo sapiens</i>	харчові добавки (бензоат, ванілат)	[26]
9	cTA, rcTA	так	так	<i>Pseudomonas putida</i>	кумат	[27]
10	Екдизон	так	ні	<i>Homo sapiens</i> , <i>Drosophila melanogaster</i>	Екдизон	[28]
11	EcR:RXR	так	ні	<i>Homo sapiens</i> , <i>Locusta migratoria</i>	екдизон	[29]
12	electro-genetic	так	ні	<i>Aspergillus nidulans</i>	електричний струм, ацетальдегід	[30]
13	ER-p65-ZF	так	ні	<i>Homo sapiens</i> , дріжджі	4,4'-дигідроксибензил	[31]
14	E.REX	так	так	<i>Escherichia coli</i>	еритроміцин	[32]
15	EthR	ні	так	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2-фенілетил-бутират	[33]
16	GAL4-ER	так	так	дріжджі, <i>Homo sapiens</i>	естроген, 4-гідрокситамоксифен	[34]
17	GAL4-hPR	так	так	дріжджі, <i>Homo sapiens</i>	Міфепристон	[35, 36]

Таблиця 11

№	Назва	ON перем. ^b	OFF перем. ^c	Походження	Ефектор ^d	Посилання ^e
18	GAL4-Raps	так	так	дріжджі, <i>Homo sapiens</i>	рапаміцин та похідні рапаміцину	[37]
19	GAL4-TR	так	ні	дріжджі, <i>Homo sapiens</i>	тиреоїдний гормон	[38]
20	GyrB	так	так	<i>Escherichia coli</i>	кумерміцин, новобіоцин	[39]
21	HEA-3	так	ні	<i>Homo sapiens</i>	4-гідрокситамоксифен	[40]
22	Intramer	ні	так	Синтетичні похідні від SELEX аптамери	теофілін	[41]
23	LacI	так	ні	<i>Escherichia coli</i>	IPTG	[42 – 46]
24	LAD	так	ні	<i>Arabidopsis thaliana</i> , дріжджі	синє світло	[47]
25	LightOn	так	ні	<i>Neurospora crassa</i> , дріжджі	синє світло	[48]
26	NICE	так	так	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	6-гідроксинікотин	[49]
27	PPAR*	так	ні	<i>Homo sapiens</i>	росиглітазон	[50]
28	PEACE	ні	так	<i>Pseudomonas putida</i>	флавоноїди (наприклад, флоретин)	[51]
29	PIT	так	так	<i>Streptomyces coelicolor</i>	пристинраміцин I, вірджиніаміцин	[12]
30	REDOX	ні	так	<i>Streptomyces coelicolor</i>	NADH	[52]
31	QuoRex	так	так	<i>Streptomyces coelicolor</i> , <i>Streptomyces pristinaespiralis</i>	бутиролактони (наприклад, SCB1)	[53]
32	ST-TA	так	так	<i>Streptomyces coelicolor</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Herpes simplex</i>	γ-бутиролактон, тетрациклін	[54]
33	TIGR	ні	так	<i>Streptomyces albus</i>	температура	[55]
34	TraR	так	ні	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	N-(3-оксо-октаноїл)гомосерин лактон	[56]
35	TET-OFF, TET-ON	так	так	<i>Escherichia coli</i> , <i>Herpes simplex</i>	тетрациклін, доксициклін	[11, 57]
36	TRT	так	ні	<i>Chlamydia trachomatis</i>	l-триптофан	[58]
37	UREX	так	ні	<i>Deinococcus radiodurans</i>	сечова кислота	[59]
38	VAC	так	так	<i>Caulobacter crescentus</i>	ванілінова кислота	[60]
39	ZF-ER, ZF-RXR/EcR	так	так	<i>Mus musculus</i> , <i>Homo sapiens</i> , <i>Drosophila melanogaster</i>	4-гідрокситамоксифен, понастерон-А	[61]
40	ZF-Raps	так	ні	<i>Homo sapiens</i>	рапаміцин	[62]
41	ZF перемикачі	так	ні	<i>Mus musculus</i> , <i>Homo sapiens</i> , <i>Drosophila melanogaster</i>	4-гідрокситамоксифен, міфепристон	[63]

Таблиця 11

№	Назва	ON перем. ^b	OFF перем. ^c	Походження	Ефектор ^d	Посилання ^e
42	ZF(TF)s	так	ні	Xenopus laevis, Homo sapiens	етил-4- гідроксибензоат, пропіл-4- гідроксибензоат	[64]
посттранскрипційні перемикачі						
1	аптамер РНКі	так	ні	Синтетичний похідний від SELEX аптамер	теофілін	[65]
2	аптамер РНКі	ні	так	синтетичний похідний від SELEX аптамер	теофілін	[66]
3	аптамер РНКі мікроРНК	так	ні	синтетичний похідний від SELEX аптамер	теофілін, тетрациклін, гіпоксантин	[67]
4	аптамер сплайсинг	так	так	Homo sapiens, MS2 бактеріофаг	MS2, p65, p50, b- катенін	[68]
5	аптазим	ні	так	синтетичний похідний від SELEX аптамер, Schistosoma mansoni	теофілін	[69]
6	реплікон CytTS	так	ні	Вірус Синдбіс	температура	[70]
7	TET-OFF- кшРНК, TET- ON-кшРНК	так	так	Escherichia coli, Herpes simplex, Homo sapiens	доксидиклін	[71]
8	theo аптамер	ні	так	синтетичний похідний від SELEX аптамер	теофілін	[72]
9	3' UTR аптазим	так	ні	синтетичний похідний від SELEX аптамери, вірус кільцевої плямистості тютюну	теофілін тетрациклін	[73]
10	5' UTR аптазим	ні	так	синтетичний похідний від SELEX аптамер, Schistosoma mansoni	теофілін	[74]
трансляційні перемикачі						
1	Аптамер Хьохста	ні	так	синтетична послідовність РНК	Барвник Хьохста	[75]
2	H23 аптамер	ні	так	Archaeoglobus fulgidus	L7Ae, L7KK	[76]
3	L7Ae аптамер	так	так	Archaeoglobus fulgidus	L7Ae	[77]
4	MS2 аптамер	ні	так	MS2 бактеріофаг	MS2	[78]
посттрансляційні перемикачі						
1	AID	ні	так	Arabidopsis thaliana, Oryza sativa, Gossypium hirsutum	ауксини (наприклад, IAA)	[79]
2	ER DD	ні	так	Homo sapiens	СМР8, 4- гідрокситамоксифен	[80]

Таблиця 11

№	Назва	ON перем. ^b	OFF перем. ^c	Походження	Ефектор ^d	Посилання ^e
3	FM	так	ні	Homo sapiens	AP21998	[81]
4	HaloTag	ні	так	Rhodococcus sp. RNA1	HyT13	[82, 83]
5	HDV-аптазим	ні	так	вірус гепатиту- дельта	теофілін, гуанін	[84]
6	PROTAC	ні	так	Homo sapiens	націлені на протеоліз химерні молекули (PROTACS)	[85]
7	щит DD	так	ні	Homo sapiens	щити (наприклад, Shld1)	[86]
8	щит LID	ні	так	Homo sapiens	щити (наприклад, Shld1)	[87]
9	TMP DD	так	ні	Escherichia coli	триметоприм (TMP)	[88]

Дентальний спосіб продукування вектора зкДНК

Продукування в цілому

Як описується авторами, вектор зкДНК може бути одержаний з застосуванням процесу, що включає етапи: а) інкубації популяції клітин-хазяїнів (наприклад, клітин комах), які містять матрицю експресійного конструкту полінуклеотиду (наприклад, зкДНК-плазмиду, зкДНК-бакміду та/або зкДНК-бакуловірусу), яка є позбавленою кодуючих послідовностей вірусного капсиду, у присутності Rep-білка в умовах, ефективних, і протягом часу, достатнього для викликання продукування вектора зкДНК у клітинах-хазяїях, причому клітини-хазяїни не включають кодуючих послідовностей вірусного капсиду; та б) збирання й виділення вектора зкДНК з клітин-хазяїнів. Присутність Rep-білка викликає реплікацію векторного полінуклеотиду з модифікованим ITR для продукування вектора зкДНК у клітині-хазяїні. Однак вірусні частинки (наприклад, AAV віріони) експресуються. Таким чином, не існує обмеження розмірів, такого, як природне обмеження в AAV або інших векторах на вірусній основі.

Присутність вектора зкДНК, виділеного з клітин-хазяїнів, може бути підтверджена шляхом розщеплення ДНК, виділеної з клітини-хазяїна, рестрикційним ферментом, який має єдину ділянку розпізнавання на векторі зкДНК, та аналізу матеріалу розщепленої ДНК на неденатуруючому гелі для підтвердження наявності характерних смуг лінійної й безперервної ДНК у порівнянні з лінійною й переривчастою ДНК.

У ще одному аспекті винахід передбачає застосування ліній клітин-хазяїнів, які мають стійко інтегровану матрицю експресії полінуклеотиду ДНК-вектора (матрицю зкДНК) в їхній геном, при продукуванні невірусного ДНК-вектора, наприклад, як описано у публікації Lee, L. et al. (2013) Plos One 8(8): e69879. В оптимальному варіанті Rep додають до клітин-хазяїнів при MOI, що складає приблизно 3. Коли лінія клітин-хазяїнів є лінією клітин ссавця, наприклад, клітинами HEK293, ці лінії клітин можуть мати стійко інтегровану матрицю полінуклеотидного вектора, а другий вектор, такий, як вірус герпесу, може застосовуватися для включення Rep-білка у клітини, що забезпечує можливість експресії й ампліфікації зкДНК у присутності Rep і хелперного вірусу.

В одному варіанті втілення клітини-хазяїни, які використовуються для утворення описаних авторами векторів зкДНК, є клітинами комах, і бакіловірус застосовують для доставлення як полінуклеотиду, що кодує Rep-білок, так і матрицю експресійного конструкту полінуклеотиду невірусного ДНК-вектора для зкДНК, наприклад, як описано на ФІГУРАХ 4А - 4С та у Прикладі 1. У деяких варіантах втілення клітини-хазяїни піддають інженерії для експресії Rep-білка.

Після цього вектор зкДНК збирають і виділяють з клітин-хазяїнів. Час збирання та накопичення описаних авторами векторів зкДНК з клітин вибирають і оптимізують таким чином, щоб на виході досягти продукування векторів зкДНК у великій кількості. Наприклад, час збирання вибирають з огляду на життєздатність клітин, морфологію клітин, ріст клітин і т. ін. В одному варіанті втілення клітини вирощують за достатніх умов і збирають протягом достатнього часу після бакіловірусної інфекції для продукування векторів зкДНК, але до того, як більшість клітин почне гинути через бакіловірусну токсичність. ДНК-вектори можуть бути виділені з застосуванням наборів для очищення плазмід, таких, як набори Qiagen Endo-Free Plasmid. Інші способи, розроблені для виділення плазмід, також можуть бути пристосовані для ДНК-векторів. В цілому прийнятними є будь-які способи очищення нуклеїнових кислот.

ДНК-вектори очищують будь-якими відомими фахівцям у даній галузі способами очищення ДНК. В одному варіанті втілення вектори зкДНК очищують як молекули ДНК. В іншому варіанті втілення вектори зкДНК очищують як екзосоми або мікрочастинки.

Присутність вектора зкДНК може бути підтверджена шляхом розщеплення вектора ДНК, виділеного з клітин, рестрикційним ферментом, який має єдину ділянку розпізнавання на ДНК-векторі, та аналізу та аналізу матеріалу, як розщепленої, так і нерозщепленої ДНК з застосуванням гель-електрофорезу для підтвердження наявності характерних смуг лінійної й безперервної ДНК у

порівнянні з лінійною й переривчастою ДНК. ФІГУРИ 4С та 4Е пояснюють варіант втілення для розпізнавання присутності векторів зкДНК з закритими кінцями, які продукуються з застосуванням описаних авторами процесів. Наприклад, на Фіг. 5 представлено гель, який підтверджує продукування зкДНК з багатьох плазмідних конструктів з застосуванням одного варіанта втілення для продукування цих векторів, як описано у Прикладах.

Плазміда зкДНК

Плазміда зкДНК є плазмідною, яку застосовують для подальшого продукування вектора зкДНК. У деяких варіантах втілення зкДНК-плазміда може бути побудована з застосуванням відомих способів для забезпечення принаймні таких функціонально зв'язаних компонентів у напрямку транскрипції: (1) 5' послідовності ITR; (2) експресійної касети, яка містить цис-регуляторний елемент, наприклад, промотор, індукційний промотор, регулюючий перемикач, енансери і т. ін.; та (3) 3' послідовності ITR, причому 3' послідовність ITR є асиметричною відносно 5' послідовності ITR. У деяких варіантах втілення експресійна касета з фланкуючими ITR включає сайт клонування для включення екзогенної послідовності. Експресійна касета замінює кодуючі ділянки гер та сар геномів AAV.

В одному аспекті вектор зкДНК одержують із плазміди, яка вказується авторами як "зкДНК-плазміда", що кодує в такому порядку: інвертований кінцевий повтор (ITR) першого аденоасоційованого вірусу (AAV), експресійну касету, яка включає трансген, та мутований або модифікований ITR AAV, причому вищезгадана зкДНК-плазміда є позбавленою Кодуючої послідовності капсидного білка AAV. В альтернативних варіантах втілення зкДНК-плазміда кодує у такому порядку: перший (або 5') модифікований або мутований ITR AAV, експресійну касету, яка включає трансген, та другий (або 3') ITR AAV дикого типу, причому вищезгадана зкДНК-плазміда є позбавленою кодуючої послідовності капсидного білка AAV, і ITR та 5' та 3' кінцях є асиметричними відносно один одного. В альтернативних варіантах втілення зкДНК-плазміда кодує у такому порядку: перший (або 5') модифікований або мутований ITR AAV, експресійну касету, яка включає трансген, та другий (або 3') мутований або модифікований ITR AAV, причому вищезгадана зкДНК-плазміда є позбавленою кодуючої послідовності капсидного білка AAV, і 5' та 3' модифіковані ITR є різними і не мають однакових модифікацій.

У ще одному варіанті втілення система зкДНК-плазміди є позбавленою кодуючих послідовностей вірусного капсидного білка (тобто, є позбавленою капсидних генів AAV, а також капсидних генів інших вірусів). Крім того, у конкретному варіанті втілення зкДНК-плазміда також є позбавленою кодуючих послідовностей Rep-білка AAV. Відповідно, в оптимальному варіанті втілення у зкДНК-плазміді є відсутніми функціональні гени AAV сар та AAV гер GG-3' для AAV2 плюс варіабельна паліндромна послідовність, яка забезпечує можливість утворення шпильки.

ЗкДНК-плазміда згідно з даним винаходом може бути генерована з застосуванням природних нуклеотидних послідовностей геномів будь-яких сіротипів AAV, добре відомих фахівцям у даній галузі. В одному варіанті втілення кістяк зкДНК-плазміди є взятим з геному AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV 5, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV 11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAV-DJ та AAV-DJ8. Наприклад, NCBI: NC 002077; NC 001401; NC001729; NC001829; NC006152; NC 006260; NC 006261; Kotin and Smith, The Springer Index of Viruses, available at the URL maintained by Springer (за адресою у всесвітній мережі: oesys.springer.de/bipyces/database/mkchapter.asp?virID=42.04.) (примітка: посилання на URL або базу даних стосується змісту URL або бази даних на дійсну дату подання цієї заявки) У конкретному варіанті втілення кістяк зкДНК-плазміди є взятим з геному AAV2. В іншому конкретному варіанті втілення кістяк зкДНК-плазміди є синтетичним кістяком, підданим генній інженерії таким чином, щоб включати на його 5' та 3' кінцях ITR, взяті з одного з цих геномів AAV.

ЗкДНК-плазміда необов'язково може включати селектований або селективний маркер для застосування у створенні продукуючої вектор зкДНК лінії клітин. В одному варіанті втілення селективний маркер може бути вставлений після (тобто, ближче до 3' кінця) 3' послідовності ITR. В іншому варіанті втілення селективний маркер може бути вставлений перед (тобто, ближче до 5' кінця) 5' послідовності ITR. Підходящими селективними маркерами є, наприклад, ті, які забезпечують резистентність до ліків. Селективними маркерами можуть бути, наприклад, ген резистентності до бластицидину S, канаміцин, генетицин і т. ін. В оптимальному варіанті втілення маркером чутливості до ліків є ген резистентності до бластицидину S.

Типова зкДНК (наприклад, rAAV0) продукується з плазміди rAAV. Спосіб продукування вектора rAAV може включати: (а) забезпечення клітини-хазяїна з плазмідною rAAV, як описується вище, причому і клітина-хазяїн, і плазміда є позбавленими генів, кодуючих капсидний білок, (б) культивування клітини-хазяїна за умов, які забезпечують можливість продукування геному зкДНК, та (в) збирання клітин та виділення геному AAV, який продукується з вищезгаданих клітин.

С. Типовий спосіб одержання векторів зкДНК з плазмід зкДНК

Авторами також представлено способи одержання безкапсидних векторів зкДНК, зокрема, спосіб з достатньо високим виходом з метою забезпечення достатнього вектора для *in vivo* експериментів.

У деяких варіантах втілення спосіб продукування вектора зкДНК включає етапи: (1) включення нуклеїновокислотного конструкту, який включає експресійну касету та дві асиметричні послідовності ITR, у клітину-хазяїн (наприклад, клітини Sf9), (2) необов'язково утворення клональної лінії клітин, наприклад, шляхом застосування селективного маркера, присутнього на плазміді, (3) включення Rep-кодуючого гена (шляхом трансфекції або інфекції бакуловірусом, який несе вищезгаданий ген) у

вищезгадану клітину комах та (4) збирання клітин та очищення вектора зкДНК. Нуклеїновокислотний конструкт, який включає експресійну касету та дві послідовності ITR, описані вище для продукування безкапсидного вектора AAV, може бути у формі cfAAV-плазмід або бакміди або бакуловірусу, що генерується cfAAV-плазмідом, як описується нижче. Нуклеїновокислотний конструкт може бути включений у клітину-хазяїн шляхом трансфекції, вірусної трансдукції, стійкої інтеграції з застосуванням інших способів, відомих фахівцям у даній галузі.

Д. Лінії клітин:

Лінії клітин-хазяїнів, які застосовують для продукування вектора зкДНК, можуть включати лінії клітин комах, взятими з *Spodoptera frugiperda*, такі, як клітини Sf9, Sf21 або *Trichoplusia ni*, або інших безхребетних, хребетних, або інші лінії еукаріотних клітин, включаючи клітини ссавців. Також можуть застосовуватися інші лінії клітин, відомі фахівцям у даній галузі, такі, як HEK293, HuH-7, HeLa, HepG2, Hep1A, 911, CHO, COS, MeWo, NIH3T3, A549, HT1 180, моноцити та зрілі та незрілі дендритні клітини. Лінії клітин-хазяїнів можуть бути трансфіковані для стійкої експресії ceDBA-плазмід для високопродуктивного продукування вектора зкДНК.

ЗкДНК-плазмід включують у клітини Sf9 шляхом тимчасової трансфекції з застосуванням реагентів (наприклад, ліпосомних, фосфату кальцію) або фізичними засобами (наприклад, шляхом електропорації), які є відомими фахівцям у даній галузі. В альтернативному варіанті утворюють стійкі лінії клітин Sf9, у геноми яких було стійко інтегровано зкДНК-плазмід. Такі стійкі лінії клітин утворюють шляхом включення селективного маркера у зкДНК-плазмід, як описується вище. Якщо зкДНК-плазмід, яку застосовують для трансфекції лінії клітин, включає селективний маркер, такий, як антибіотик, клітини, які було трансфіковано зкДНК-плазмідом з інтеграцією ДНК зкДНК-плазмід в їхній геном можуть бути вибрані шляхом додавання антибіотика до середовища росту клітин. Резистентні клони клітин після цього можуть бути виділені з застосуванням технологій розведення окремої клітини або перенесення колоній і розмножені.

Е. Виділення й очищення векторів зкДНК:

Приклади процесу одержання та виділення векторів зкДНК описуються на ФІГУРАХ 4А - 4Е на у конкретних прикладах нижче. Описані авторами зкДНК-вектори одержують з клітини-продуцента, яка експресує Rep-білок (білки) AAV, піддають подальшій трансформації зкДНК-плазмідом, зкДНК-бакмідом або зкДНК-бакуловірусом. До плазмід, які можуть застосовуватися для продукування векторів зкДНК, відносяться плазмід, показані на ФІГУРІ 8А (застосовують для продукування Rep ВІІС), ФІГУРІ 8В (плазмід, яку застосовують для одержання вектора зкДНК).

В одному аспекті полінуклеотид кодує Rep-білок AAV (Rep 78 або 68), який доставляється до клітини-продуцента у плазміді (Rep-плазміді), бакміді (Rep-бакміді) або бакуловірусі (Rep-бакуловірусі). Rep-плазмід, Rep-бакмід та Rep-бакуловірус можуть бути генеровані описаними вище способами.

Способи продукування зкДНК-вектора, яка є типовим вектором зкДНК, представлено авторами в цьому описі. Експресійними конструктами, які застосовують для генерації векторів зкДНК згідно з даним винаходом, можуть бути плазмід (наприклад, зкДНК-плазмід), бакмід (наприклад, зкДНК-бакмід) та/або бакуловірус (наприклад, зкДНК-бакуловірус). Лише для прикладу, зкДНК-вектор може бути генерований з клітин, коінфікованих зкДНК-бакуловірусом та Rep-бакуловірусом. Rep-білки, які продукуються з Rep-бакуловірусу, можуть реплікувати зкДНК-бакуловірус для генерації зкДНК-векторів. В альтернативному варіанті вектори зкДНК можуть бути генеровані з клітин, стійко трансфікованих конструктом, який включає послідовність, яка кодує Rep-білок AAV (Rep78/52), який доставляється у Rep-плазмід, Rep-бакмід або Rep-бакуловірусі. ЗкДНК-бакуловірус може бути тимчасово трансфікований у клітини, реплікований Rep-білком і може продукувати вектори зкДНК.

Бакмід (наприклад, зкДНК-бакмід) може бути трансфікована у прийнятні клітини комах, такі, як клітини Sf9, Sf21, Tn1 (*Trichoplusia ni*), клітина High Five, і генерувати зкДНК-бакуловірус, який є рекомбінантним бакуловірусом, який включає послідовності, які включають асиметричні ITR та експресійну касету. ЗкДНК-бакуловірус може бути знову інфікований у клітини комах для одержання нового покоління рекомбінантного бакуловірусу. Необов'язково цей етап повторюють ще раз або декілька разів для продукування рекомбінантного бакуловірусу у більшій кількості.

Час для збирання та накопичення описаних авторами векторів зкДНК з клітин вибирають і оптимізують для досягнення високопродуктивного продукування векторів зкДНК. Наприклад, час збирання може бути вибраний з врахування життєздатності клітин, морфології клітин, росту клітин і т. ін. Зазвичай клітини збирають через достатній час після бакуловірусної інфекції для продукування векторів зкДНК (наприклад, векторів зкДНК), але до того, як більшість клітин почне гинути через вірусну токсичність. ЗкДНК-вектори виділяють з клітин Sf9 з застосуванням наборів для очищення плазмід, таких, як набори Qiagen ENDO-FREE PLASMID®. Інші способи, розроблені для виділення плазмід, також можуть бути пристосовані для векторів зкДНК. Зазвичай можуть бути прийнятними будь-які відомі фахівцям у даній галузі способи очищення нуклеїнових кислот, а також комплекти серійного виробництва для виділення ДНК.

В альтернативному варіанті очищення здійснюють шляхом піддавання згустку клітин процесові лужного лізису, центрифугування утвореного в результаті лізату та виконання хроматографічного відокремлення. Як необмежувальний приклад, процес виконують шляхом завантаження супернатанту на іонообмінну колонку (наприклад, SARTOBIND Q®), яка утримує нуклеїнові кислоти, з наступним

елююванням (наприклад, з 1,2 М розчину NaCl) і виконанням подальшого хроматографічного очищення на колонці для гель-фільтрації (наприклад, 6 GE швидкого потоку). Безкапсидний вектор AAV після цього видобувають, наприклад, шляхом осадження.

У деяких варіантах втілення вектори зкДНК також очищують у формі екзосом або мікрочастинок. Фахівцям у даній галузі відомо, що багато типів клітин вивільнюють не лише розчинні білки, але і комплексні білкові/нуклеїновокислотні вантажі через скидання міровезикул мембрани (Socissci et al, 2009; документ EP 10306226.1) До таких везикул відносяться міровезикули (також називаються мікрочастинками) й екзосоми (також називаються нановезикулами), які включають білки та РНК як вантаж. Міровезикули генеруються від прямого бадінгу цитоплазматичної мембрани, і екзосоми вивільнюються у позаклітинне середовище після злиття мультивезикулярних ендосом з цитоплазматичною мембраною. Таким чином, міровезикули та/або екзосоми, які містять вектор зкДНК можуть бути виділені з клітин, які були трансдуковані зкДНК-плазмідом або бакмідом або бакуловірусом, генерованим зкДНК-плазмідом.

Міровезикули виділяють шляхом піддавання культурального середовища фільтрації або ультрацентрифугуванню при 20 000 x g, а екзосом – при 100 000 x g. Оптимальну тривалість ультрацентрифугування визначають експериментально, і вона залежить від конкретного типу клітин, з яких виділяють везикули. В оптимальному варіанті культуральне середовище спочатку освітлюють шляхом центрифугування з низькою швидкістю (наприклад, при 2000 x g протягом 5 - 20 хвилин) і піддають центрифугувальній концентрації з застосуванням, наприклад, спін-колонки AMICON® (Millipore, Watford, Великобританія). Міровезикули та екзосоми піддають подальшому очищенню через FACS або MACS шляхом застосування специфічних антитіл, які розпізнають конкретні поверхневі антигени, присутні на міровезикулах та екзосомах. До інших способів очищення міровезикул та екзосом відносяться, крім інших, імуноосадження, афінна хроматографія, фільтрація та магнітні мікроносії, вкриті специфічними антитілами або аптамерами. Після очищення везикули промивають, наприклад, фосфатно-буферним розчином. Одна з переваг застосування міровезикул або екзосом для доставлення зкДНК-вмісних везикул полягає в тому, що ці везикули можуть бути націлені на різні типи клітин шляхом включення на їхніх мембранах білків, які розпізнаються специфічними рецепторами на клітинах відповідних типів. (див. також документ EP 10306226)

Інший аспект винаходу стосується способів очищення векторів зкДНК від ліній клітин-хазяїнів, які мають стійко інтегрований конструкт зкДНК в їхньому геномі. В одному варіанті втілення вектори зкДНК очищують як молекули ДНК. В іншому варіанті втілення, вектори зкДНК очищують як екзосоми або мікрочастинки.

Фіг. 5 показує гель, який підтверджує продукування зкДНК з багатьох конструктів зкДНК-плазмід з застосуванням способу, описаного у Прикладах. ЗкДНК підтверджується за характером смуги к гелі, як обговорюється у зв'язку з Фіг. 4D у Прикладах. Інші характеристики процесу продукування зкДНК та проміжних сполук зведено на ФІГУРАХ 6А та 6В і ФІГУРАХ 7А та 7В, як описано у Прикладах.

Фармацевтичні композиції

В іншому аспекті забезпечуються фармацевтичні композиції. Фармацевтична композиція включає вектор зкДНК, як розкривається авторами, та фармацевтично прийнятний носій або розріджувач.

ДНК-вектори, описані авторами, можуть бути включені до фармацевтичних композицій, підходящих для введення суб'єкту для *in vivo* доставлення у клітини, тканини або органи суб'єкта. Зазвичай фармацевтична композиція включає зкДНК-вектор, як розкривається авторами, та фармацевтично прийнятний носій. Наприклад, вектори зкДНК, описані авторами, можуть бути включені до фармацевтичної композиції, підходящої для потрібного шляху терапевтичного введення (наприклад, парентерального введення). Також передбачаються пасивна трансдукція у тканину через внутрішньовенну або внутрішньоартеріальну інфузію під високим тиском, а також внутрішньоклітинна ін'єкція, така як внутрішньоядерна мікроін'єкція або внутрішньоцитоплазматична ін'єкція. Фармацевтичні композиції для терапевтичних цілей рецептують у формі розчину, мікроемulsії, дисперсії, ліпосом або іншої впорядкованої структури, підходящої для високої концентрації вектора зкДНК. Стерильні придатні для ін'єкцій розчини приготують шляхом включення сполуки вектора зкДНК у потрібній кількості у підходящому буфері з одним або з комбінацією інгредієнтів, перелічених вище, у разі необхідності, з наступною фільтрувальною стерилізацією.

Фармацевтично активні композиції, які включають вектор зкДНК, рецептують для доставлення трансгена у нуклеїновій кислоті до клітини реципієнта, в результаті чого в них відбувається терапевтична експресія трансгена. Композиція також може включати фармацевтично прийнятний носій.

Вектор зкДНК, як розкривається авторами, може бути включений у фармацевтичну композицію, підходящу для місцевого, системного, внутрішньоамніотичного, інтратекального, внутрішньочерепного, внутрішньоартеріального, внутрішньовенного, внутрішньолимфатичного, внутрішньочеревинного, підшкірного, трахеального, внутрішньотканинного (наприклад, внутрішньом'язового, внутрішньосерцевого, внутрішньопечінкового, внутрішньониркового, внутрішньоцеребрального), інтратекального, інтравезикального, кон'юнктивального (наприклад, позаорбітального, внутрішньоорбітального, ретроорбітального, інтратретинального, субретинального, хороїдального, субхороїдального, інтрастромального, інтракамерального інтравітреального), інтракохлеарного та мукозального (наприклад, перорального, ректального, назального) введення.

Також передбачаються пасивна трансдукція у тканину через внутрішньовенну або внутрішньоартеріальну інфузію під високим тиском, а також внутрішньоклітинна ін'єкція, така, як внутрішньоядерна мікроін'єкція або внутрішньоцитоплазматична ін'єкція.

Фармацевтичні композиції для терапевтичних цілей зазвичай повинні бути стерильними і стійкими в умовах виробництва та зберігання. Композицію рецептують у формі розчину, мікроемульсії, дисперсії, ліпосом або іншої впорядкованої структури, підходящої для високої концентрації вектора зкДНК. Стерильні придатні для ін'єкцій розчини приготують шляхом включення сполуки вектора зкДНК у потрібній кількості у підходящому буфері з одним або з комбінацією інгредієнтів, перелічених вище, у разі необхідності, з наступною фільтрувальною стерилізацією.

Фахівцям у даній галузі є відомими різні технології та способи доставлення нуклеїнових кислот у клітини. Наприклад, нуклеїнові кислоти, такі, як зкДНК, можуть бути рецептовані у ліпідні наночастинки (LNP), ліпідоди, ліпосоми, ліпідні наночастинки, ліпоплекси або наночастинки типу ядро/оболонка. Зазвичай LNP складаються з молекул нуклеїнової кислоти (наприклад, зкДНК), одного або декількох здатних до іонізації або катіонних ліпідів (або їх солей), одного або декількох неіонних або нейтральних ліпідів (наприклад, фосфоліпиду), молекули, яка запобігає агрегації (наприклад, ПЕГ або кон'югату ПЕГ-ліпід) та, необов'язково, стерину (наприклад, холестерину).

Інший спосіб доставлення нуклеїнових кислот, таких, як зкДНК, у клітину полягає у кон'югації нуклеїнової кислоти з лігандом, який засвоюється клітиною. Наприклад, ліганд може зв'язуватися з рецептором на поверхні клітини і засвоюватися через ендоцитоз. Ліганд може бути ковалентно зв'язаний з нуклеотидом у нуклеїновій кислоті. Типові кон'югати для доставлення нуклеїнових кислот у клітину описуються, наприклад, у документах WO2015/006740, WO2014/025805, WO2012/037254, WO2009/082606, WO2009/073809, WO2009/018332, WO2006/112872, WO2004/090108, WO2004/091515 і WO2017/177326.

Нуклеїнові кислоти, такі, як зкДНК, також можуть доставлятися у клітину шляхом трансфекції. До придатних для застосування способів трансфекції відносяться, крім інших, ліпід-опосередкована трансфекція, опосередкована катіонним полімером трансфекція або осадження фосфатом кальцію. Реагенти для трансфекції є добре відомими фахівцям у даній галузі, і до них відносяться, крім інших, реагент для трансфекції TurboFect (Thermo Fisher Scientific), реагент Pro-Ject (Thermo Fisher Scientific), реагент для трансфекції білка TRANSPASS™ P (New England Biolabs), реагент для доставлення білка CHARIOT™ (Active Motif), реагент для трансфекції білка PROTEOJUICE™ (EMD Millipore), 293fectin, LIPOFECTAMINE™ 2000, LIPOFECTAMINE™ 3000 (Thermo Fisher Scientific), LIPOFECTAMINE™ (Thermo Fisher Scientific), LIPOFECTIN™ (Thermo Fisher Scientific), DMRIE-C, CELLFECTIN™ (Thermo Fisher Scientific), OLIGOFECTAMINE™ (Thermo Fisher Scientific), LIPOFECTACE™, FUGENE™ (Roche, Базель, Швейцарія), FUGENE™ HD (Roche), TRANSFECTAM™ (Transfectam, Promega, Madison, Вісконсин), TFX-10™ (Promega), TFX-20™ (Promega), TFX-50™ (Promega), TRANSFECTIN™ (BioRad, Hercules, Каліфорнія), SILENTFECT™ (Bio-Rad), Effectene™ (Qiagen, Valencia, Каліфорнія), DC-chol (Avanti Polar Lipids), GENEPORTER™ (Gene Therapy Systems, San Diego, Каліфорнія), DHARMAFECT 1™ (Dharmacon, Lafayette, Колорадо), DHARMAFECT 2™ (Dharmacon), DHARMAFECT 3™ (Dharmacon), DHARMAFECT 4™ (Dharmacon), ESCORT™ III (Sigma, St. Louis, Міссурі) та ESCORT™ IV (Sigma Chemical Co.). Нуклеїнові кислоти, такі, як зкДНК, також можуть доставлятися у клітину мікрогідродинамічними способами, відомими фахівцям у даній галузі.

Способи невірусного доставлення нуклеїнових кислот *in vivo* або *ex vivo* включають електропорацію, ліпофекцію (див. патент США № 5,049,386; 4,946,787 і реагенти серійного виробництва, такі, як Transfectam™ і Lipofectin™), мікроін'єкцію, біолістику, віросоми, ліпосоми (див., наприклад, Crystal, Science 270: 404 - 410 (1995); Blaese et al., Cancer Gene Ther. 2: 291 - 297 (1995); Behr et al., Bioconjugate Chem. 5: 382 - 389 (1994); Remy et al., Bioconjugate Chem. 5: 647 - 654 (1994); Gao et al., Gene Therapy 2: 710 - 722 (1995); Ahmad et al., Cancer Res. 52: 4817 - 4820 (1992); патенти США №№ 4,186,183, 4,217,344, 4,235,871, 4,261,975, 4,485,054, 4,501,728, 4,774,085, 4,837,028 та 4,946,787), імуноліпосоми, кон'югати полікатіона або ліпід : нуклеїнової кислоти, депротейнізовану ДНК і посилене агентом поглинання ДНК. Сонопорація із застосуванням, наприклад, системи Sonitron 2000 (Rich-Mar) також може застосовуватися для доставлення нуклеїнових кислот.

Вектори зкДНК, як описується авторами, також можуть безпосередньо вводитися в організм для трансдукції клітин *in vivo*. Введення здійснюють будь-яким зі шляхів, які зазвичай застосовують для приведення молекули в остаточний контакт з клітинами крові або тканини, включаючи, крім інших, ін'єкцію, інфузію, місцеве нанесення та електропорацію. Підходящі способи введення таких нуклеїнових кислот є доступними та добре відомими фахівцям у даній галузі, і хоча можуть застосовуватися декілька шляхів введення конкретної композиції, конкретний шлях введення часто може забезпечувати більш безпосередню й ефективнішу реакцію у порівнянні з іншим шляхом.

Способи введення нуклеїновокислотного вектора зкДНК, як розкривається авторами, можуть передбачати доставлення у кровотворні стовбурові клітини, наприклад, способами, описаними, наприклад, у патенті США № 5,928,638.

Вектори зкДНК згідно з даним винаходом додають до ліпосом для доставлення у клітину або цільовий орган суб'єкта. Ліпосоми є везикулами, які мають принаймні один ліпідний бішар. Ліпосоми зазвичай застосовують як носії для доставлення медикаменту/терапевтичного засобу у контексті фармацевтичної розробки. Вони працюють через злиття з клітинною мембраною та

перепозиціонування її ліпідної структури для доставлення ліків або активного фармацевтичного інгредієнта (API). Ліпосомні композиції для такого доставлення складаються з фосфоліпідів, зокрема, сполук, які мають фосфатидилхолінову групу, однак ці композиції також можуть включати інші ліпіди.

У деяких аспектах винахід забезпечує ліпосомну композицію, яка включає одну або декілька сполук з поліетиленгліколевою (PEG) функціональною групою (так звані "пегільовані сполуки"), які можуть знижувати імуногенність/антигенність, забезпечувати гідрофільність та гідрофобність сполуки (сполук) та знижувати частоту введення доз. Або ж ліпосомна композиція просто включає полімер поліетиленгліколь (PEG) як додатковий компонент. У таких аспектах молекулярна маса PEG або функціональної групи PEG може становити від 62 Да до приблизно 5 000 Да.

У деяких аспектах винахід забезпечує ліпосомну композицію, яка має доставляти API з подовженим вивільненням або контрольованим профілем вивільнення протягом періоду від годин до тижнів. У деяких пов'язаних аспектах ліпосомна композиція може включати водні камери, зв'язані ліпідними бішарами. В інших пов'язаних аспектах ліпосомна композиція інкапсулює API з компонентами, які зазнають фізичного переходу при підвищеній температурі, що вивільнює API протягом періоду від годин до тижнів.

У деяких аспектах ліпосомна композиція включає сфінгомієлін та один або декілька описаних авторами ліпідів. У деяких аспектах ліпосомна композиція включає оптикоми.

У деяких аспектах винахід забезпечує ліпосомну композицію, яка включає один або декілька ліпідів, вибраних з групи, до якої відносяться: натрієва сіль N-(карбоніл-метоксиполіетиленгліколь 2000)-1,2-дистеароїл-sn-гліцери-3-фосфоетаноламіну, (дистеароїл-sn-гліцери-фосфоетаноламін), MPEG (метокси поліетиленгліколь)-кон'югований ліпід, HSPC (гідрогенізований соєвий фосфатидилхолін); PEG (поліетиленгліколь); DSPE (дистеароїл-sn-гліцери-фосфоетаноламін); DSPC (дистеароїлфосфатидилхолін); DOPC (діолеїлфосфатидилхолін); DPPG (дипальмітоїлфосфатидилгліцерин); EPC (яєчний фосфатидилхолін); DOPS (діолеїлфосфатидилсерин); POPC (пальмітоїлфосфатидилхолін); SM (сфінгомієлін); MPEG (метокси поліетиленгліколь); DMPC (диміристоїл фосфатидилхолін); DMPG (диміристоїл фосфатидилгліцерин); DSPG (дистеароїлфосфатидилгліцерин); DEPC (діерукоїлфосфатидилхолін); DOPE (діолеїл-sn-гліцери-фосфоетаноламін). холестерил сульфат (CS), дипальмітоїлфосфатидилгліцерин (DPPG), DOPC (діолеїл-sn-гліцери-фосфатидилхолін) або будь-яка їх комбінація.

У деяких аспектах винахід забезпечує ліпосомну композицію, яка включає фосфоліпід, холестерин і пегільований ліпід у молярному співвідношенні 56:38:5. У деяких аспектах загальний вміст ліпідів в ліпосомній композиції складає 2 - 16 мг/мл. У деяких аспектах винахід забезпечує ліпосомну композицію, яка включає ліпід, який містить фосфатидилхолінову функціональну групу, ліпід, який містить етаноламінову функціональну групу, та пегільований ліпід. У деяких аспектах винахід забезпечує ліпосомну композицію, яка включає ліпід, який містить фосфатидилхолінову функціональну групу, ліпід, який містить етаноламінову функціональну групу, та пегільований ліпід у молярному співвідношенні 3:0.015:2, відповідно. У деяких аспектах винахід забезпечує ліпосомну композицію, яка включає ліпід, який містить фосфатидилхолінову функціональну групу, холестерин та пегільований ліпід. У деяких аспектах винахід забезпечує ліпосомну композицію, яка включає ліпід, який містить фосфатидилхолінову функціональну групу, та холестерин. У деяких аспектах пегільованим ліпідом є PEG-2000-DSPE. У деяких аспектах винахід забезпечує ліпосомну композицію, яка включає DPPG, соєвий ФХ, кон'югат MPEG-DSPE ліпідів та холестерин.

У деяких аспектах винахід забезпечує ліпосомну композицію, яка включає один або декілька ліпідів, які містять фосфатидилхолінову функціональну групу, та один або декілька ліпідів, які містять етаноламінову функціональну групу. У деяких аспектах винахід забезпечує ліпосомну композицію, яка включає один або декілька: ліпідів, які містять фосфатидилхолінову функціональну групу, ліпідів, які містять етаноламінову функціональну групу, та стерини, наприклад, холестерин. У деяких аспектах ліпосомна композиція включає DOPC/ DEPC; і DOPE.

У деяких аспектах винахід забезпечує ліпосомну композицію, яка також включає один або декілька фармацевтичних ексципієнтів, наприклад, сахарозу та/або гліцин.

У деяких аспектах винахід забезпечує ліпосомну композицію, яка має одношарову або багатошарову структуру. У деяких аспектах винахід забезпечує ліпосомну композицію, яка включає мультिवезикулярні частинки та/або частинки на пінній основі. У деяких аспектах винахід забезпечує ліпосомну композицію, яка має відносний розмір частинок, більший за звичайні наночастинки, і складає приблизно від 150 до 250 нм. У деяких аспектах ліпосомна композиція являє собою ліофілізований порошок.

У деяких аспектах винахід забезпечує ліпосомну композицію, яку одержують і завантажують векторами зкДНК, які розкриваються або описуються авторами винаходу, шляхом додавання слабкої основи до суміші, яка має виділену зкДНК за межами ліпосом. Це додавання підвищує показник рН за межами ліпосом до приблизно 7,3 і заганяє API у ліпосому. У деяких аспектах винахід забезпечує ліпосомну композицію, яка має рівень рН, який є кислотним всередині ліпосом. У таких випадках внутрішня частина ліпосом може мати рН 4 - 6,9, у ще кращому варіанті – рН 6,5. В інших аспектах винахід забезпечує ліпосомну композицію, яку одержують шляхом застосування технології внутрішньоліпосомної стабілізації ліків. У таких випадках застосовують полімерні або неpolімерні

високзаряджені аніони та внутрішньоліпосомні уловлювальні агенти, наприклад, поліфосфат або октасульфат сахарози.

В інших аспектах винахід забезпечує ліпосомну композицію, яка включає фосфоліпіди, лецитин, фосфатидилхолін та фосфатидилетаноламін.

Реагенти доставлення, такі, як ліпосоми, нанокапсули, мікрочастинки, мікросфери, ліпідні частинки, везикули, і т. ін., можуть застосовуватися для включення композицій згідно з даним винаходом у відповідні клітини-хазяїни. Зокрема, нуклеїнові кислоти можуть бути рецептовані для доставлення інкапсульованими у ліпідну частинку, ліпосому, везикулу, наносферу, наночастинку, частинку золота і т. ін. Такі композиції можуть бути оптимальними для включення фармацевтично прийнятних композицій описаних авторами нуклеїнових кислот.

Різні відомі фахівцям у даній галузі способи доставлення або їх модифікації можуть застосовуватися для доставлення векторів зкДНК *in vitro* або *in vivo*. Наприклад, у деяких варіантах втілення вектори зкДНК доставляють шляхом тимчасового проникнення у клітинну мембрану з застосуванням механічної, електричної, ультразвукової, гідродинамічної або лазерної енергії для полегшення входження ДНК у клітини-мішені. Наприклад, вектор зкДНК доставляють шляхом тимчасового руйнування клітинної мембрани шляхом протискання клітини через канал обмеженого розміру або іншими способами, відомими фахівцям у даній галузі. У деяких випадках лише вектор зкДНК безпосередньо вводять шляхом ін'єкції як депротейнізовану ДНК у клітини шкіри, вилочкової залози, серцевого м'яза, скелетного м'яза або печінки.

У деяких випадках вектор зкДНК доставляють за допомогою генетичної гармати. Сферичні частинки золота або вольфраму (1 - 3 мкм у діаметрі), вкриті безкапсидними AAV векторами, прискорюють до високої швидкості стиснутим газом для проникнення у клітини тканини-мішені.

У деяких варіантах втілення для доставлення векторів зкДНК застосовують електропорацію. Електропорація викликає тимчасову дестабілізацію клітинної мембрани клітини тканини-мішені шляхом вставлення пари електродів у тканину, таким чином, щоб молекули ДНК у навколишньому середовищі дестабілізованої мембрани були здатні проникати у цитоплазму та нуклеоплазму клітини. Електропорацію застосовують *in vivo* для багатьох типів тканин, таких, як шкіра, легені та м'язи.

У деяких випадках вектор зкДНК доставляють шляхом гідродинамічної ін'єкції, яка є простим і високоефективним способом прямого внутрішньоклітинного доставлення будь-яких водорозчинних сполук та частинок у внутрішні органи та скелетні м'язи всієї кінцівки.

У деяких випадках вектори зкДНК доставляють за допомогою ультразвуку шляхом утворення наноскопічних пор у мембрані для полегшення внутрішньоклітинного доставлення частинок ДНК у клітини внутрішніх органів або пухлин, тому розмір та концентрація плазмідної ДНК відіграють важливу роль в ефективності системи. У деяких випадках вектори зкДНК доставляють за допомогою магнітофекції шляхом застосування магнітних полів для концентрації частинок, які містять нуклеїнову кислоту, у клітини-мішені.

У деяких випадках можуть застосовуватися системи хімічного доставлення, наприклад, шляхом застосування наномерних комплексів, які включають ущільнення негативно зарядженої нуклеїнової кислоти полікатионних наномерних частинок, які відносяться до катіонної ліпосоми/міцели або катіонних полімерів. Катіонні ліпіди, які застосовують для способу доставлення, включають, крім інших, моновалентні катіонні ліпіди, багатовалентні катіонні ліпіди, сполуки, які містять гуанідин, похідні від холестерину сполуки, катіонні полімери, (наприклад, полі(етиленімін), полі-L-лізін, протамін, інші катіонні полімери) та гібрид ліпиду-полімеру.

Екзосом:

У деяких варіантах втілення вектор зкДНК, як розкривається авторами, доставляють упакованим в екзосому. Екзосоми є малими везикулами мембрани ендцитозного походження, які вивільнюються у позаклітинне середовище після злиття мультивезикулярних тіл з цитоплазматичною мембраною. Їхня поверхня складається з ліпідного бішару з мембрани донорської клітини, вони містять цитозоль з клітини, яка виробила екзосому, і демонструють білки мембрани з батьківської клітини на поверхні. Екзосоми продукуються різними типами клітин, включаючи епітеліальні клітини, В та Т лімфоцити, мастоцити (MC), а також дендритні клітини (DC). У деяких варіантах втілення передбачається застосування екзосом з діаметром від 10 нм до 1 мкм, від 20 нм до 500 нм, від 30 нм до 250 нм, від 50 нм до 100 нм. Екзосоми можуть бути виділені для доставлення у клітини-мішені з використанням їхніх донорних клітин або шляхом включення до них конкретних нуклеїнових кислот. Можуть застосовуватися різні підходи, відомі фахівцям у даній галузі, для продукування екзосом, які містять безкапсидні AAV вектори згідно з даним винаходом.

В. Мікрочастинки/наночастинки:

У деяких варіантах втілення вектор зкДНК, як розкривається авторами, доставляють за допомогою ліпідної наночастинки. Зазвичай ліпідні наночастинки включають здатний до іонізації аміноліпід (наприклад, гептатріаконт-6,9,28,31-тетраен-19-іл 4-(диметиламіно)бутаноат, DLin-MC3-DMA, фосфатидилхолін (1,2-дистеароїл-sn-гліцеро-3-фосфохолін, DSPC), холестерин та поверхневий ліпід (поліетиленгліколь-диміристилгліцерин, PEG-DMG), наприклад, як описується у публікації Tam et al. (2013). *Advances in Lipid Nanoparticles for siRNA delivery. Pharmaceuticals* 5(3): 498 - 507.

У деяких варіантах втілення ліпідна наночастинка має середній діаметр від приблизно 10 до приблизно 1000 нм. У деяких варіантах втілення ліпідна наночастинка має діаметр, менший за 300 нм.

У деяких варіантах втілення ліпідна наночастинка має діаметр від приблизно 10 до приблизно 300 нм. У деяких варіантах втілення ліпідна наночастинка має діаметр, менший за 200 нм. У деяких варіантах втілення ліпідна наночастинка має діаметр від приблизно 25 до приблизно 200 нм. У деяких варіантах втілення композиція ліпідних наночастинок (наприклад, композиція, яка включає множину ліпідних наночастинок) має гранулометричний склад, у якому середній розмір (наприклад, діаметр) становить від приблизно 70 нм до приблизно 200 нм, у більш типовому варіанті середній розмір становить приблизно 100 нм або менше.

Можуть застосовуватися різні ліпідні наночастинки, відомі фахівцям у даній галузі, для доставлення описаного авторами вектора зкДНК. Наприклад, різні способи доставлення з застосуванням ліпідних наночастинок описуються у патентах США №№ 9,404,127, 9,006,417 і 9,518,272.

У деяких варіантах втілення описаний авторами вектор зкДНК доставляють за допомогою наночастинок золота. Зазвичай нуклеїнова кислота може бути ковалентно зв'язана з наночастинкою золота або нековалентно зв'язаною з наночастинкою золота (наприклад, зв'язаною через взаємодію заряд-заряд), наприклад, як описується у публікації Ding et al. (2014). Gold Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery. Mol. Ther. 22(6); 1075 - 1083. У деяких варіантах втілення кон'югати наночастинок золота – нуклеїнових кислот одержують з застосуванням способів, описаних, наприклад, у патенті США № 6,812,334.

С. Ліпосоми

Утворення та застосування ліпосом в цілому відомо фахівцям у даній галузі. Було розроблено ліпосоми з поліпшеними стійкістю в сироватці та періодом напіввиведення з кровообігу (патент США № 5,741,516). Крім того, описувалися різні способи застосування ліпосом і ліпосомоподібних композицій як потенційних носіїв лікарських засобів (патенти США №№ 5,567,434; 5,552,157; 5,565,213; 5,738,868 і 5,795,587).

Ліпосоми успішно застосовуються з багатьма типами клітин, які зазвичай є резистентними до трансфекції з застосуванням інших процедур. Крім того, ліпосоми не мають обмежень довжини ДНК, які є типовими для систем доставлення на вірусній основі. Ліпосоми ефективно застосовуються для включення генів, ліків, радіотерапевтичних агентів, вірусів, факторів транскрипції та алостеричних ефекторів у різні культивовані лінії клітин та організми тварин. Крім того, було завершено декілька успішних клінічних випробувань з дослідженням ефективності опосередкованого ліпосомами доставлення лікарських засобів.

Ліпосоми утворюються з фосфоліпідів, диспергованих у водному середовищі, і спонтанно утворюють багат шарові концентричні двошарові везикули (також називаються багат шаровими везикулами (MLV). MLV зазвичай мають діаметр від 25 нм до 4 мкм. В результаті ультразвукової обробки MLV утворюються малі одношарові везикули (SUV) з діаметром у межах від 200 до 500 Å, які всередині містять водний розчин.

У деяких варіантах втілення ліпосома включає катіонні ліпіди. Термін "катіонний ліпід" включає ліпіди та синтетичні ліпіди, які мають полярні та неполярні домени, які можуть бути позитивно заряджені при фізіологічному рівні рН або близькому до нього, і які зв'язуються з поліаніонами, такими, як нуклеїнові кислоти, і полегшують доставлення нуклеїнових кислот у клітини. У деяких варіантах втілення катіонні ліпіди включають насичені та ненасичені алкілові та аліциклічні етери та естери амінів, амідів або їх похідні. У деяких варіантах втілення катіонні ліпіди включають лінійні, розгалужені алкільні, алкенільні групи або будь-яку комбінацію вищезгаданого. У деяких варіантах втілення катіонні ліпіди містять від 1 до приблизно 25 атомів вуглецю (наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 або 25 атомів вуглецю. У деяких варіантах втілення катіонні ліпіди містять більше, ніж 25 атомів вуглецю. У деяких варіантах втілення лінійні або розгалужені алкільні або алкенові групи мають шість або більше атомів вуглецю. Катіонний ліпід також може включати у деяких варіантах втілення одну або декілька аліциклічних груп. Необмежувальними прикладами аліциклічних груп є холестеринові та інші стероїдні групи. У деяких варіантах втілення катіонні ліпіди одержують з одним або кількома протиіонами. Прикладами протиіонів (аніонів) є, крім інших Cl^- , Br^- , I^- , F^- , ацетат, трифтороацетат, сульфат, нітрит та нітрат.

Необмежувальними прикладами катіонних ліпідів є поліетиленімінові, поліамідоамінові (PAMAM) зірчасті дендримери, ліпофектин (комбінація DOTMA та DOPE), ліпофектаза, LIPOFECTAMINE™ (наприклад, LIPOFECTAMINE™ 2000), DOPE, цитофектин (Gilead Sciences, Foster City, Каліфорнія) та еуфектини (JBL, San Luis Obispo, Каліфорнія). Типові катіонні ліпосоми можуть бути одержані з хлориду N-[1-(2,3-діолеолокси)-пропіл]-N,N,N-триметиламонію (DOTMA), метилсульфату N-[1-(2,3-діолеолокси)-пропіл]-N,N,N-триметиламонію (DOTAP), 3β -[N-(N',N'-диметиламіноетан)карбамоїл]холестерину (DC-Chol), трифтороацетату 2,3-діолеїлокси-N-[2(спермінкарбоксамідо)етил]-N,N-диметил-1-пропанамінію (DOSPA), броміду 1,2-диміристилоксипропіл-3-диметил-гідроксietiламонію; та броміду диметилдіоктадециламонію (DDAB). Нуклеїнові кислоти (наприклад, CELiD) також можуть входити до складу, наприклад, полі (L-лізину) або авідину, і ліпіди можуть бути включені або не включені до цієї суміші, наприклад, стерил-полі (L-лізін).

У деяких варіантах втілення вектор зкДНК, як розкривається авторами, доставляють за допомогою катіонного ліпиду, описаного у патенті США № 8,158,601, або сполуки поліаміну або ліпиду, як описано

у патенті США № 8,034,376.

D. Кон'югати

У деяких варіантах втілення вектор зкДНК, як розкривається авторами, є кон'югованим (наприклад, ковалентно зв'язаним з агентом, який збільшує клітинне поглинання. "Агентом, який збільшує клітинне поглинання", є молекула, яка сприяє перенесенню нуклеїнової кислоти через ліпідну мембрану. Наприклад, нуклеїнова кислота може бути кон'югована з ліпофільною сполукою (наприклад, холестерин, токоферол і т.ін.), проникаючим пептидом (СРР) (наприклад, пенетратином, ТАТ, Syn1B і т.ін.) та поліамінами (наприклад, сперміном). Інші приклади агентів, які збільшують клітинне поглинання, описуються, наприклад, у публікації Winkler (2013). Oligonucleotide conjugates for therapeutic applications. Ther. Deliv. 4(7); 791 - 809.

У деяких варіантах втілення вектор зкДНК, як розкривається авторами, є кон'югованим з полімером (наприклад, полімерною молекулою) або молекулою фолату (наприклад, молекулою фолієвої кислоти). Зазвичай доставлення нуклеїнових кислот, кон'югованих з полімерами, є відомим фахівцям у даній галузі, наприклад як описано в документах WO2000/34343 і WO2008/022309. У деяких варіантах втілення вектор зкДНК, як розкривається авторами, є кон'югованим з полі(амідним) полімером, наприклад, як описується у патенті США № 8,987,377. У деяких варіантах втілення описана нуклеїнова кислота є кон'юговою з молекулою фолієвої кислоти, як описано у патенті США № 8,507,455.

У деяких варіантах втілення вектор зкДНК, як розкривається авторами, є кон'югованим з вуглеводом, наприклад, як описано у патенті США № 8,450,467.

E. Нанокapsула

В альтернативному варіанті можуть застосовуватися композиції вектора зкДНК у нанокapsулах, як розкривається авторами. Нанокapsули зазвичай захоплюють речовини у стійкий і відтворюваний спосіб. Для уникнення побічних ефектів через внутрішньоклітинне полімерне перевантаження такі надтонкі частинки (розміром приблизно 0,1 мкм) мають утворюватися з застосуванням полімерів, здатних розкладатися *in vivo*. Для застосування передбачаються біорозкладні поліалкілціаноакрилатні наночастинки, які відповідають цим вимогам.

Способи доставлення векторів зкДНК

У деяких варіантах втілення вектор зкДНК доставляють у клітину-мішень *in vitro* або *in vivo* різними підходящими способами. Вектори зкДНК окремо наносять або вводять шляхом ін'єкції. Вектори зкДНК доставляють у клітину без допомоги трансфекційного реагента або інших фізичних засобів. В альтернативному варіанті вектори зкДНК доставляють. Застосовуючи будь-який відомий фахівцям у даній галузі трансфекційний реагент або відомий фахівцям у даній галузі фізичний засіб, який полегшує потрапляння ДНК у клітину, наприклад, ліпосоми, спирти, багаті на полілізин сполуки, багаті на аргінін сполуки, фосфат кальцію, мікровезикули, мікроін'єкцію, електропорацію і т. ін.

Натомість описані авторами трансдукції безкапсидними AAV векторами можуть ефективно спрямовуватися на типи клітин та тканин, які важко піддаються трансдукції традиційними AAV віріонами з застосуванням різних реагентів доставлення.

В іншому варіанті втілення вектор зкДНК вводять у ЦНС (наприклад, у головний мозок або в око). Вектор зкДНК може бути введений у спинний мозок, стовбур головного мозку (довгастий мозок, міст), середній мозок (гіпоталамус, таламус, епіталамус, гіпофіз, чорну речовину, епіфіз), мозочок, кінцевий мозок (смугасте тіло, великий мозок, включаючи потиличну, темпоральну, тім'яну та фронтальну частки, кору, підкоркові ядра, гіпокамп та *portaamygdala*), лімбічну систему, неокортекс, смугасте тіло, великий мозок та нижній горбик. Вектор зкДНК також вводять у різні ділянки ока, такі, як сітківка, рогівка та/або зоровий нерв. Вектор зкДНК доставляють у спинномозкову рідину (наприклад, через спинномозкову пункцію). Вектор зкДНК також вводять внутрішньосудинно у ЦНС у ситуаціях, у яких гематоенцефалічний бар'єр є порушеним (наприклад, при пухлині головного мозку або церебральному інфаркті).

У деяких варіантах втілення вектор зкДНК вводять у потрібну(і) ділянку(и) ЦНС будь-яким шляхом, відомим фахівцям у даній галузі, включаючи, крім інших, інтратекальне, внутрішньоочне, внутрішньочеребральне, внутрішньошлуночкове, внутрішньовенне (наприклад, у присутності цукру, такого, як маніт), внутрішньоносове, внутрішньовушне, внутрішньоочне (наприклад, інтравітреальне, субретинальне, у передню камеру) та періокулярне (наприклад, у субтенозову ділянку) доставлення, а також внутрішньом'язове доставлення з ретроградним доставленням у рухові нейрони.

У деяких варіантах втілення вектор зкДНК вводять у рідкій композиції шляхом прямої ін'єкції (наприклад, стереотаксичної ін'єкції) у потрібну ділянку або відділ ЦНС. В інших варіантах втілення вектор зкДНК забезпечують шляхом місцевого нанесення на потрібну ділянку або внутрішньоносового введення аерозольної композиції. Введення в око здійснюють через місцеве нанесення крапельок рідини. Як ще один альтернативний варіант, вектор зкДНК вводять як тверду композицію з повільним вивільненням (див., наприклад, патент США № 7,201,898). В інших варіантах втілення вектор зкДНК застосовують для ретроградного транспорту з метою лікування, послаблення та/або профілактики хвороб та порушень, пов'язаних з руховими нейронами (наприклад, аміотрофічного латерального склерозу (ALS); спінальної м'язової атрофії (SMA) і т. ін.). Наприклад, вектор зкДНК доставляють у м'язову тканину, з якої він мігрує у нейрони.

VIII. Додаткові приклади застосування векторів зкДНК

Композиції та вектори зкДНК, запропоновані авторами, можуть застосовуватися для доставлення трансгена з різними цілями. У деяких варіантах втілення трансген кодує білок або функціональну РНК, що призначається для застосування з дослідницькими цілями, наприклад, для створення соматичної трансгенної тваринної моделі, яка містить трансген, наприклад, для дослідження функції трансгенного продукту. В іншому прикладі трансген кодує білок або функціональну РНК, що призначається для застосування з метою створення тваринної моделі хвороби. У деяких варіантах втілення трансген кодує один або декілька пептидів, поліпептидів або білків, які можуть застосовуватися для лікування, послаблення або профілактики хворобливих станів або порушень у суб'єкта яким є ссавець. Трансген може бути перенесений (наприклад, експресований в організмі) до суб'єкта у достатній кількості для лікування хвороби, пов'язаної зі зниженою експресією, відсутністю експресії або дисфункцією гена. У деяких варіантах втілення трансген може бути перенесений (наприклад, експресований в організмі) до суб'єкта у достатній кількості для лікування хвороби, пов'язаної з підвищеною експресією, активністю генного продукту або неналежною підвищувальною регуляцією гена, який трансген пригнічує або в інший спосіб забезпечує зниження його експресії.

IX. Способи застосування

Вектор зкДНК згідно з винаходом також застосовують згідно зі способом доставлення потрібної нуклеотидної послідовності у клітину-мішень. Спосіб, зокрема, може бути способом доставлення потрібного терапевтичного гена у клітину суб'єкта, що має в цьому потребу. Винахід забезпечує можливість *in vivo* експресії поліпептиду, білка або олігонуклеотиду, який кодується послідовністю терапевтичної екзогенної ДНК у клітинах суб'єкта таким чином, щоб експресувався терапевтичний рівень поліпептиду, білка або олігонуклеотиду. Ці результати спостерігаються як в *in vivo*, так і в *in vitro* режимах доставлення вектора зкДНК.

Спосіб доставлення потрібної нуклеїнової кислоти у клітину суб'єкта може включати введення вищезгаданому суб'єкту вектора зкДНК згідно з винаходом, який включає вищезгадану потрібну нуклеїнову кислоту. Крім того, винахід забезпечує спосіб доставлення потрібної нуклеїнової кислоти у клітину суб'єкта, що має в цьому потребу, включаючи багаторазове введення вектора зкДНК згідно з винаходом, який включає вищезгадану потрібну нуклеїнову кислоту. Оскільки вектор зкДНК згідно з винаходом не викликає імунну реакцію, такої стратегії багаторазового введення не зашкоджує реакція імунної системи організму-хазяїна проти вектора зкДНК згідно з винаходом, на відміну від того, що спостерігається для інкапсидованих векторів.

Нуклеїнову(і) кислоту(и) вектора зкДНК вводять у достатній кількості для трансфекції клітин потрібної тканини та забезпечення достатнього рівня перенесення та експресії генів без небажаних побічних ефектів. Традиційними та фармацевтично прийнятними шляхами введення є, крім інших, внутрішньовенний (наприклад, у ліпосомній композиції), пряме доставлення до вибраного органа (наприклад, інтрапортальне доставлення у печінку), внутрішньом'язовий та інші парентеральні шляхи введення. Шляхи введення у разі потреби можуть комбінуватися.

Доставлення вектора зкДНК не обмежується одним видом вектора зкДНК. Відтак, в іншому аспекті багато векторів зкДНК, які включають різні послідовності екзогенних ДНК, можуть доставлятися одночасно або послідовно у задану клітину, тканину, орган або організм суб'єкта. Таким чином, ця стратегія дозволяє експресувати багато генів. Доставлення також може здійснюватися декількаразово і, що важливо для генної терапії у клінічних умовах, з наступним підвищенням або зниженням доз, з врахуванням браку антикапсидної імунної реакції. Передбачається, що антикапсидна реакція не відбуватиметься, оскільки капсид відсутній.

Винахід також забезпечує спосіб лікування хвороби у суб'єкта, який включає введення у клітину-мішень суб'єкта, що має в цьому потребу (зокрема, м'язову клітину або тканину), терапевтично ефективної кількості вектора зкДНК, необов'язково з фармацевтично прийнятним носієм. Хоча вектор зкДНК може бути введений у присутності носія, такий носій не вимагається. Втілений вектор зкДНК включає потрібну нуклеотидну послідовність, яку застосовують для лікування хвороби. Зокрема, вектор зкДНК може включати потрібну екзогенну послідовність ДНК, функціонально зв'язану з контрольними елементами, здатними спрямовувати транскрипцію потрібного поліпептиду, білка або олігонуклеотиду, який кодується послідовністю екзогенної ДНК при введенні в організм суб'єкта. Вектор зкДНК вводять будь-яким прийнятним шляхом, як зазначено вище та у будь-якому іншому місці цього опису.

X. Способи лікування

Описана авторами технологія також демонструє способи одержання, а також способи застосування описаних векторів зкДНК у різні способи, включаючи, наприклад, застосування, методології, діагностичні процедури та/або режими генної терапії *ex situ*, *in vitro* та *in vivo*.

Авторами пропонується спосіб лікування хвороби або порушення у суб'єкта, який включає введення у клітину-мішень суб'єкта, що має в цьому потребу (наприклад, м'язову клітину або тканину або уражену клітину іншого типу) терапевтично ефективної кількості вектора зкДНК, необов'язково з фармацевтично прийнятним носієм. Хоча вектор зкДНК може бути введений у присутності носія, такий носій не вимагається. Втілений вектор зкДНК включає потрібну нуклеотидну послідовність, яку застосовують для лікування хвороби. Зокрема, вектор зкДНК може включати потрібну екзогенну послідовність ДНК функціонально зв'язану з контрольними елементами, здатними спрямовувати транскрипцію потрібного поліпептиду, білка або олігонуклеотиду, який кодується послідовністю

екзогенної ДНК при введенні в організм суб'єкта. Вектор зкДНК вводять будь-яким прийнятним шляхом, як зазначено вище та у будь-якому іншому місці цього опису.

Будь-який трансген може бути доставлений векторами зкДНК, як розкривається авторами. До потрібних трансгенів відносяться, нуклеїнові кислоти, які кодують поліпептиди, або некодуючі нуклеїнові кислоти (наприклад, РНКі, міР і т. ін.), в оптимальному варіанті терапевтичні (наприклад, для медичного, діагностичного або ветеринарного застосування) або імуногенні (наприклад, для вакцин) поліпептиди.

У деяких варіантах втілення трансгени, які мають експресуватися векторами зкДНК, як описано авторами, мають експресувати або кодувати один або декілька поліпептидів, пептидів, рибозимів, пептидних нуклеїнових кислот, міРНК, РНКі, антисмислових олігонуклеотидів, антисмислових полінуклеотидів, антитіл, антиген-зв'язувальних фрагментів або будь-яку їх комбінацію.

Зокрема, трансген може кодувати один або декілька терапевтичних агентів, включаючи, крім інших, наприклад, білки, поліпептиди, пептиди, ферменти, антитіла, антиген-зв'язувальні фрагменти, а також їх варіанти та/або активні фрагменти, агоністи, антагоністи, міметики для застосування у лікуванні, профілактиці та/або послабленні одного або декількох симптомів хвороби, дисфункції, пошкодження та/або порушення. В одному аспекті хвороба, дисфункція, травма, пошкодження та/або порушення є людською хворобою, дисфункцією, травмою, пошкодженням та/або порушенням.

Як зазначено авторами, трансген може кодувати терапевтичний білок або пептид, або терапевтичну нуклеїновокислотну послідовність або терапевтичний агент, включаючи, крім інших, один або декілька агоністів, антагоністів, антиапоптозних факторів, інгібіторів, рецепторів, цитокінів, цитотоксинів, еритропоетичних агентів, глікопротеїнів, факторів росту, рецепторів факторів росту, гормонів, рецепторів гормонів, інтерферонів, інтерлейкінів, рецепторів інтерлейкінів, факторів росту нервів, нейроактивних пептидів, рецепторів нейроактивних пептидів, протеаз, інгібіторів протеаз, білкових декарбоксилаз, білкових кіназ, інгібіторів білкових кіназ, ферментів, білків рецепторного зв'язування, транспортних білків або одного або декількох їх інгібіторів, рецепторів серотоніну або одного або декількох інгібіторів його поглинання, серпінів, рецепторів серпіну, супресорів пухлин, діагностичних молекул, хіміотерапевтичних агентів, цитотоксинів, або будь-яку їх комбінацію.

У деяких варіантах втілення трансген в експресійній касеті, експресійному конструкті або векторі зкДНК, як описується авторами, може бути кодон-оптимізованим для клітини-хазяїна. У контексті даного опису термін "кодон-оптимізований" або "оптимізація кодону" стосується процесу модифікації нуклеїновокислотної послідовності для посиленої експресії у клітинах потрібної хребетної тварини, наприклад, миші або людини (наприклад, гуманізованої) шляхом заміни принаймні одного, більш, ніж одного, або значної кількості кодонів нативної послідовності (наприклад, прокариотної послідовності) на кодони, які частіше або найчастіше застосовуються у генах цієї хребетної тварини. Різні види демонструють схильність до певних кодонів конкретної амінокислоти. Як правило, оптимізація кодону не змінює амінокислотну послідовність первісного трансльованого білка. Оптимізовані кодони визначають з застосуванням, наприклад, платформи оптимізації кодону та синтезу генів Gene Forge® (Aptagen, Inc.) або іншої відкритої бази даних.

У деяких варіантах втілення вектор зкДНК експресує трансген у суб'єкта клітина-хазяїн. У деяких варіантах втілення суб'єкт клітина-хазяїн є клітиною-хазяїном людини, включаючи, наприклад, клітини крові, стовбурові клітини, кровотворні клітини, CD34⁺ клітини, клітини печінки, ракові клітини, клітини судин, клітини м'язів, клітини підшлункової залози, нервові клітини, клітини очей та сітківки, епітеліальні або ендотеліальні клітини, дендритні клітини, фібробласти, або будь-яка інша клітина, взята з організму ссавця, включаючи, крім інших, клітини печінки, клітини легень, серцеві клітини, клітини підшлункової залози, кишкові клітини, клітини діафрагми, клітини нирок, нервові клітини, клітини крові, клітини кісткового мозку або будь-яких однієї або декількох вибраних тканин суб'єкта, для якого передбачається генна терапія. В одному аспекті клітина-хазяїн суб'єкта є клітиною-хазяїном людини.

Авторами винаходу розкриваються композиції та рецептури вектора зкДНК, які включають один або декілька векторів зкДНК згідно з даним винаходом разом з одним або кількома фармацевтично прийнятними буферами, розріджувачами або ексципієнтами. Такі композиції можуть бути включені до одного або декількох діагностичних або терапевтичних комплексів для діагностування, профілактики, лікування або послаблення одного або декількох симптомів хвороби, пошкодження, порушення, травми або дисфункції. В одному аспекті хвороба, пошкодження, порушення, травми або дисфункції є хворобою, пошкодженням, порушенням, травмою або дисфункцією людини.

Інший аспект описаної авторами технології передбачає спосіб забезпечення для суб'єкта, що має в цьому потребу, діагностично або терапевтично ефективною кількістю вектора зкДНК, причому спосіб включає забезпечення для клітини, тканини або органа суб'єкта, що має в цьому потребу, певної кількості вектора зкДНК, як розкривається авторами; і протягом часу, ефективного для забезпечення можливості експресії трансгена з вектора зкДНК, таким чином, забезпечуючи суб'єкта діагностично або терапевтично ефективною кількістю білка, пептиду, нуклеїнової кислоти, які експресуються вектором зкДНК. В іншому аспекті суб'єктом є людина.

Інший аспект описаної авторами технології передбачає спосіб діагностики, запобігання, лікування або послаблення принаймні одного або декількох симптомів хвороби, порушення, дисфункції, пошкодження, аномального стану або травми у суб'єкта. У загальному сенсі спосіб включає принаймні

етап введення суб'єкту, що має в цьому потребу, одного або декількох описаних векторів зкДНК у кількості та протягом часу, достатнього для діагностування, профілактики, лікування або послаблення одного або декількох симптомів хвороби, порушення, дисфункції, пошкодження, аномального стану або травми у суб'єкта. В іншому аспекті суб'єктом є людина.

Інший аспект стосується застосування вектора зкДНК як засобу лікування або зменшення одного або декількох симптомів хвороби або хворобливих станів. Існує багато спадкових хвороб, при яких відомо про дефектні гени, і вони, як правило, розділяються на два класи: дефіцитні стани, зазвичай стосовно ферментів, які зазвичай успадковуються у рецесивний спосіб, та незбалансовані стани, які можуть стосуватися регуляторних або структурних білків, і які, зазвичай, але не завжди успадковуються у домінуючий спосіб. При хворобах з дефіцитними станами вектори зкДНК можуть застосовуватися для доставлення трансгенів для введення нормального гена в уражені тканини для замісної терапії, а також, у деяких варіантах втілення, для створення тваринних моделей хвороби з застосуванням антисмислових мутацій. При незбалансованих хворобливих станах вектори зкДНК можуть застосовуватися для створення хворобливого стану у модельній системі і потім можуть застосовуватись у спробах протидії хворобливому стану. Таким чином, описані авторами вектори зкДНК та способи дозволяють лікувати генетичні хвороби. У контексті цього опису хворобливий стан лікують шляхом часткового або повного усунення дефіциту або дисбалансу, який викликає хворобу або робить її більш тяжкою.

В цілому вектор зкДНК, як розкривається авторами, може застосовуватися для доставлення будь-якого трансгена для лікування, профілактики або послаблення симптомів, пов'язаних з будь-яким порушенням, пов'язаним з експресією гена. До типових хворобливих станів відносяться, крім інших: муковісцидоз (та інші легеневі хвороби), гемофілія А, гемофілія В, таласемія, анемія та інші порушення крові, СНІД, хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона, хвороба Хантингтона, аміотрофічний латеральний склероз, епілепсія та інші неврологічні порушення, рак, цукровий діабет, м'язові дистрофії (наприклад, Дюшенна-Беккера), хвороба Гурлера, дефіцит аденозиндеамінази, порушення обміну речовин, дегенеративні хвороби сітківки (та інші хвороби очей), мітохондріопатії (наприклад, Атрофія зорового нерва Лебера (LHON), синдром Лея та підгостра склерозуюча енцефалопатія), міопатії (наприклад, фаціоскапулогумеральна міопатія (FSHD) та кардіоміопатія), хвороби паренхіматозних органів (наприклад, головного мозку, печінки, нирок, серця) і т. ін. У деяких варіантах втілення вектори зкДНК, як розкривається авторами, можуть з користю застосовуватись у лікуванні суб'єктів з порушеннями обміну речовин (наприклад, дефіцитом оміїнотранскарбамілази).

У деяких варіантах втілення описаний авторами вектор зкДНК може застосовуватися для лікування, послаблення та/або профілактики хвороби або порушення, викликаних мутацією у гені або генному продукті. До типових хвороб або порушень, які піддаються лікуванню векторами зкДНК, відносяться, крім інших, хвороби або порушення обміну речовин (наприклад, хвороба Фабрі, хвороба Гоше, фенілкетонурія (PKU), хвороба накопичення глікогену); хвороби або порушення циклу обміну сечовини (наприклад, дефіцит орнітинтранскарбамілази (OTC)); лізосомальні хвороби або порушення накопичення (наприклад, метахроматична лейкодистрофія (MLD), мукополісахаридоз II типу (MPSII; синдром Хантера)); хвороби або порушення печінки (наприклад, прогресуючий сімейний внутрішньопечінковий холестаз (PFIC); хвороби або порушення крові (наприклад, гемофілія (А та В), таласемія та анемія); рак та пухлини, а також генетичні хвороби або порушення (наприклад, муковісцидоз).

В ще одному аспекті вектор зкДНК, як розкривається авторами, застосовують для доставлення гетерологічної нуклеотидної послідовності у ситуаціях, у яких бажаним є регулювання рівня експресії трансгена (наприклад, трансгенів, які кодують гормони або фактори росту, як описується авторами).

Відповідно, у деяких варіантах втілення описаний авторами вектор зкДНК може застосовуватися для виправлення відхилень у рівні та/або функції генного продукту (наприклад, відсутності або дефіциту білка), що призводить до хвороби або порушення. Вектор зкДНК може продукувати функціональний білок і/або модифікувати рівень білка для послаблення або зменшення симптомів або забезпечення поліпшення при конкретній хворобі або порушенні, викликаних відсутністю або браком білка. Наприклад, лікування дефіциту ОТС досягають шляхом продукування функціонального ферменту ОТС; лікування гемофілії А та В досягають шляхом модифікації рівня Фактора VIII, Фактора IX та Фактор X; лікування PKU досягають шляхом модифікації рівня ферменту фенілаланін-гідроксилази; лікування хвороби Фабрі або Гоше досягають шляхом продукування функціональної альфа-галактозидази або бета-глюкоцереб्रोзидази, відповідно; лікування MLD або MPSII досягають шляхом продукування функціональної арилсульфатази А або ідуронат-2-сульфатази, відповідно; лікування муковісцидозу досягають шляхом продукування функціонального регулятора трансмембранної провідності при муковісцидозі; лікування хвороба накопичення глікогену досягають шляхом відновлення функції функціонального ферменту G6Pази; і лікування PFIC досягають шляхом продукування функціональних генів ATP8B1, ABCB11, ABCB4 або TJP2.

В альтернативних варіантах втілення вектори зкДНК, як розкривається авторами, можуть застосовуватися для забезпечення антисмислової нуклеїнової кислоти для клітини *in vitro* або *in vivo*. Наприклад, якщо трансген є молекулою РНКі, експресія антисмислової нуклеїнової кислоти або РНКі у клітині-мішені зменшує експресію конкретного білка клітиною. Відповідно, трансгени, які є молекулами РНКі або антисмисловими нуклеїновими кислотами, вводять для зниження експресії

конкретного білка у суб'єкта, що має в цьому потребу. Антисмислові нуклеїнові кислоти також вводять у клітини *in vitro* для регулювання фізіології клітин, наприклад, для оптимізації систем культивування клітин або тканин.

У деяких варіантах втілення до типових трансгенів, які кодуються вектором зкДНК, відносяться, крім інших: Х, лізосомальні ферменти (наприклад, гексозамінідаза А, пов'язані з хворобою Тея-Сакса, або ідуранатсульфатаза, пов'язана з синдромом Хантера/MPS II), еритропоетин, ангіостатин, ендостатин, супероксиддисмутаза, глобін, липтин, каталаза, тирозингідроксилаза, а також цитокіни (наприклад, інтерферон, β -інтерферон, інтерферон- γ , інтерлейкін-2, інтерлейкін-4, інтерлейкін 12, гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор, лімфотоксин і т. ін.), пептидні фактори росту та гормони (наприклад, соматотропін, інсулін, інсуліноподібні фактори росту 1 та 2, тромбоцитарний фактор росту (PDGF), епідермальний фактор росту (EGF), фактор росту фібробластів (FGF), фактор росту нервів (NGF), нейротрофічний фактор-3 та 4, нейротрофічний фактор головного мозку (BDNF), гліальний фактор росту (GDNF), трансформуючий фактор росту- α та - β , і т. ін.), рецептори (наприклад, рецептор фактора некрозу пухлин). У деяких типових варіантах втілення трансген кодує моноклональне антитіло, специфічне до однієї або декількох потрібних мішеней. У деяких типових варіантах втілення більш, ніж один трансген кодується вектором зкДНК. У деяких типових варіантах втілення трансген кодує злитий білок, який включає два різні потрібні поліпептиди. У деяких варіантах втілення трансген кодує антитіло, включаючи антитіло повної довжини або фрагмент антитіла, як визначено авторами. У деяких варіантах втілення антитіло є антиген-зв'язувальним доменом або послідовністю варіабельного домену імуноглобуліну, як визначено авторами. Інші типові трансгенні послідовності кодують саморуйнівні генні продукти (тимідинкіназу, цитозиндезамінази, токсин дифтерії, цитохром Р450, дезоксицитидинкіназу та фактор некрозу пухлин), білки, які забезпечують резистентність до ліків, які застосовують у протираковій терапії, та генні продукти, які пригнічують пухлини.

У представленому для прикладу варіанті втілення трансген, який експресується вектором зкДНК, може застосовуватися для лікування м'язової дистрофії у суб'єкта, що має в цьому потребу, причому спосіб включає: введення ефективної для лікування, послаблення або профілактики кількості описаного авторами вектора зкДНК, причому вектор зкДНК включає гетерологічну нуклеїнову кислоту, яка кодує дистрофін, мінідистрофін, мікродистрофін, пропептид міостатину, фолістатин, розчинний рецептор активіну II типу, IGF-1, протизапальні поліпептиди, такі, як домінуючий мутант каппа-В, саркоспан, утрофін, мікродистрофін, ламінін- $\alpha 2$, α -саркоглікан, β -саркоглікан, γ -саркоглікан, δ -саркоглікан, IGF-1, антитіло або фрагмент антитіла проти міостатину або пропептиду міостатину та/або РНКі проти міостатину. У конкретних варіантах втілення вектор зкДНК вводять у скелетний, діафрагматичний та/або серцевий м'яз, як описується у будь-якій іншій частині цього опису.

У деяких варіантах втілення вектор зкДНК застосовують для доставлення трансгена у скелетний, серцевий або діафрагматичний м'яз для продукування поліпептиду (наприклад, ферменту) або функціональної РНК (наприклад, РНКі, мікроРНК, антисмислової РНК), що зазвичай циркулює в системі кровообігу, або для системного доставлення в інші тканини для лікування, послаблення та/або профілактики порушення (наприклад, порушення обміну речовин, такого, як діабет (наприклад, інсулін), гемофілії (наприклад, VIII), мукополісахаридної хвороби (наприклад, синдрому Слая, синдрому Гурлера, синдрому Шейє, синдрому Гурлера-Шейє, синдрому Гунтера, синдрому Санфіліппо А, В, С, D, синдрому Моркіо, синдрому Марото-Ламі і т. ін.) або хвороби лізосомального накопичення (такої, як хвороба Гоше [глюкоцереброзидаза], генералізованого глікогенезу [лізосомна кисла альфа-глюкозидаза] або хвороби Фабрі [альфа-галактозидаза А] або хвороби накопичення глікогену (такої, як генералізований глікогенез [лізосомальна кисла альфа-глюкозидаза]). Інші підходящі білки для лікування, послаблення та/або профілактики порушення обміну речовин описано вище.

В інших варіантах втілення вектор зкДНК, як розкривається авторами, застосовують для доставлення трансгена згідно зі способом лікування, послаблення та/або профілактики порушення обміну речовин у суб'єкта, що має в цьому потребу. Приклади порушень обміну речовин та трансгенів, які кодують поліпептиди, представлено авторами в цьому описі. Необов'язково поліпептид є секретованим (наприклад, поліпептидом, який є секретованим поліпептидом у його природному стані або який був підданий інженерії таким чином, щоб бути секретованим, наприклад, через функціональний зв'язок з секреторною сигнальною послідовністю, яка є відомою фахівцям у даній галузі).

Інший аспект винаходу стосується способу лікування, послаблення та/або профілактики уродженої вади серця або PAD у суб'єкта, що має в цьому потребу, причому спосіб включає введення вектора зкДНК, як описується авторами, в організм суб'єкта-савця, причому вектор зкДНК включає трансген, який кодує, наприклад, Ca^{2+} -АТФазу саркоплазматичного ендоретикулу (SERCA2a), ангіогенний фактор, інгібітор фосфатази І (І-1), РНКі проти фосфоламбану; інгібіторну або домінантно-негативну молекулу фосфоламбану, таку, як фосфоламбан S16E, білок цинкових пальців, який регулює ген фосфоламбану, $\beta 2$ -адренергічний рецептор, кіназу бета-2-адренергічного рецептора (BARK), PI3-кіназу, calsarcan, інгібітор кінази бета-адренергічного рецептора (β ARKct), інгібітор 1 протеїнфосфатази 1, S100A1, парвальбумін, аденілциклазу типу 6, молекулу, яка здійснює нокдаун кінази спряженого з G-білком рецептора 2 типу, таку, як конститутивно активний β ARKct, Pim-1, PGC-

1α, SOD-1, SOD-2, EC-SOD, калікреїн, HIF, тимозин-β4, mir-1, mir-133, mir-206 та/або mir-208.

Вектори зкДНК, як розкривається авторами, вводять у легені суб'єкта будь-якими прийнятними способами, необов'язково шляхом введення аерозольної суспензії придатних для вдихання частинок, які включають вектори зкДНК, які вдихає суб'єкт. Придатні для вдихання частинки можуть бути рідкими або твердими. Аерозолі рідких частинок, які включають вектори зкДНК, утворюють будь-якими прийнятними способами, наприклад, за допомогою розпилювача аерозолі під тиском або ультразвукового розпилювача, які є відомими фахівцям у даній галузі. Див., наприклад, патент США № 4,501,729. Аерозолі твердих частинок, які включають вектори зкДНК, подібним чином можуть утворюватися за допомогою будь-якого генератора аерозолів з твердих макрочастинок медикаменту, з застосуванням технологій, відомих фахівцям у галузі фармацевтики.

У деяких варіантах втілення, вектори зкДНК вводять у тканини ЦНС (наприклад, головний мозок, око). У конкретних варіантах втілення вектори зкДНК, як розкривається авторами, вводять для лікування, послаблення або профілактики хвороб ЦНС, включаючи генетичні порушення, нейродегенеративні порушення, психіатричні порушення та пухлини. До типових хвороб ЦНС відносяться, крім інших, хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона, хвороба Хантингтона, хвороби Канавана, хвороба Лея, хвороба Рефсума, синдром Туретта, первинний латеральний склероз, аміотрофічний латеральний склероз, прогресуюча м'язова атрофія, хвороба Піка, м'язова дистрофія, розсіяний склероз, важка міастенія, хвороба Бінсвангера, травма через пошкодження спинного мозку або голови, хвороба Тея-Сакса, хвороби Льоша-Найхана, епілепсія, церебральні інфаркти, психіатричні порушення, включаючи порушення настрою (наприклад, депресія, біполярний афективний розлад, стійкий афективний розлад, вторинний розлад настрою), шизофренія, лікарська залежність (наприклад, алкоголізм та залежність від інших речовин), неврози (наприклад, страх, obsесивний розлад, соматоформний розлад, дисоціативний розлад, сум, післяпологова депресія), психоз (наприклад, галюцинації та манії), деменція, параноя, синдром дефіциту уваги, психосексуальні порушення, порушення сну, больові синдроми, порушення харчування та ваги (наприклад, ожиріння, кахексія, нервова анорексія та булімія) і рак та пухлини (наприклад, пухлини гіпофізу) ЦНС.

До офтальмологічних порушень, які піддаються лікуванню, послабленню або профілактиці з застосуванням векторів зкДНК згідно з винаходом, відносяться офтальмологічні порушення з ураженням сітківки, заднього шляху та зорового нерва (наприклад, пігментна дегенерація сітківки, діабетична ретинопатія та інші дегенеративні хвороби сітківки, увеїт, вікова дегенерація жовтої плями, глаукома). Багато офтальмологічних хвороб та порушень є пов'язаними з один або кількома з трьох типів показань: (1) ангіогенезом, (2) запаленням та (3) дегенерацією. У деяких варіантах втілення вектор зкДНК, як розкривається авторами, застосовують для доставлення антиангіогенних факторів; протизапальних факторів; факторів, які затримують дегенерацію клітин, сприяють утримуванию клітин або сприяють росту клітин, та комбінацій вищезазначеного. Діабетична ретинопатія, наприклад, характеризується ангіогенезом. Діабетичну ретинопатію лікують шляхом доставлення одного або декількох антиангіогенних факторів внутрішньоочно (наприклад, у скловидне тіло) або періокулярно (наприклад, у субтеноніву ділянку). Один або декілька нейротрофічних факторів також можуть доставлятися спільно, або внутрішньоочно (наприклад, у скловидне тіло) або періокулярно. Додатковими офтальмологічними хворобами, які піддаються лікуванню, послабленню або профілактиці з застосуванням векторів зкДНК згідно з винаходом, є географічна атрофія, судинна або "волога" дегенерація жовтої плями, хвороба Штаргардта, уроджений амавроз Лебера (LCA), синдром Ашера, еластична псевдоксантома (PXE), х-зчеплений пігментний ретиніт (XLRP), х-зчеплений ретиношизис (XLRs), хороїдеремія, спадкова оптична нейропатія Лебера (LHON), ахроматопсія, колбочко-паличкова дистрофія, ендотеліальна дистрофія рогівки Фукса, діабетичний набряк жовтої плями і рак та пухлини очей.

У деяких варіантах втілення запальні офтальмологічні хвороби або порушення (наприклад, увеїт) піддаються лікуванню, послабленню або профілактиці з застосуванням векторів зкДНК згідно з винаходом. Один або декілька протизапальних факторів можуть бути експресовані шляхом внутрішньоочного (наприклад, у скловидне тіло або у передню камеру) введення вектора зкДНК, як розкривається авторами. В інших варіантах втілення офтальмологічні хвороби або порушення, які характеризуються дегенерацією сітківки (наприклад, пігментною дегенерацією сітківки) піддаються лікуванню, послабленню або профілактиці з застосуванням векторів зкДНК згідно з винаходом. Внутрішньоочне (наприклад, введення у скловидне тіло) вектора зкДНК, як розкривається авторами, який кодує один або декілька нейротрофічних факторів, застосовують для лікування таких хвороб на основі дегенерації сітківки. У деяких варіантах втілення хвороби або порушення, які включають як ангіогенез, так і дегенерацію сітківки (наприклад, вікова дегенерація жовтої плями) лікують векторами зкДНК згідно з винаходом. Вікову дегенерацію жовтої плями лікують шляхом введення вектора зкДНК, як розкривається авторами, який кодує один або декілька нейротрофічних факторів, внутрішньоочно (наприклад, у скловидне тіло) та/або один або декілька антиангіогенних факторів внутрішньоочно або періокулярно (наприклад, у субтеноніву ділянку). Глаукома характеризується підвищеним внутрішньоочним тиском та втратою гангліозних клітин сітківки. Лікування глаукоми включає введення одного або декількох нейропротекторних агентів, які захищають клітини від ексайтотоксичного пошкодження, з застосуванням вектора зкДНК, як розкривається авторами. Відповідно, до таких

агентів відносяться N-метил-D-аспартат (HMDA) антагоністи, цитокіни та нейротрофічні фактори, вони можуть доставлятися внутрішньоочно, необов'язково у складне тіло, з застосуванням вектора зкДНК, як розкривається авторами.

В інших варіантах втілення вектор зкДНК, як розкривається авторами, може застосовуватися для лікування епілептичних нападів, наприклад, для зменшення початку, частоти або тяжкості епілептичних нападів. Ефективність терапевтичного лікування для епілептичних нападів оцінюють за поведінковими (наприклад, тремтіння, тік очей або рота) та/або електрографічними критеріями (більшість епілептичних нападів мають характерні електрографічні відхилення). Таким чином, вектор зкДНК, як розкривається авторами, також може застосовуватися для лікування епілепсії, яка відзначається множинними епілептичними нападами протягом певного часу. В одному типовому варіанті втілення соматостатин (або його активний фрагмент) вводять у головний мозок з застосуванням вектора зкДНК, як розкривається авторами, для лікування пухлин гіпофізу. Згідно з цим варіантом втілення, вектор зкДНК, як розкривається авторами, який кодує соматостатин (або його активний фрагмент), вводять шляхом мікроінфузії у гіпофіз. Подібним чином таке лікування застосовують для лікування акромегалії (аномальної секреції гормону росту з гіпофізу). Нуклеїновокислотна (наприклад, за номером доступу в GenBank J00306) та амінокислотна (наприклад, за номером доступу в GenBank P01166; містить оброблені активні пептиди соматостатин-28 та соматостатин-14) послідовності соматостатинів є відомими фахівцям у даній галузі. У конкретних варіантах втілення вектор зкДНК може кодувати трансген, який включає секреторний сигнал, як описано у патенті США № 7,071,172.

Інший аспект винаходу стосується застосування вектора зкДНК, як описується авторами, для продукування антисмислової РНК, РНКі або іншої функціональної РНК (наприклад, рибозиму) для системного доставлення суб'єкту *in vivo*. Відповідно, у деяких варіантах втілення вектор зкДНК може включати трансген, що кодує антисмислову нуклеїнову кислоту, рибозим (наприклад, як описано у патенті США № 5,877,022), РНК, які впливають на опосередкований сплайсингосою транс-сплайсинг (див. Puttaraju et al., (1999) *Nature Biotech.* 17: 246; патент США № 6,013,487; патент США № 6,083,702), інтерферуючі РНК (РНКі), які опосередковують сайленсинг гена (див. Sharp et al., (2000) *Science* 287: 2431) або інші нетрансльовані РНК, такі, як "напрямні" РНК (Gorman et al., (1998) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95: 4929; патент США № 5,869,248, виданий Yuan et al.) і т.ін.

У деяких варіантах втілення вектор зкДНК також може включати трансген, що кодує репортерний поліпептид (наприклад, фермент, такий, як зелений флуоресцентний білок або лужну фосфатазу). У деяких варіантах втілення трансген, що кодує репортерний білок, який може бути застосований для експериментальних або діагностичних цілей, є вибраним серед: β -лактамази, β -галактозидази (LacZ), лужної фосфатази, тимідинкінази, зеленого флуоресцентного білка (GFP), хлорамфенікол-ацетилтрансферази (CAT), люциферази та інших, добре відомих фахівцям у даній галузі. У деяких аспектах вектори зкДНК, які включають трансген, який кодує репортерний поліпептид, можуть застосовуватися для діагностичних цілей або як маркери активності вектора зкДНК у суб'єкта, якому їх вводять.

У деяких варіантах втілення вектор зкДНК може включати трансген або гетерологічну нуклеотидну послідовність, яка має гомологію і рекомбінується з локусом на хромосомі хазяїна. Цей підхід застосовують для виправлення генетичного дефекту в клітині-хазяїні.

У деяких варіантах втілення вектор зкДНК може включати трансген, який може застосовуватися для експресії імуногенного поліпептиду у суб'єкта, наприклад, для вакцинації. Трансген може кодувати будь-який потрібний імуноген, відомий фахівцям у даній галузі, включаючи, крім інших, імуногени з вірусу імунодефіциту людини, вірусу грипу, gag-білки, пухлинні антигени, ракові антигени, бактеріальні антигени, вірусні антигени і т.ін.

XI. Введення

У конкретних варіантах втілення може застосовуватися більше одного введення (наприклад, два, три, чотири або більше введень) для досягнення потрібного рівня експресії гена протягом періоду різних інтервалів, наприклад, щодня, щотижня, щомісяця, щороку і т.ін.

Типові режими введення описаного авторами вектора зкДНК включають пероральний, ректальний, трансмукозальний, внутрішньоносовий, інгаляційний (наприклад, через аерозоль), букальний (наприклад, сублінгвальний), вагінальний, інтратекальний, внутрішньоочний, кризьшкірний, інтраендотеліальний, *in utero* (або *in ovo*), парентеральний (наприклад, внутрішньовенний, підшкірний, внутрішньошкірний, внутрішньочерепний, внутрішньом'язовий [включаючи введення у скелетний, діафрагматичний та/або серцевий м'яз], інтраплевральний, внутрішньоцеребральний та внутрішньосуглобний), місцевий (наприклад, на шкіру та слизові оболонки, включаючи поверхні дихальних шляхів, та кризьшкірне введення), внутрішньолимфатичний і т.ін., а також пряму ін'єкцію у тканину або орган (наприклад, у печінку, око, скелетний м'яз, серцевий м'яз, діафрагматичний м'яз або головний мозок).

Введення вектора зкДНК може здійснюватися у будь-яке місце суб'єкта, включаючи, крім інших, місце, вибране з групи, до якої відносяться головний мозок, скелетний м'яз, гладенький м'яз, серце, діафрагму, дихальний епітелій, печінку, нирки, селезінку, підшлункову залозу, шкіру та око. Введення вектора зкДНК також може здійснюватися у пухлину (наприклад, у саму пухлину або поблизу від неї або у лімфатичний вузол). Найбільш підходящий шлях у будь-якому конкретному випадку залежить від характеру та тяжкості стану, який піддається лікуванню, послабленню та/або профілактиці, та від

характеру конкретного застосовуваного вектора зкДНК. Крім того, зкДНК дозволяє вводити більш одного трансгена в один вектор або декілька векторів зкДНК (наприклад, зкДНК-коктейль).

Введення описаного авторами вектора зкДНК у скелетний м'яз згідно з даним винаходом включає, крім іншого, введення у скелетний м'яз кінцівки (наприклад, плече, передпліччя, стегно та/або гомілку), спину, шию, голову (наприклад, язик), грудну клітину, черевну порожнину, таз/промежину та/або пальці. Вектор зкДНК, як розкривається авторами, доставляють у скелетний м'яз шляхом внутрішньовенного введення, внутрішньоартеріального введення, внутрішньочеревинного введення, перфузії кінцівок (необов'язково, окремої перфузії ноги та/або руки; див., наприклад, Arruda et al., (2005) Blood 105: 3458 - 3464) та/або прямої внутрішньом'язової ін'єкції. У конкретних варіантах втілення вектор зкДНК, як розкривається авторами, вводять у кінцівку (руку та/або ногу) суб'єкта (наприклад, суб'єкта з м'язовою дистрофією, такою, як DMD) шляхом перфузії кінцівки, необов'язково окремої перфузії кінцівки (наприклад, шляхом внутрішньовенного або внутрішньосуглобного введення). У варіантах втілення вектор зкДНК, як розкривається авторами, може вводитися без застосування "гідродинамічних" технологій.

Введення вектора зкДНК, як розкривається авторами, до серцевого м'яза включає введення у ліве передсердя, праве передсердя, лівий шлуночок, правий шлуночок та/або перегородку. Вектор зкДНК, як описується авторами, доставляють у серцевий м'яз шляхом внутрішньовенного введення, внутрішньоартеріального введення, такого, як інтрааортальне введення, прямої серцевої ін'єкції (наприклад, у ліве передсердя, праве передсердя, лівий шлуночок, правий шлуночок) та/або перфузії через коронарну артерію. Введення у діафрагматичний м'яз здійснюють у будь-який підходящий спосіб, включаючи внутрішньовенне введення, внутрішньоартеріальне введення та/або внутрішньочеревинне введення. Введення у гладенький м'яз здійснюють у будь-який підходящий спосіб, включаючи внутрішньовенне введення, внутрішньоартеріальне введення та/або внутрішньочеревинне введення. В одному варіанті втілення введення здійснюють в ендотеліальні клітини, присутні у гладенькому м'язі, поблизу від нього та/або на ньому.

У деяких варіантах втілення вектор зкДНК згідно з даним винаходом вводять у скелетний м'яз, діафрагматичний м'яз та/або серцевий м'яз (наприклад, для лікування, послаблення та/або профілактики м'язової дистрофії або серцевої хвороби (наприклад, PAD або застійної серцевої недостатності)).

Ex vivo лікування

У деяких варіантах втілення клітини видалюють з організму суб'єкта, вектор зкДНК вводять в організм, і клітини після цього повертають до організму суб'єкта. Способи видалення клітин з організму суб'єкта для лікування ex vivo, з наступним введенням знову до організму суб'єкта, є відомими фахівцям у даній галузі (див., наприклад, патент США № 5,399,346, зміст якого включено до цього опису в його повному обсязі). В альтернативному варіанті вектор зкДНК вводять у клітини з організму іншого суб'єкта у культивовані клітини або у клітини будь-якого іншого джерела, і клітини вводять суб'єкту, що має в цьому потребу.

Клітини, трансдуковані вектором зкДНК, в оптимальному варіанті вводять в організм суб'єкта у "терапевтично-ефективній кількості" у комбінації з фармацевтичним носієм. Фахівцям у даній галузі стане зрозуміло, що терапевтичний ефект не обов'язково має бути повним або лікувальним, якщо для суб'єкта забезпечується певна користь.

У деяких варіантах втілення вектор зкДНК може кодувати трансген (який іноді називається гетерологічною нуклеотидною послідовністю), який є будь-яким поліпептидом, який бажано продукується у клітині in vitro, ex vivo або in vivo. Наприклад, на відміну від застосування векторів зкДНК в обговорюваному авторами способі лікування, у деяких варіантах втілення вектори зкДНК вводять у культивовані клітини і з них виділяють експресований генний продукт, наприклад, для продукування антигенів або вакцин.

Вектори зкДНК можуть застосовуватися як у ветеринарії, так і у медицині. До підходящих суб'єктів для способів доставлення генів ex vivo, як описується вище, відносяться птахи (наприклад, кури, качки, гуси, перепілки, індички та фазани) та ссавці (наприклад, людина, велика рогата худоба, вівці, кози, коні, коти, собаки та зайцеподібні), причому перевагу віддають ссавцям. Найбільшу перевагу віддають людині. Людськими суб'єктами є новонароджені, діти, підлітки та дорослі.

В одному аспекті описана авторами технологія стосується способу доставлення трансгена у клітину. Як правило, для in vitro способів вектор зкДНК вводять у клітину з застосуванням способів, які розкриваються авторами, а також інших способів, відомих фахівцям у даній галузі. Описані авторами вектори зкДНК в оптимальному варіанті вводять у клітину у біологічно ефективній кількості. Якщо вектор зкДНК вводять у клітину in vivo (наприклад, суб'єкту), біологічно ефективною кількістю вектора зкДНК є кількість, яка є достатньою для забезпечення в результаті трансдукції та експресії трансгена у клітині-мішені.

В. Діапазони доз

In vivo та/або in vitro аналізі необов'язково застосовують для визначення оптимальних діапазонів доз для застосування. Точна доза, яка має застосовуватись у композиції, також залежить від шляху введення та тяжкості стану і має визначатися згідно з думкою фахівця у даній галузі та відповідно до існуючих у суб'єкта обставин. Ефективні дози екстраполюють з кривих доза-ефект, одержаних з застосуванням тест-систем на основі in vitro або тваринних моделей.

Вектор зкДНК вводять у достатній кількості для трансфекції клітин потрібної тканини та забезпечення достатнього рівня перенесення та експресії генів без небажаних побічних ефектів. До традиційних і фармацевтично прийнятних шляхів введення відносяться, крім інших, описані вище у розділі "Введення", такі, як пряме доставлення до вибраного органа (наприклад, інтрапортальне доставлення у печінку), пероральний, інгаляційний (включаючи внутрішньоносове та інтратрахеальне доставлення), внутрішньоочний, внутрішньовенний, внутрішньом'язовий, підшкірний, внутрішньошкірний, внутрішньопухлинний та інші парентеральні шляхи введення. Шляхи введення у разі потреби можуть комбінуватися.

Доза кількості вектора зкДНК, яка вимагається для досягнення конкретного "терапевтичного ефекту", може бути різною, залежно від декількох чинників, включаючи, крім інших: шлях введення нуклеїнової кислоти, рівень експресії гена або РНК, який вимагається для досягнення терапевтичного ефекту, конкретна хвороба або порушення, що підлягає лікуванню, та стійкість гена(ів), продукту(ів) РНК або утвореного(их) в результаті експресованого(их) білка(ів). Фахівець у даній галузі зможе легко визначити діапазон доз вектора зкДНК для лікування пацієнта, що має конкретну хворобу або порушення, на основі вищезгаданих чинників, а також інших чинників, добре відомих фахівцям у даній галузі.

Режим дозування регулюють для забезпечення оптимальної терапевтичної відповіді. Наприклад, олігонуклеотид вводять багаторазово, наприклад, декілька доз можуть вводитися щодня, або доза може бути пропорційно знижена залежно від вимог терапевтичної ситуації. Фахівець у даній галузі зможе легко визначити відповідні дози та режими введення даних олігонуклеотидів, залежно від того, чи мають олігонуклеотиди вводитися у клітини, чи в організм суб'єктів.

"Терапевтично ефективна доза" охоплюється відносно широким діапазоном, який може бути визначений через клінічні випробування, і залежить від конкретного застосування (нервові клітини вимагають дуже малої кількості, тоді як системна ін'єкція вимагає великої кількості). Наприклад, для прямої *in vivo* ін'єкції у скелетний або серцевий м'яз людини терапевтично ефективна доза має становити від приблизно 1 мкг до 100 г вектора зкДНК. Якщо для доставлення вектора зкДНК застосовують екзосоми або мікрочастинки, терапевтично ефективну дозу визначають експериментально, але очікувана кількість для доставлення становить від 1 мкг до приблизно 100 г вектора.

Рецептування розчинів фармацевтично прийнятних ексципієнтів та носіїв є добре відомим фахівцям у даній галузі, так само, як розробка підходящих режимів дозування та лікування для застосування в описаних авторами конкретних композиціях у різних режимах лікування.

Для *in vitro* трансфекції ефективна кількість вектора зкДНК, який має бути доставлений у клітини (1×10^6 клітини) має становити від 0,1 до 100 мкг вектора зкДНК, в оптимальному варіанті від 1 до 20 мкг, у ще кращому варіанті – від 1 до 15 мкг або від 8 до 10 мкг. Більші вектори зкДНК вимагають вищих доз. Якщо застосовують екзосоми або мікрочастинки, ефективну *in vitro* дозу визначають експериментально, але вона призначається для доставлення в цілому такої самої кількості вектора зкДНК.

Лікування може включати введення єдиної дози або декількох доз. У деяких варіантах втілення суб'єкту вводять більше однієї дози; фактично у разі потреби можуть вводитися декілька доз, оскільки вектор зкДНК не викликає антикапсидної імунної реакції у хазяїна через відсутність вірусного капсиду. Таким чином, фахівець у даній галузі зможе легко визначити відповідну кількість доз. Кількість введених доз може становити, наприклад, 1 - 100, в оптимальному варіанті 2 - 20 доз.

Без прив'язування до будь-якої конкретної теорії, брак типової антивірусної імунної реакції, що викликається введенням вектора зкДНК, як описується згідно з винаходом (тобто, відсутність капсидних компонентів), дозволяє вводити вектор зкДНК в організм хазяїна багаторазово. У деяких варіантах втілення кількість разів доставлення суб'єкту гетерологічної нуклеїнової кислоти складає від 2 до 10 разів (наприклад, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 разів). У деяких варіантах втілення вектор зкДНК доставляють суб'єкту понад 10 разів.

У деяких варіантах втілення дозу вектора зкДНК вводять суб'єкту не більше одного разу на календарний день (наприклад, 24-годинний період). У деяких варіантах втілення дозу вектора зкДНК вводять суб'єкту не частіше, ніж раз на 2, 3, 4, 5, 6 або 7 календарних днів. У деяких варіантах втілення дозу вектора зкДНК вводять суб'єкту не частіше, ніж раз на календарний тиждень (наприклад, 7 календарних днів). У деяких варіантах втілення дозу вектора зкДНК вводять суб'єкту не частіше, ніж раз на два тижні (наприклад, раз на календарний двотижневий період). У деяких варіантах втілення дозу вектора зкДНК вводять суб'єкту не частіше, ніж раз на календарний місяць (наприклад, раз на 30 календарних днів). У деяких варіантах втілення дозу вектора зкДНК вводять суб'єкту не частіше, ніж раз на шість календарних місяців. У деяких варіантах втілення дозу вектора зкДНК вводять суб'єкту не частіше, ніж раз на календарний рік (наприклад, 365 днів або 366 днів у високосному році).

С. Одиничні лікарські форми

У деяких варіантах втілення фармацевтичні композиції для зручності випускають в одиничних лікарських формах. Одинична лікарська форма, як правило, має бути пристосована для одного або декількох конкретних шляхів введення фармацевтичної композиції. У деяких варіантах втілення одинична лікарська форма є пристосованою для введення шляхом інгаляції. У деяких варіантах

втілення одинична лікарська форма є пристосованою для введення за допомогою пульверизатора. У деяких варіантах втілення одинична лікарська форма є пристосованою для введення за допомогою розпилювача. У деяких варіантах втілення одинична лікарська форма є пристосованою для введення за допомогою генератора аерозолі. У деяких варіантах втілення одинична лікарська форма є пристосованою для перорального введення, для букального введення або для сублінгвального введення. У деяких варіантах втілення одинична лікарська форма є пристосованою для внутрішньовенного, внутрішньом'язового або підшкірного введення. У деяких варіантах втілення одинична лікарська форма є пристосованою для інтратекального або інтрацеребровентрикулярного введення. У деяких варіантах втілення фармацевтичну композицію рецептують для місцевого нанесення. Кількість активного інгредієнта, який комбінують з матеріалом носія для створення одиничної лікарської форми зазвичай є кількістю сполуки, яка забезпечує терапевтичний ефект.

Різні способи застосування

Композиції та вектори зкДНК, запропоновані авторами, можуть застосовуватися для доставлення трансгена з різними цілями як описується вище. У деяких варіантах втілення трансген кодує білок або функціональну РНК, що призначається для застосування з дослідницькими цілями, наприклад, для створення соматичної трансгенної тваринної моделі, яка містить трансген, наприклад, для дослідження функції трансгенного продукту. В іншому прикладі трансген кодує білок або функціональну РНК, що призначається для застосування з метою створення тваринної моделі хвороби.

У деяких варіантах втілення трансген кодує один або декілька пептидів, поліпептидів або білків, які можуть застосовуватися для лікування, послаблення або профілактики хворобливих станів у суб'єкта, яким є ссавець. Трансген може бути перенесений (наприклад, експресованим) до організму пацієнта у достатній кількості для лікування хвороби, пов'язаної зі зниженою експресією, відсутністю експресії або дисфункцією гена.

У деяких варіантах втілення, вектори зкДНК передбачаються для застосування згідно зі способами діагностики та скринінгу, причому трансген тимчасово або стійко експресується у системі клітинної культури або, в альтернативному варіанті, трансгенній тваринній моделі.

Інший аспект описаної авторами технології передбачає спосіб трансдукції популяції клітин ссавців. У загальному сенсі спосіб включає принаймні етап введення в одну або декілька клітин з популяції композиції, яка включає ефективну кількість однієї або декількох зкДНК, як розкривається авторами.

Крім того, даний винахід забезпечує композиції, а також терапевтичні та/або діагностичні комплекти, які включають один або декілька описаних векторів зкДНК або композицій зкДНК, рецептованих з одним або кількома додатковими інгредієнтами, або приготовлених з однією або кількома інструкціями з їх застосування.

Клітина, призначена для введення вектора зкДНК, як розкривається авторами, може належати до будь-якого типу, включаючи, крім інших, нервові клітини (включаючи клітини периферичної та центральної нервової систем, зокрема, клітини головного мозку), клітини легенів, клітини сітківки, епітеліальні клітини (наприклад, епітеліальні клітини кишечника та дихальних шляхів), клітини м'язів, дендритні клітини, клітини підшлункової залози (включаючи інсулярні клітини), печінкові клітини, клітини міокарда, кісткові клітини (наприклад, стовбурові клітини кісткового мозку), кровотворні стовбурові клітини, клітини селезінки, кератиноцити, фібробласти, ендотеліальні клітини, клітини передміхурової залози, ембріональні клітини і т. ін. В альтернативному варіанті клітина може бути будь-якою клітиною-попередником. Як ще один альтернативний варіант, клітина може бути стовбуровою клітиною (наприклад, нервовою стовбуровою клітиною, стовбуровою клітиною печінки). У ще одному альтернативному варіанті клітина може бути раковою або пухлинною клітиною. Крім того, клітини можуть походити з будь-якого виду, як зазначено вище.

У деяких варіантах втілення даний винахід може бути визначений у будь-якому з представлених нижче абзаців:

1А. Вектор зкДНК, який включає:

експресійну касету, що включає цис-регуляторний елемент, причому цис-регуляторний елемент є вибраним із групи, до якої відносяться посттранскрипційний регуляторний елемент і сигнал поліА ВGH;

ITR дикого типу на висхідному (5'-кінці) експресійної касети, причому ITR дикого типу включає полінуклеотид SEQ ID NO: 51; і

модифікований ITR на низхідному (3'-кінці) експресійної касети, причому модифікований ITR включає полінуклеотид SEQ ID NO:2,

причому вищезгаданий ДНК-вектор є позбавленим прокаріотно-специфічного метилування та не є інкапсидованим у капсидний білок AAV.

2А. ДНК-вектор за абзацом 1А, який відрізняється тим, що ДНК-вектор має лінійну та безперервну структуру.

3А. ДНК-вектор за будь-яким із абзаців 1А - 2А, який відрізняється тим, що посттранскрипційний регуляторний елемент включає посттранскрипційний регуляторний елемент WHP (WPRE).

4А. ДНК-вектор за будь-яким із абзаців 1А - 3А, який відрізняється тим, що експресійна касета також включає сайт клонування.

5А. ДНК-вектор за будь-яким із абзаців 1А - 4А, який відрізняється тим, що експресійна касета

включає промотор, вибраний з групи, до якої відносяться CAG промотор, AAT промотор, LP1 промотор і EF1 промотор.

6A. ДНК-вектор за абзацом 1A, який відрізняється тим, що експресійна касета включає полінуклеотиди SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 і SEQ ID NO: 9.

7A. ДНК-вектор за будь-яким із абзаців 1A - 6A, який відрізняється тим, що експресійна касета також включає сайт клонування й екзогенну послідовність, вставлену в сайт клонування.

8A. ДНК-вектор за абзацом 7A, який відрізняється тим, що екзогенна послідовність включає принаймні 2000 нуклеотидів.

9A. ДНК-вектор за абзацом 7A, який відрізняється тим, що екзогенна послідовність кодує білок.

10A. ДНК-вектор за абзацом 7A, який відрізняється тим, що екзогенна послідовність кодує репортерний білок.

11A. Клітина, яка включає ДНК-вектор за будь-яким із абзаців 1A - 10A.

12A. Клітина за абзацом 11A, яка також включає білок реплікації, вибраний з групи, до якої відносяться: AAV Rep 78, AAV Rep 68, AAV Rep52 й AAV Rep 40.

13A. Клітина за абзацом 12A, яка відрізняється тим, що вищезгаданий білок реплікації кодується хелперним вірусом.

14A. Клітина за будь-яким із абзаців 11A - 13A, яка відрізняється тим, що клітина є позбавленою гена, який кодує капсидний білок AAV.

15A. Фармакологічно активний інгредієнт, який включає ДНК-вектор за будь-яким із абзаців 1A - 10A й, необов'язково, ексципієнт.

16A. Спосіб доставлення екзогенної послідовності у клітину, який включає етап: введення вищезгаданого ДНК-вектора за будь-яким із абзаців 1A - 10A у вищезгадану клітину.

17A. Спосіб за абзацом 16A, який відрізняється тим, що вищезгаданий етап введення ДНК-вектора включає гідродинамічну ін'єкцію.

18A. Спосіб приготування ДНК-вектора, який включає етапи:

введення у клітину нуклеїновокислотного конструкту або вірусу, що включає:

експресійну касету, яка включає цис-регуляторний елемент, причому цис-регуляторний елемент є вибраним із групи, до якої відносяться посттранскрипційний регуляторний елемент і сигнал поліА BGH;

ITR дикого типу на висхідному (5'-кінці) експресійної касети, причому ITR дикого типу включає полінуклеотид SEQ ID NO: 51; і

модифікований ITR на низхідному (3'-кінці) експресійної касети, причому модифікований ITR включає полінуклеотид SEQ ID NO: 2,

причому вищезгадана клітина є позбавленою капсидного білка AAV; і

збирання вищезгаданого ДНК-вектора, який продукується з вищезгаданого нуклеїновокислотного конструкту або вищезгаданого вірусу,

причому вищезгаданий ДНК-вектор є позбавленим прокаріотно-специфічного метилування.

19A. Спосіб за абзацом 18A, який відрізняється тим, що ДНК-вектор має лінійну та безперервну структуру.

20A. Спосіб за будь-яким із абзаців 18A - 19A, який відрізняється тим, що посттранскрипційний регуляторний елемент включає посттранскрипційний регуляторний елемент WHP (WPRE).

21A. Спосіб за будь-яким із абзаців 18A - 20A, який відрізняється тим, що експресійна касета також включає промотор, вибраний з групи, до якої відносяться CAG промотор, AAT промотор, LP1 промотор і EF1 промотор.

22A. Спосіб за абзацом 18, який відрізняється тим, що вищезгадана експресійна касета включає полінуклеотиди SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 і SEQ ID NO: 9.

23A. Спосіб за будь-яким із абзаців 18A - 22A, який відрізняється тим, що вищезгадана експресійна касета також включає екзогенну послідовність.

24A. Спосіб за абзацом 23A, який відрізняється тим, що екзогенна послідовність включає принаймні 2000 нуклеотидів.

25A. Спосіб за абзацом 23A, який відрізняється тим, що екзогенна послідовність кодує білок.

26A. Спосіб за абзацом 23A, який відрізняється тим, що екзогенна послідовність кодує репортерний білок.

27A. Спосіб за будь-яким із абзаців 18A - 26A, який відрізняється тим, що вищезгадана клітина є клітиною комахи.

28A. ДНК-вектор, який генерується способом за будь-яким із абзаців 18 - 27.

29A. Клітина для продукування ДНК-вектора, яка включає:

перший полінуклеотид, що включає:

експресійну касету, яка включає цис-регуляторний елемент, причому цис-регуляторний елемент є вибраним із групи, до якої відносяться посттранскрипційний регуляторний елемент і сигнал поліА BGH;

ITR дикого типу на висхідному (5'-кінці) експресійної касети, причому ITR дикого типу включає полінуклеотид SEQ ID NO: 51; і

модифікований ITR на низхідному (3'-кінці) експресійної касети, причому модифікований ITR включає полінуклеотид SEQ ID NO: 2; і

другий полінуклеотид, який кодує білок реплікації, вибраний з групи, до якої відносяться AAV78, AAV52, AAV Rep68 й AAV Rep 40,

причому вищезгадана клітина є позбавленою гена, який кодує капсидний білок AAV.

30A. Клітина за абзацом 29A, яка відрізняється тим, що посттранскрипційний регуляторний елемент включає посттранскрипційний регуляторний елемент WHP (WPRE).

31A. Клітина за будь-яким із абзаців 29A - 30A, яка відрізняється тим, що вищезгадана клітина є клітиною комахи.

32A. ДНК-вектор, який продукується з клітини за будь-яким із абзаців 29A - 31A шляхом реплікації вищезгаданого першого полінуклеотиду.

33A. Полінуклеотид для генерації ДНК-вектора, який включає:

експресійну касету, яка включає цис-регуляторний елемент, причому цис-регуляторний елемент є вибраним із групи, до якої відносяться посттранскрипційний регуляторний елемент і сигнал поліA BGH;

ITR дикого типу на висхідному (5'-кінці) експресійної касети, причому ITR дикого типу включає полінуклеотид SEQ ID NO: 51; і

модифікований ITR на низхідному (3'-кінці) експресійної касети, причому модифікований ITR включає полінуклеотид SEQ ID NO:2.

34A. Полінуклеотид за абзацом 33A, який відрізняється тим, що посттранскрипційний регуляторний елемент включає посттранскрипційний регуляторний елемент WHP (WPRE).

35A. Полінуклеотид за будь-яким із абзаців 33A - 34A, який відрізняється тим, що полінуклеотид міститься у плазміді, у бакміді або у бакуловірусі.

36A. Полінуклеотид за будь-яким із абзаців 33A - 35A, який також включає екзогенну послідовність.

37A. Полінуклеотид за абзацом 36A, який відрізняється тим, що екзогенна послідовність включає принаймні 2000 нуклеотидів.

38A. Полінуклеотид за абзацом 36A, який відрізняється тим, що екзогенна послідовність кодує білок.

39A. Полінуклеотид за абзацом 36A, який відрізняється тим, що екзогенна послідовність кодує репортер.

40A. ДНК-вектор, який продукується шляхом реплікації полінуклеотиду за будь-яким із абзаців 33A - 39A білком реплікації, вибраним із групи, до якої відносяться AAV78, AAV52, AAV Rep68 й AAV Rep 40, причому ДНК-вектор має лінійну та безперервну структуру, є позбавленим прокаріотно-специфічного метилування та не є інкапсидованим у капсидний білок AAV.

41A. ДНК-вектор, який включає:

експресійну касету;

модифікований ITR на висхідному (5'-кінці) експресійної касети, причому модифікований ITR включає полінуклеотид SEQ ID NO: 52; і

ITR дикого типу на низхідному (3'-кінці) експресійної касети, причому ITR дикого типу включає полінуклеотид SEQ ID NO: 1,

причому ДНК-вектор є позбавленим прокаріотно-специфічного метилування та не є інкапсидованим у капсидний білок AAV.

42A. ДНК-вектор за абзацом 41A, який відрізняється тим, що експресійна касета включає цис-регуляторний елемент, причому цис-регуляторний елемент є вибраним із групи, до якої відносяться елемент посттранскрипційного відгуку та сигнал поліA.

43A. ДНК-вектор за абзацом 42A, який відрізняється тим, що елемент посттранскрипційного відгуку включає елемент посттранскрипційного відгуку WHP (WPRE).

44A. ДНК-вектор за будь-яким із абзаців 42A - 43A, який відрізняється тим, що сигнал поліA включає сигнал поліA BGH.

45A. ДНК-вектор за будь-яким із абзаців 41A - 44A, який відрізняється тим, що експресійна касета включає промотор, вибраний з групи, до якої відносяться CAG промотор, AAT промотор, LP1 промотор і EF1 промотор.

46A. ДНК-вектор за абзацом 41A, який відрізняється тим, що експресійна касета включає полінуклеотиди SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 і SEQ ID NO: 9.

47A. ДНК-вектор за будь-яким із абзаців 41A - 46A, який відрізняється тим, що експресійна касета включає екзогенну послідовність.

48A. ДНК-вектор за абзацом 47A, який відрізняється тим, що екзогенна послідовність включає принаймні 2000 нуклеотидів.

49A. ДНК-вектор за абзацом 47A, який відрізняється тим, що екзогенна послідовність кодує білок.

50A. ДНК-вектор за абзацом 47A, який відрізняється тим, що екзогенна послідовність кодує репортерний білок.

51A. Клітина, яка включає ДНК-вектор за будь-яким із абзаців 41A - 50A.

52A. Клітина за абзацом 52A, яка також включає білок реплікації, вибраний з групи, до якої відносяться: AAV Rep 78, AAV Rep 68, AAV Rep52 й AAV Rep 40.

53A. Клітина за абзацом 51A, яка відрізняється тим, що вищезгаданий білок реплікації кодується хелперним вірусом.

54A. Клітина за будь-яким із абзаців 51 - 53, яка відрізняється тим, що клітина є позбавленою гена,

який кодує капсидний білок AAV.

55A. Фармакологічно активний інгредієнт, який включає: ДНК-вектор за будь-яким із абзаців 1A - 10A; й, необов'язково, ексципієнт.

56A. Спосіб доставлення екзогенної послідовності у клітину, який включає етап: введення вищезгаданого неінкапсидованого ДНК-вектора за будь-яким із абзаців 1A - 10A у вищезгадану клітину.

57A. Спосіб за абзацом 16A, який відрізняється тим, що вищезгаданий етап введення ДНК-вектора включає гідродинамічну ін'єкцію.

58A. Спосіб приготування ДНК-вектора, який включає етапи:

введення у клітину нуклеїновокислотного конструкту або вірусу, що включає:

експресійну касету;

модифікований ITR на висхідному (5'-кінці) експресійної касети, причому модифікований ITR включає полінуклеотид SEQ ID NO: 52; і

ITR дикого типу на низхідному (3'-кінці) експресійної касети, причому ITR дикого типу включає полінуклеотид SEQ ID NO:1,

причому вищезгадана клітина є позбавленою капсидного білка AAV; і

збирання вищезгаданого ДНК-вектора, яка продукується з вищезгаданого нуклеїновокислотного конструкту або вищезгаданого вірусу,

причому вищезгаданий ДНК-вектор є позбавленим прокаріотно-специфічного метилування та не є інкапсидованим у капсидний білок AAV.

59A. Спосіб за абзацом 18A, який відрізняється тим, що експресійна касета включає цис-регуляторний елемент, причому цис-регуляторний елемент є вибраним із групи, до якої відносяться елемент посттранскрипційного відгуку та сигнал поліА.

60A. Спосіб за абзацом 59A, який відрізняється тим, що елемент посттранскрипційного відгуку включає елемент посттранскрипційного відгуку WHP (WPRE).

61A. Спосіб за будь-яким із абзаців 59A - 60A, який відрізняється тим, що сигнал поліА включає сигнал поліА BGH.

62A. Спосіб за будь-яким із абзаців 18A - 61A, який відрізняється тим, що експресійна касета включає промотор, вибраний з групи, до якої відносяться CAG промотор, AAT промотор, LP1 промотор і EF1 промотор.

63A. Спосіб за абзацом 18A, який відрізняється тим, що вищезгадана експресійна касета включає полінуклеотиди SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 і SEQ ID NO: 9.

64A. Спосіб за будь-яким із абзаців 18A - 63A, який відрізняється тим, що експресійна касета також включає екзогенну послідовність.

65A. Спосіб за абзацом 23A, який відрізняється тим, що екзогенна послідовність включає принаймні 2000 нуклеотидів.

66A. Спосіб за абзацом 23A, який відрізняється тим, що екзогенна послідовність кодує білок.

67A. Спосіб за абзацом 23A, який відрізняється тим, що екзогенна послідовність кодує репортерний білок.

68A. Спосіб за будь-яким із абзаців 18A - 26A, який відрізняється тим, що вищезгадана клітина є клітиною комахи.

69A. ДНК-вектор, який генерується способом за будь-яким із абзаців 18A - 27A.

70A. ДНК-вектор за абзацом 69A, який відрізняється тим, що ДНК-вектор має лінійну та безперервну структуру.

71A. Клітина для продукування ДНК-вектора, яка включає:

перший полінуклеотид, що включає:

експресійну касету;

модифікований ITR на висхідному (5'-кінці) експресійної касети, причому модифікований ITR включає полінуклеотид SEQ ID NO: 52; і

ITR дикого типу на низхідному (3'-кінці) експресійної касети, причому ITR дикого типу включає полінуклеотид SEQ ID NO:1; і

другий полінуклеотид, який кодує білок реплікації, вибраний з групи, до якої відносяться AAV78, AAV52, AAV Rep68 й AAV Rep 40,

причому вищезгадана клітина є позбавленою гена, який кодує капсидний білок AAV.

72A. Клітина за абзацом 71A, яка відрізняється тим, що вищезгадана клітина є клітиною комахи.

73A. ДНК-вектор, який продукується з клітини за будь-яким із абзаців 29A - 50A шляхом реплікації вищезгаданого першого полінуклеотиду.

74A. Полінуклеотид для генерації ДНК-вектора, який включає:

експресійну касету;

модифікований ITR на висхідному (5'-кінці) експресійної касети, причому модифікований ITR включає полінуклеотид SEQ ID NO: 52; і

ITR дикого типу на низхідному (3'-кінці) експресійної касети, причому ITR дикого типу включає полінуклеотид SEQ ID NO: 1.

75A. Полінуклеотид за абзацом 74A, який відрізняється тим, що полінуклеотид міститься у плазміді, у бакміді або у бакуловірусі.

76A. Полінуклеотид за будь-яким із абзаців 74A - 75A, який також включає екзогенну послідовність.
77A. Полінуклеотид за абзацом 74A, який відрізняється тим, що екзогенна послідовність включає принаймні 2000 нуклеотидів.

78A. Полінуклеотид за абзацом 74A, який відрізняється тим, що екзогенна послідовність кодує білок.

79A. Полінуклеотид за абзацом 74A, який відрізняється тим, що екзогенна послідовність кодує репортер.

80A. ДНК-вектор, який продукується шляхом реплікації полінуклеотиду за будь-яким із абзаців 33 - 39 білком реплікації, вибраним із групи, до якої відносяться AAV78, AAV52, AAV Rep68 й AAV Rep 40, причому ДНК-вектор є позбавленим прокаріотно-специфічного метилування та не є інкапсидованим у капсидний білок AAV.

81A. ДНК-вектор за абзацом 80A, який відрізняється тим, що ДНК-вектор продукується у клітині комах.

82A. Вектор зкДНК, який одержують з плазмиди, що включає послідовність ITR мутованого AAV за будь-якою з Таблиць 2 - 6 або Таблиць 7 - 10A або 10B.

У деяких варіантах втілення даний винахід може бути визначений у будь-якому з представлених нижче абзаців:

1B. ДНК-вектор, одержаний із застосуванням процесу, який включає:

трансфекцію першої популяції клітин комах першою рекомбінантною бакмідою, яку одержують шляхом перенесення першого конструкту плазмиди ДНК у вектор експресії бакуловірусу, причому побудова першого конструкту плазмиди ДНК відбувається послідовно у такому порядку в одному напрямку: сайт першого реплікативного білка (RPS-1), промотор, функціонально зв'язаний полінуклеотидною послідовністю репортера ORF, посттрансляційний та термінуючий сигнал і сайт другого реплікативного білка (RPS-2), причому RPS-1 і RPS-2 є незалежно внутрішньомолекулярно дуплексованими та ковалентно зв'язаними, і RPS-1 має одну або декілька делецій, заміщень або зрізів пар основ полінуклеотидів відносно RPS-2, з наступним збиранням з них першої популяції оброблених бакуловірусом клітин комах (B1C-1);

(б) трансфекцію другої популяції клітин комах другою рекомбінантною бакмідою, яку одержують шляхом перенесення другого конструкту плазмиди ДНК у другий вектор експресії бакуловірусу, причому другий конструкт плазмиди ДНК кодує білок, який зв'язується з принаймні одним із RPS-1 і RPS-2, з наступним збиранням з них другої популяції оброблених бакуловірусом клітин комах (B1C-2);

(в) комбінування B1C-1 і B1C-2 з третьою популяцією клітин комах у відносній кількості, яка забезпечує по суті рівну множинність зараження (MOI), з наступною інкубацією третьої популяції клітин комах, B1C-1 і B1C-2 в умовах росту клітин, при яких білок, який кодується другим конструктом плазмиди ДНК, реагує з сайтами RPS-1 і/або RPS-2 для викликання реплікації ДНК-вектора, який кодується першою плазмідною ДНК, доки не спостерігатиметься діаметр клітин комах приблизно 15-20 мікрометрів і життєздатність клітин приблизно 50 - 80 %, з наступним збиранням ДНК зі згустку клітин комах шляхом центрифугування;

(г) видобування ДНК зі згустку клітин комах для одержання ДНК, що продукується зі згустку клітин комах;

(д) розпізнавання ДНК, одержаної зі згустку клітин комах, на природному гелі у первинній смугі та вторинній смугі на відносній відстані одна від одної, яка вказує на те, що друга смуга представляє матеріал, який має приблизно вдвічі більшу вагу у порівнянні з матеріалом первинної смуги;

(е) підтвердження ДНК-вектора у ДНК, одержаний зі згустку клітин комах на денатурованому гелі шляхом зсуву первинної та вторинної смуги вгору в напрямку ділянки меншої ваги на гелі після розщеплення ДНК рестрикційною ендонуклеазою; та

(є) виділення решти ДНК-вектора, одержаного зі згустку клітин комах для одержання ДНК-вектора високої стійкості.

2B. ДНК-вектор за абзацом 1B, який відрізняється тим, що RPS-1 і RPS-2 є різними й є незалежно вибраними з пар полінуклеотидних послідовностей ДНК SEQ ID NO:

SEQ ID NO: 1 і SEQ ID NO: 52; або SEQ ID NO: 2 і SEQ ID NO: 51; або SEQ ID NO: 101 і SEQ ID NO: 102; або SEQ ID NO: 103 і SEQ ID NO: 104; або SEQ ID NO: 105 і SEQ ID NO: 106; або SEQ ID NO: 107 і SEQ ID NO: 108; або SEQ ID NO: 109 і SEQ ID NO: 110; або SEQ ID NO: 111 і SEQ ID NO: 112; або SEQ ID NO: 113 або SEQ ID NO: 114; і SEQ ID NO: 115 або SEQ ID NO: 116.

У деяких варіантах втілення даний винахід може бути визначений у будь-якому з представлених нижче абзаців:

1C. Безкапсидний вектор AAV (сfAAV), який включає:

експресійну касету, що включає цис-регуляторний елемент, промотор й екзогенну послідовність; та

дві самокомплементарні послідовності, які є фланкуючими відносно вищезгаданої експресійної касети,

причому вектор cfAAV не є асоційованим з капсидним білком й є позбавленим характерного для прокаріотів метилування.

2C. Вектор cfAAV за абзацом 1C, який відрізняється тим, що цис-регуляторні елементи є

вибраними з групи, до якої відносяться рибоперемікач, ізолятор, міг-індуцибельний елемент і посттранскрипційний регуляторний елемент.

3С. Вектор cfAAV за будь-яким із абзаців 1С - 2С, який відрізняється тим, що ДНК-вектор являє собою CELiD.

4С. Вектор cfAAV за будь-яким із абзаців 1С - 3С, який відрізняється тим, що дві самокомплементарні послідовності є послідовностями ITR AAV2.

5С. Вектор cfAAV за будь-яким із абзаців 1С - 4С, який відрізняється тим, що екзогенна послідовність включає внутрішню ділянку посадки рибосоми (IRES) та 2А елемент.

6С. Вектор cfAAV за абзацом 5С, який відрізняється тим, що експресійна касета включає послідовність, яка кодує більше одного білка.

7С. Вектор cfAAV за будь-яким із абзаців 1С - 6С, який відрізняється тим, що експресійна касета включає понад 4000 нуклеотидів, 5000 нуклеотидів, 10 000 нуклеотидів або 20 000 нуклеотидів.

8С. Фармакологічна композиція, яка включає вектор cfAAV за будь-яким із абзаців 1С - 7С.

9С. Експресійний конструкт, який включає:

експресійну касету, що включає цис-регуляторний елемент, промотор й екзогенну послідовність; та дві послідовності інвертованих кінцевих повторів (ITR), які є фланкуючими відносно вищезгаданої експресійної касети,

причому експресійний конструкт є позбавленим відкритої рамки зчитування, яка кодує капсидний білок.

10С. Експресійний конструкт за абзацом 9С, який відрізняється тим, що цис-регуляторні елементи є вибраними з групи, до якої відносяться рибоперемікач, ізолятор, міг-індуцибельний елемент і посттранскрипційний регуляторний елемент.

11С. Експресійна касета за будь-яким із абзаців 9С - 10С, яка відрізняється тим, що екзогенна послідовність включає внутрішню ділянку посадки рибосоми (IRES) та 2А елемент.

12С. Експресійна касета за абзацом 11, яка відрізняється тим, що експресійна касета включає послідовність, яка кодує більше одного білка.

13С. Експресійний конструкт за будь-яким із абзаців 9С - 12С, який відрізняється тим, що експресійний конструкт міститься у плазміді, бакміді або бакуловірусі.

14С. Спосіб генерації вектора cfAAV, який включає:

введення експресійного конструкту за будь-яким із абзаців 9С - 13С у клітину; та

збирання вектора cfAAV, генерованого шляхом реплікації експресійного конструкту.

15С. Спосіб за абзацом 14С, який також включає етап багаторазової реплікації експресійного конструкту перед введенням експресійного конструкту в клітину.

16С. Спосіб за абзацом 15С, який відрізняється тим, що експресійний конструкт міститься у плазміді, й етап реплікації здійснюють в *E. coli*.

17С. Спосіб за абзацом 16С, який також включає етап перенесення експресійного конструкту з плазміді до бакміди перед введенням експресійного конструкту в клітину.

18С. Спосіб за абзацом 17С, який також включає етап перенесення експресійного конструкту з бакміди до бакуловірусу перед введенням експресійного конструкту в клітину.

19С. Спосіб за будь-яким із абзаців 14С - 18С, який також включає етап введення Rep-білка у клітину.

20С. Спосіб за будь-яким із абзаців 14С - 19С, який відрізняється тим, що клітина є клітиною комах.

21С. Вектор cfAAV, який продукують шляхом способу за будь-яким із абзаців 14С - 20С.

22С. Вектор cfAAV за абзацом 21С, який відрізняється тим, що ДНК-вектор являє собою CELiD.

У деяких варіантах втілення даний винахід може бути визначений у будь-якому з представлених нижче абзаців:

1D. Безкапсидний, невірусний ДНК-вектор, одержаний з векторного полінуклеотиду, причому векторний полінуклеотид кодує гетерологічну нуклеїнову кислоту, функціонально розташовану між першою та другою полінуклеотидними послідовностями ДНК інвертованих кінцевих повторів (ITR) AAV2, причому принаймні один із ITR має принаймні одну полінуклеотидну делецію, вставку або заміщення відносно відповідного ITR AAV2 дикого типу SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 51 для викликання реплікації ДНК-вектора у клітині комах у присутності Rep-білка, причому ДНК-вектор одержують із застосуванням процесу, який включає етапи:

а. інкубації популяції клітин комах, що містять векторний полінуклеотид, який є позбавленим кодуєчих послідовностей вірусного капсиду, у присутності Rep-білка, в умовах, ефективних, і протягом часу, достатнього для викликання продукування безкапсидної, невірусної ДНК у клітинах комах, причому клітини комах не включають кодуєчих послідовностей вірусного капсиду; та

б. збирання та виділення безкапсидної, невірусної ДНК з клітин комах;

причому присутність безкапсидної, невірусної ДНК, виділеної з клітин комах, може бути підтверджена шляхом розщеплення ДНК, виділеної з клітин комах, рестрикційним ферментом, що має єдину ділянку розпізнавання на ДНК-векторі, й аналізу матеріалу розщепленої ДНК на неденатуруючому гелі для підтвердження наявності характерних смуг лінійної та безперервної ДНК у порівнянні з лінійною та переривчастою ДНК.

2D. Безкапсидний, невірусний ДНК-вектор за абзацом 1, який відрізняється тим, що мутований ITR

є вибраним із групи, до якої відносяться: SEQ ID NO: 2 і SEQ ID NO: 52.

3D. Безкапсидний, невірусний ДНК-вектор за абзацом 1, який відрізняється тим, що векторний полінуклеотид включає пару ITR, вибраних із групи, до якої відносяться: SEQ ID NO: 1 і SEQ ID NO: 52; і SEQ ID NO: 2 і SEQ ID NO: 51.

4D. Безкапсидний, невірусний ДНК-вектор, одержаний з векторного полінуклеотиду, причому векторний полінуклеотид кодує гетерологічну нуклеїнову кислоту, функціонально розташовану між двома різними послідовностями інвертованих кінцевих повторів (ITR), принаймні один із ITR є функціональним ITR, який включає функціональний сайт кінцевого розділення та сайт зв'язування Rep, й один із ITR включає делецію, вставку або заміщення відносно функціонального ITR; присутність Rep-білка, який викликає реплікацію векторного полінуклеотиду та продукування ДНК-вектора у клітині комах, причому ДНК-вектор одержують із застосуванням процесу, який включає етапи:

інкубації популяції клітин комах, що містять векторний полінуклеотид, який є позбавленим кодуючих послідовностей вірусного капсиду у присутності Rep-білка в умовах, ефективних, і протягом часу, достатнього для викликання продукування безкапсидної, невірусної ДНК-вектор у клітинах комах, причому клітини комах не включають продукування безкапсидної, невірусної ДНК у клітинах комах; і

б. збирання та виділення безкапсидної, невірусної ДНК з клітин комах;

причому присутність безкапсидної, невірусної ДНК, виділеної з клітин комах, може бути підтверджена шляхом розщеплення ДНК, виділеної з клітин комах, рестрикційним ферментом, що має єдину ділянку розпізнавання на ДНК-векторі, й аналізу матеріалу розщепленої ДНК на неденатуруючому гелі для підтвердження наявності характерних смуг лінійної та безперервної ДНК у порівнянні з лінійною та переривчастою ДНК.

У деяких варіантах втілення даний винахід може бути визначений у будь-якому з представлених нижче абзаців:

1E. Вектор, який включає (i) невірусний безкапсидний ДНК-вектор із ковалентно закритими кінцями (вектор зкДНК), причому вектор зкДНК включає гетерологічну нуклеїновокислотну послідовність, яка кодує трансген, функціонально розташований між двома різними AAV послідовностями інвертованих кінцевих повторів (ITR), причому один із ITR включає сайт кінцевого розділення функціонального AAV і сайт зв'язування Rep, причому один із ITR включає делецію, вставку або заміщення відносно іншого ITR (модифікований ITR), причому вектор не є вірусним капсидом.

2E. Вектор зкДНК за абзацом 1, який відрізняється тим, що вектор зкДНК при розщепленні рестрикційним ферментом, що має єдину ділянку розпізнавання на векторі зкДНК, має наявні характерні смуги лінійної та безперервної ДНК у порівнянні з лінійними та переривчастими контрольними ДНК при аналізі на неденатуруючому гелі.

3E. Вектор зкДНК за абзацом 1E, який відрізняється тим, що модифікований ITR відноситься до іншого сіротипу.

4E. Вектор зкДНК за абзацом 3E, який відрізняється тим, що модифікований ITR не є ITR дикого типу.

5E. Вектор зкДНК за абзацом 1E, який відрізняється тим, що делеція, вставка або заміщення відбувається у принаймні одній з ділянок ITR, вибраних із групи, яка складається з A, A', B, B', C, C' і D.

6E. Вектор зкДНК за абзацом 5E, який відрізняється тим, що делеція, вставка або заміщення в результаті призведе до делеції однієї з петель, утворених ділянками A, A', B, B' C або C'.

7E. Вектор зкДНК за абзацом 1E, який відрізняється тим, що модифікація відповідає зміні у модифікованому ITR AAV2, вибраному з групи, до якої відносяться SEQ ID NO: 101 - 498 і 499 або 545 - 547.

8E. Вектор зкДНК за абзацом 1E, який відрізняється тим, що модифікація відповідає зміні у модифікованому ITR AAV2, вибраному з групи, до якої відносяться SEQ ID NOS. 2, 52, 63 і 64.

9E. Вектор зкДНК за абзацами 1E-8E, який відрізняється тим, що вектор міститься у наноносії.

10E. Вектор зкДНК за абзацом 9E, який відрізняється тим, що наноносій включає ліпідну наночастинку (LNP).

11E. Спосіб, який включає:

продукування невірусної безкапсидної ДНК з ковалентно закритими кінцями (зкДНК) шляхом застосування векторного полінуклеотиду, причому векторний полінуклеотид кодує гетерологічну нуклеїнову кислоту, функціонально розташовану між двома різними послідовностями інвертованих кінцевих повторів (ITR), причому принаймні один із ITR включає функціональний сайт кінцевого розділення та сайт зв'язування Rep, й один із ITR включає делецію, вставку або заміщення, відносно іншого ITR; присутність Rep-білка, який викликає реплікацію векторного полінуклеотиду та продукування ДНК-вектора у клітині комах, причому ДНК-вектор одержують із застосуванням процесу, який включає етапи:

інкубації популяції клітин комах, що містять векторний полінуклеотид, який є позбавленим кодуючих послідовностей вірусного капсиду у присутності Rep-білка в умовах, ефективних, і протягом часу, достатнього для викликання продукування безкапсидної, невірусної ДНК-вектор у клітинах комах, причому клітини комах не включають продукування безкапсидної, невірусної ДНК у клітинах комах; і

б. збирання та виділення безкапсидної, невірусної ДНК з клітин комах;

причому присутність безкапсидної, невірусної ДНК, виділеної з клітин комах, може бути підтверджена шляхом розщеплення ДНК, виділеної з клітин комах, рестрикційним ферментом, що має єдину ділянку розпізнавання на ДНК-векторі, й аналізу матеріалу розщепленої ДНК на неденатуруючому гелі для підтвердження наявності характерних смуг лінійної та безперервної ДНК у порівнянні з лінійною та переривчастою ДНК.

12Е. Безкапсидний, невірусний ДНК-вектор, одержаний з векторного полінуклеотиду, причому вектор кодує гетерологічний ген, функціонально розташований між першою та другою полінуклеотидними послідовностями ДНК інвертованих кінцевих повторів (ITR) AAV2, причому принаймні один із ITR має принаймні одну полінуклеотидну делецію, вставку або заміщення відносно відповідного ITR AAV2 дикого типу SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 51 для викликання реплікації ДНК-вектора у клітині комах у присутності Rep-білка, причому ДНК-вектор одержують із застосуванням процесу, який включає етапи:

інкубації популяції клітин комах, що містять векторний полінуклеотид, який є позбавленим кодуючих послідовностей вірусного капсиду, у присутності Rep-білка, в умовах, ефективних, і протягом часу, достатнього для викликання продукування безкапсидної, невірусної ДНК у клітинах комах, причому клітини комах не включають кодуючих послідовностей вірусного капсиду; та

(б) збирання та виділення безкапсидної, невірусної ДНК з клітин комах;

причому присутність безкапсидної, невірусної ДНК, виділеної з клітин комах, може бути підтверджена шляхом розщеплення ДНК, виділеної з клітин комах, рестрикційним ферментом, що має єдину ділянку розпізнавання на ДНК-векторі, й аналізу матеріалу розщепленої ДНК на неденатуруючому гелі для підтвердження наявності характерних смуг лінійної та безперервної ДНК у порівнянні з лінійною та переривчастою ДНК.

13Е. Безкапсидний, невірусний ДНК-вектор за абзацом 12Е, причому модифікований ITR є вибраним із групи, до якої відносяться: SEQ ID NO: 2 і SEQ ID NO: 52.

14Е. Безкапсидний, невірусний ДНК-вектор за абзацом 12Е, причому векторний полінуклеотид включає пару ITR, вибраних із групи, до якої відносяться: SEQ ID NO: 1 і SEQ ID NO: 52; SEQ ID NO: 2 і SEQ ID NO: 51.

15Е. Безкапсидний, невірусний ДНК-вектор, одержаний з векторного полінуклеотиду, причому векторний полінуклеотид кодує гетерологічний ген, функціонально розташований між двома різними послідовностями інвертованих кінцевих повторів (ITR), причому принаймні один із ITR включає функціональний сайт кінцевого розділення та сайт зв'язування Rep, й один із ITR включає делецію, вставку або заміщення, присутність Rep-білка, який викликає реплікацію векторного полінуклеотиду та продукування ДНК-вектора у клітині комах, причому ДНК-вектор одержують із застосуванням процесу, який включає етапи:

інкубації популяції клітин комах, що містять векторний полінуклеотид, який є позбавленим кодуючих послідовностей вірусного капсиду у присутності Rep-білка в умовах, ефективних, і протягом часу, достатнього для викликання продукування безкапсидної, невірусної ДНК-вектор у клітинах комах, причому клітини комах не включають продукування безкапсидної, невірусної ДНК у клітинах комах; і

(б) збирання та виділення безкапсидної, невірусної ДНК з клітин комах;

причому присутність безкапсидної, невірусної ДНК, виділеної з клітин комах, може бути підтверджена шляхом розщеплення ДНК, виділеної з клітин комах, рестрикційним ферментом, що має єдину ділянку розпізнавання на ДНК-векторі, й аналізу матеріалу розщепленої ДНК на неденатуруючому гелі для підтвердження наявності характерних смуг лінійної та безперервної ДНК у порівнянні з лінійною та переривчастою ДНК.

17Е. Безкапсидний, невірусний ДНК-вектор за абзацом 15Е, який відрізняється тим, що один ITR являє собою ITR AAV дикого типу.

18Е. Спосіб лікування хвороби у суб'єкта, причому спосіб включає:

спільне введення суб'єкту, що має в цьому потребу, композиції, яка включає (і) невірусний безкапсидний ДНК-вектор із ковалентно закритими кінцями (вектор зкДНК), причому вектор зкДНК включає гетерологічну нуклеїновокислотну послідовність, яка кодує трансген, функціонально розташований між двома різними AAV послідовностями інвертованих кінцевих повторів (ITR), причому один із ITR включає сайт кінцевого розділення функціонального AAV та сайт зв'язування Rep, причому один із ITR включає делецію, вставку або заміщення відносно іншого ITR.

19Е. Спосіб за абзацом 17Е, причому вектор зкДНК вводять в комбінації з фармацевтично прийнятним носієм.

20Е. Спосіб доставлення терапевтичного засобу суб'єкту, причому спосіб включає:

введення суб'єкту композиції, яка включає вектор зкДНК за абзацами 1Е - 10Е і 12Е - 16Е.

Приклади

Представлені далі приклади призначаються для пояснення та не обмежують обсяг винаходу.

Приклад 1: Побудова векторів зкДНК

Описується продукування векторів зкДНК із застосуванням матриці полінуклеотидного конструкту. Наприклад, матриця полінуклеотидного конструкту, яку застосовують для генерації векторів зкДНК згідно з даним винаходом, може бути зкДНК-плазмідною, зкДНК-бакмідною та/або зкДНК-бакуловірусом. Без обмеження будь-якою теорією, у допустимій клітині-хазяїні, наприклад, у присутності Rep,

матриця полінуклеотидного конструкту, що має два ITR й експресійний конструкт, де принаймні один із ITR є модифікованим, реплікується для продукування векторів зкДНК. Продукування вектора зкДНК включає два етапи: перший – ексцизія ("рятування") матриці з кістяка матриці (наприклад, зкДНК-плазмідного, зкДНК-бакмідного, зкДНК-бакуловірусного геному та т. ін.) через Rep-білки та другий – Rep-опосередкована реплікація ексцизованого вектора зкДНК.

Типовий спосіб продукування векторів зкДНК – одержання із зкДНК-плазмід, як описується авторами. Як показано на Фіг. 1A та 1B, матриця полінуклеотидного конструкту кожної із зкДНК-плазмід включає як лівий ITR, так і правий мутований ITR з такими структурами між послідовностями ITR: (i) енхансером/промотором; (ii) сайтом клонування для трансгена; (iii) елементом посттранскрипційного відгуку (наприклад, посттранскрипційним регуляторним елементом вірусу гепатиту бабаків (WPRE)); та (iv) сигналом поліаденілування (наприклад, з гена гормону росту великої рогатої худоби (BGHPA)). Унікальні ділянки розпізнавання рестрикційної ендонуклеази (R1-R6) (показані на Фіг. 1A та 1B) також вставляли між кожним компонентом для сприяння включенню нових генетичних компонентів у конкретні сайти конструкту. Сайти ферментів R3 (PmeI) GTTTAAAC (SEQ ID NO: 7) і R4 (PacI) TTAATTAA (SEQ ID NO: 542) включають шляхом інженерії у сайт клонування для введення відкритої рамки зчитування трансгена. Ці послідовності клонували у плазмиду pFastBac HT B, яку одержували від ThermoFisher Scientific.

У загальних рисах, низку векторів зкДНК одержували з конструктів зкДНК-плазмід, показаних у Таблиці 12, із застосуванням процесу, показаного на ФІГУРАХ 4A - 4C. Таблиця 12 показує номер відповідної полінуклеотидної послідовності для кожного компонента, включаючи послідовності, активні як сайт білка реплікації (RPS) (наприклад, сайт зв'язування Rep) на будь-якому кінці промотора, функціонально зв'язаного з трансгеном. Номери у Таблиці 12 стосуються SEQ ID NO у цьому документі, які відповідають послідовностям кожного компонента.

Таблиця 12

Типові конструкти зкДНК

Плазміда	ITR-L	Промотор	Трансген	ITR -R
Конструкт-1	51	3	Люцифераза	2
Конструкт-2	52	3	Люцифераза	1
Конструкт-3	51	4 w/SV40 intr	Люцифераза	2
Конструкт-4	52	4 w/SV40 intr	Люцифераза	1
Конструкт-5	51	5 w/SV40 intr	Люцифераза	2
Конструкт-6	52	5 w/SV40 intr	Люцифераза	1
Конструкт-7	51	6	Люцифераза	2
Конструкт-8	52	6	Люцифераза	1

У деяких варіантах втілення конструкт для утворення векторів зкДНК включає промотор, який є регулюючим перемикачем, як описується авторами, наприклад, індукційним промотором. Інші конструкти застосовували для утворення векторів зкДНК, наприклад, конструкт 10, конструкт 11, конструкт 12 і конструкт 13 (див., наприклад, Таблицю 14A), які включають промотор MND або HLCR, функціонально зв'язаний з трансгеном люциферази.

Продукування зкДНК-бакмід:

Як показано на Фіг. 4A, DH10Bac-компетентні клітини (MAX EFFICIENCY® DH10Bac™ Competent Cells, Thermo Fisher) трансформували випробувальними або контрольними плазмідами з дотриманням протоколу згідно з інструкціями виробника. Рекомбінацію між плазмідним і бакуловірусним човниковим вектором у клітинах DH10Bac викликали для генерації рекомбінантних зкДНК-бакмід. Рекомбінантні бакміди відбирали шляхом скринінгу позитивного відбору на основі синьо-білого скринінгу в *E. coli* (маркер Ф80dlacZΔM15 забезпечує α-комплементацию гена β-галактозидази з бакмідного вектора) на планшеті з бактеріальним агаром, який містив X-gal й IPTG з антибіотиками, для відбору трансформантів і підтримання бакміди та плазмід транспозази. Білі колонії, викликані транспозицією, яка розриває індикаторний ген β-галактозиду, збирали та культивували у 10 мл середовища.

Рекомбінантні зкДНК-бакміди виділяли з *E. coli* та трансфікували у клітини комах Sf9 або Sf21 із застосуванням FugeneHD для утворення інфекційного бакуловірусу. Адгезивні клітини комах Sf9 або Sf21 культивували у 50 мл середовища у колбах T25 при 25 °C. Через чотири дні культуральне середовище (яке містило вірус P0) видаляли з клітин, фільтрували крізь фільтр 0,45 мкм, відокремлюючи частинки інфекційного бакуловірусу з клітин або клітинного дебрису.

Необов'язково першу генерацію бакуловірусу (P0) ампліфікували шляхом інфікування наївних клітин комах Sf9 або Sf21 у 50 - 500 мл середовища. Клітини тримали у суспензійних культурах в інкубаторі з орбітальним шейкером при 130 об/хв при 25 °C, з відстеженням діаметра та життєздатності клітин, доки клітини не досягали діаметра 18 - 19 нм (у порівнянні з діаметром наївних клітин 14 - 15 нм), і густини ~4,0E+6 клітин/мл. Через 3 - 8 днів після інфікування частинки бакуловірусу P1 у середовищі збирали після центрифугування для видалення клітин і

дебрису з наступною фільтрацією крізь фільтр 0,45 мкм.

ЗкДНК-бакуловірус, що містить тестові конструкти, збирали та визначали інфекційну активність або титр бакувовірусу. Зокрема, чотири х 20 мл культури клітин Sf9 при $2,5 \times 10^6$ клітин/мл обробляли бакувовірусом P1 з такими розведеннями: 1/1000, 1/10 000, 1/50 000, 1/100 000, й інкубували при 25 - 27 °C. Інфекційність визначали за показником збільшення діаметра клітин й арешту клітинного циклу, а також зміною життєздатності клітин щодня протягом 4 - 5 днів.

Як показано на Фіг. 4A, "Rep-плазмиду" згідно з Фіг. 8A продукували у векторі експресії pFASTBACTM-Dual (ThermoFisher), який включав Rep78 (SEQ ID NO: 13) або Rep68 (SEQ ID NO: 12) і Rep52 (SEQ ID NO: 14) або Rep40 (SEQ ID NO: 11).

Rep-плазмиду трансформували у DH10Bac-компетентні клітини (MAX EFFICIENCY® DH10Bac™ Competent Cells (Thermo Fisher) згідно з протоколом, наданим виробником. Рекомбінацію між Rep-плазмидою та човниковим вектором бакувовірусу у клітинах DH10Bac викликали для утворення рекомбінантних бакмід ("Rep-бакмід"). Рекомбінантні бакміди відбирали шляхом позитивного відбору, який включав синьо-білий скринінг в E. coli (маркер Ф80dlacZΔM15 забезпечує α-комплементацію гена β-галактозидази з бакмідного вектора) на планшеті з бактеріальним агаром, який містив X-gal й IPTG. Виділені білі колонії збирали й інокулювали у 10 мл селекційного середовища (канаміцину, гентаміцину, тетрацикліну у бульйоні LB). Рекомбінантні бакміди (Rep-бакміди) виділяли з E. coli та Rep-бакміди трансфікували у клітини комах Sf9 або Sf21 для утворення інфекційного бакувовірусу.

Клітини комах Sf9 або Sf21 культивували у 50 мл середовища протягом 4 днів й інфекційний рекомбінантний бакувовірус ("Rep-бакувовірус") виділяли з культури. Необов'язково першу генерацію Rep-бакувовірусу (P0) ампліфікували шляхом інфікування наївних клітин комах Sf9 або Sf21 і культивували у 50 - 500 мл середовища. Через 3-8 днів після інфікування частинки бакувовірусу P1 у середовищі збирали шляхом сепарації клітин за допомогою центрифугування або шляхом фільтрації або із застосуванням іншого процесу фракціонування. Rep-бакувовірус збирали та визначали інфекційну активність бакувовірусу. Зокрема, чотири х 20 мл культури клітин Sf9 при $2,5 \times 10^6$ клітин/мл обробляли бакувовірусом P1 з розведеннями, 1/1000, 1/10 000, 1/50 000, 1/100 000 й інкубували. Інфекційність визначали за показником збільшення діаметра клітин й арешту клітинного циклу, а також зміною життєздатності клітин щодня протягом 4-5 днів.

Генерація та характеристика вектора зкДНК

Як показано на Фіг. 4B, Sf9 культуральне середовище для клітин комах, яке містило (1) зразок, що містив зкДНК-бакмиду або зкДНК-бакувовірус, й (2) описаний вище Rep-бакувовірус, після цього додавали до свіжої культури клітин Sf9 ($2,5 \times 10^6$ клітин/мл, 20 мл) у співвідношенні 1:1000 і 1:10 000, відповідно. Після цього клітини культивували при 130 об/хв при 25 °C. Через 4 - 5 днів після коінфекції визначали діаметр і життєздатність клітин. Коли діаметр клітин досягав 18 - 20 нм при життєздатності ~70-80%, культури клітин центрифугували, середовище видаляли та збирали згустки клітин. Згустки клітин спочатку ресуспендують у достатньому об'ємі водного середовища, води або буфера. Вектор зкДНК виділяли й очищували з клітин із застосуванням протоколу очищення Qiagen MIDI PLUS™ (Qiagen, на кожен колонку обробляли масу згустку клітин 0,2 мг).

Вихід векторів зкДНК, які продукуються й очищуються з клітин комах Sf9 початково визначали на основі УФ-поглинання при 260 нм. Вихід різних векторів зкДНК, який визначали на основі УФ-поглинання, представлений нижче у Таблиці 13.

Таблиця 13

Вихід векторів зкДНК з типових конструктів

Конструкт	Об'єм культури	Параметри культури (діаметр у мікрометрах)	Вихід (мг/л)	Розрахунковий вихід (пг/клітину)
конструкт-1	2x1л	Загалом: $6,02 \times 10^6$ Життєздатність: 53,3 % Діаметр: 18,4	15,8	5,23

Вектори зкДНК оцінюють та розпізнають шляхом електрофорезу на агарозному гелі у природних або денатуруючих умовах, як показано на Фіг. 4D, де (а) присутність характеристичних смуг, які мігрують вдвічі більше на денатуруючих гелях у порівнянні з природними гелями після розщеплення рестрикційною ендонуклеазою й аналізу шляхом гель-електрофорезу, та (б) присутність мономерних і димерних (2х) смуг на денатуруючих гелях для нерозщепленого матеріалу є характерним для присутності вектора зкДНК.

Структури виділених векторів зкДНК надавали подальшому аналізу шляхом розщеплення ДНК, одержаної з коінфікованих клітин Sf9 (як описується авторами), рестрикційними ендонуклеазами, які відбирали на а) присутність лише одного сайту різання в межах векторів зкДНК й б) утворені в результаті фрагменти достатньо великого розміру для того, щоб бути видимими при фракціонуванні на 0,8% денатуруючому агарозному гелі (>800 п.о.). Як показано на Фіг. 4E, лінійні ДНК-вектори з переривчастою структурою та вектор зкДНК з лінійною та безперервною структурою розрізняються за

розмірами продуктів їх реакції – наприклад, очікується, що ДНК-вектор із переривчастою структурою має утворювати фрагменти з 1 т.п.н. і 2 т.п.н., тоді як неінкапсидований вектор із безперервною структурою має утворювати фрагменти з 2 т.п.н. і 4 т.п.н..

Таким чином, для того, щоб кількісно продемонструвати, що виділені вектори зкДНК мають ковалентно закриті кінці, як вимагається згідно з визначенням, зразки розщеплюють рестрикційною ендонуклеазою, розпізнаною в контексті конкретної послідовності ДНК-вектора як така, що має єдиний сайт рестрикції, в оптимальному варіанті з одержанням в результаті двох продуктів розщеплення різних розмірів (наприклад, 1000 п.о. та 2000 п.о.). Після розщеплення й електрофорезу на денатуруючому гелі (який розділяє два комплементарні ланцюги ДНК), лінійна, нековалентно закрита ДНК розкладається на розміри 1000 п.о. та 2000 п.о., тоді як ковалентно закрита ДНК (тобто, вектор зкДНК) розкладається на вдвічі більші розміри (2000 п.о. та 4000 п.о.), оскільки два ланцюги ДНК є зв'язаними і тепер розгортаються та мають вдвічі більшу довжину (хоча є одноланцюговими). Крім того, розщеплення мономерних, димерних і n-мерних форм ДНК-векторів розкладається на фрагменти однакового розміру через стикування мультимерних ДНК-векторів (див. Фіг. 4D).

Фіг. 5 представляє типову картину денатуруючого гелю з такими векторами зкДНК: конструкт-1, конструкт-2, конструкт-3, конструкт-4, конструкт-5, конструкт-6, конструкт-7 і конструкт-8 (усі описуються вище у Таблиці 12), з розщепленням (+) або без (-) розщеплення ендонуклеазою. Кожний вектор зкДНК від конструктів-1 до конструкту-8 утворював дві смуги (*) після ендонуклеазної реакції. Розміри двох їхніх смуг, визначені на основі маркера розмірів, представлені у нижній частині фігури. Розміри смуг підтверджують, що кожний з векторів зкДНК, утворених із плазмід, які включають від конструкту-1 до конструкту-8, має безперервну структуру.

У контексті цього опису фраза "аналіз для ідентифікації ДНК-векторів шляхом електрофорезу на агарозному гелі у природних гелевих і денатуруючих умовах" стосується аналізу для оцінки закритого кінця зкДНК шляхом виконання розщеплення рестрикційною ендонуклеазою з наступною електрофоретичною оцінкою продуктів розщеплення. Нижче описується один такий типовий аналіз, хоча фахівцю у даній галузі стане зрозуміло, що існує можливість багатьох відомих фахівцям у даній галузі варіантів цього прикладу. Рестрикційну ендонуклеазу вибирають як фермент із одним місцем різання для потрібного вектора зкДНК, що утворює продукти, які складають приблизно 1/3х і 2/3х довжини ДНК-вектора. Це розкладає смуги на природних і денатуруючих гелях. Перед денатурацією важливо видалити буфер зі зразка. Комплект для ПЛР-очищення від Qiagen або демінералізуючі "спін-колонки", наприклад, колонки GE HEALTHCARE ILUSTRA™ MICROSPIN™ G-25 є прикладами відомих фахівцям у даній галузі засобами розщеплення ендонуклеази. Аналіз включає, наприклад, i) розщеплення ДНК відповідною(ими) рестрикційною(ими) ендонуклеазою(ами), 2) застосування, наприклад, комплекту для ПЛР-очищення Qiagen, елюювання з дистильованою водою, iii) додавання 10х денатуруючого розчину (10х = 0,5 М NaOH, 10 мМ EDTA), додавання 10Х барвника, небуферованого, й аналіз, разом з маркерами довжини ДНК, приготовленими шляхом додавання 10х денатуруючого розчину до 4х, на 0,8 – 1,0% гелі, попередньо інкубованому з 1 мМ EDTA та 200 мМ NaOH для забезпечення рівномірної концентрації NaOH у гелі та камері для електрофорезу, та прогін гелю у присутності 1х денатуруючого розчину (50 мМ NaOH, 1 мМ EDTA). Фахівцю у даній галузі стане зрозуміло, яку напругу слід застосовувати для здійснення електрофорезу, залежно від розміру та потрібного часу отримання результатів. Після електрофорезу гелі зливають та нейтралізують в 1х TBE або TAE та переносять у дистильовану воду або 1х TBE/TAE з 1х SYBR Gold. Після цього смуги візуалізують із застосуванням, наприклад, Thermo Fisher, SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (10 000X Concentrate in DMSO) й епіфлуоресцентного світла (синього) або УФ (312 нм).

Чистоту генерованого вектора зкДНК оцінюють із застосування будь-якого відомого фахівцям у даній галузі способу. Як один типовий та необмежувальний спосіб, внесок зкДНК-плазмиди у загальне УФ-поглинання зразка оцінюють шляхом порівняння флуоресцентної інтенсивності вектора зкДНК зі стандартом. Наприклад, якщо на основі УФ-поглинання 4 мкг вектора зкДНК було завантажено на гель, та флуоресцентна інтенсивність вектора зкДНК є еквівалентною смузі 2 т.п.н., що, як відомо, складає 1 мкг, значить, є 1 мкг вектора зкДНК, і вектор зкДНК складає 25% від загального УФ-поглинаючого матеріалу. Після цього визначають залежність інтенсивності смуги на гелі від розрахункового вхідного значення, яке представляє смугу – наприклад, якщо загальний вектор зкДНК складає 8 т.п.н., а вирізана порівняльна смуга складає 2 т.п.н., інтенсивність смуги у такому випадку визначається як 25% від загального вхідного значення, яке у цьому випадку має складати 0,25 мкг для вхідного значення 1,0 мкг. Застосовуючи титрування векторної плазмиди зкДНК для побудови стандартної кривої, потім використовують рівняння лінії регресії для розрахунку кількості смуги вектора зкДНК, яку потім використовують для визначення відсотка загального входу, представленого вектором зкДНК, або відсотка чистоти.

Приклад 2: продукування вірусної ДНК у клітинах зкДНК

Вектори зкДНК також генерували з конструктів 11, 12, 13 і 14, показаних у Таблиці 14А. ЗкДНК-плазмиди, які включають конструкти 11-14, генерували способами молекулярного клонування, добре відомими фахівцям у даній галузі. Плазмиди у Таблиці 14А будували з WPRE, що включає SEQ ID NO: 8, потім із BGHrA, що включає SEQ ID NO: 9 у 3' нетрансльованій ділянці між трансгеном і правим ITR.

Таблиця 14А

Плазміда	ITR-L	Промотор	Трансген	ITR-R
Конструкт 11	(SEQ ID NO: 63)	(SEQ ID NO: 70)	Люцифераза (SEQ ID NO: 71)	(SEQ ID NO: 1)
Конструкт 12	(SEQ ID NO: 51)	(SEQ ID NO: 70)	Люцифераза (SEQ ID NO: 71)	(SEQ ID NO: 64)
Конструкт 13	(SEQ ID NO: 63)	(SEQ ID NO: 74)	Люцифераза (SEQ ID NO: 71)	(SEQ ID NO: 1)
Конструкт 14	(SEQ ID NO: 51)	(SEQ ID NO: 74)	Люцифераза (SEQ ID NO: 71)	(SEQ ID NO: 64)

Вектор кістяка для конструктів 11-14 є таким: (i) asymITR –MND –люцифераза -wPRE-BGH-PolyA-ITR у pFB-HTb (конструкт 11), (ii) ITR –MND –люцифераза –wPRE -BGH-PolyA–asymITR у pFB-HTb (конструкт 12), (iii) asymITR –HLCR-AAT-luc-wPRE(O)-BGH-PolyA-ITR у pFB-HTb (конструкт 13); й ITR –HLCR-AAT-luc-wPRE(O)-BGH-PolyA-asymITR у pFB-HTb (конструкт 14), причому кожний конструкт має принаймні один асиметричний ITR відносно іншого. Ці конструкти також включають одну або декілька таких послідовностей: wPRE0 (SEQ ID NO: 72) і послідовність BGH-PolyA (SEQ ID NO: 73), або послідовності, що мають принаймні 85% або принаймні 90% або принаймні 95% ідентичності послідовності з ними.

Після цього виконували продукування вектора зкДНК згідно з процедурою з Фіг. 4А-4С, наприклад, (а) Генерацію рекомбінантної ДНК зкДНК-бакміди та трансфекцію клітини комахи рекомбінантною ДНК зкДНК-бакміди; (б) генерацію культури Р1 (низький титр), культури Р2 (високий титр) і визначення титру вірусу шляхом кількісної ПЛР для отримання кінцевого результату 5 мл, >1Е+7 бляшкоутворюючих або інфекційних одиниць "pfu" на мл культури BV, культури BV COA. Виділення вектора зкДНК виконували шляхом коінфекції 50 мл клітин комах культурою BV для таких пар інфекцій: Рер-бакміда, як розкривається авторами, та принаймні один із таких конструктів: конструкт 11, конструкт 12, конструкт 13 і конструкт 14. Виділення вектора зкДНК виконували, застосовуючи комплект QIAGEN Plasmid Midi Kit для одержання очищеного матеріалу ДНК для подальшого аналізу. Таблиця 14В та Таблиця 14С показують вихід (як визначено OD) вектора зкДНК, продукованого з конструктів 11-14.

Таблиця 14В

Вихід (як визначено OD) типових векторів зкДНК, які продукуються з конструктів 11-14

Конструкт №	Концентрація ДНК OD260 і стандартний коефіцієнт 50	Співвідношення 260/280	Загальна кількість ДНК [мкг] з 50 мл інфекції (об'єм продукування ДНК)	Загальний вихід ДНК [мг] на 1 л (розрах.)
Конструкт 11	342,7 нг/мкл	1,79	8,57	0,171
Конструкт 12	197,5 нг/мкл	1,9	4,54	0,090
Конструкт 13	145 нг/мкл	1,9	3,62	0,072
Конструкт 14	443,1 нг/мкл	1,79	11,08	0,221

Таблиця 14С

Вихід (як визначено OD) вектора зкДНК, продукованого з конструктів

Конструкт №	A ₂₃₀	260/230	260/280	Конц. ДНК OD260 і стандартний коефіцієнт 50	Вихід мкг/0,2 г згустку клітин	Загальний вихід ДНК [мг] на 1 л (розрах.)
14	0,038	2,789	1,860	265 нг/мкл	53,0	2,6
12	0,017	6,176	1,842	263 нг/мкл	52,6	2,6

Таблиця 14С показує кількість одержаного матеріалу ДНК (як визначено за допомогою OD) з використанням конструктів 12 і 14 з Таблиці 14С. Вихід загального матеріалу ДНК був прийнятним, у порівнянні з типовими показниками виходу приблизно 3 мг/л матеріалу ДНК з процесу за представленим вище Прикладом 1 (Таблиця 13).

Приклад 3: вектори зкДНК експресують трансген люциферази in vitro

Конструкти генерували шляхом введення відкритої рамки зчитування, яка кодує репортерний ген люциферази, в сайт клонування конструктів зкДНК-плазмід: конструкту-1, конструкту-3, конструкту-5 та конструкту-7. ЗкДНК-плазмід (див. вище у Таблиці 12), які включають кодуючу послідовність люциферази, називаються плазмідним конструктом 1-Luc, плазмідним конструктом-3-Luc, плазмідним

конструктом-5-Luc і плазмідним конструктом 7-Luc, відповідно.

HEK293 клітини культивували та трансфікували 100 нг, 200 нг або 400 нг плазмідних конструктів 1, 3, 5 і 7, застосовуючи FUGENE® (Promega Corp.) як агент трансфекції. Експресію люциферази з кожної з плазмід визначали на основі люциферазної активності у кожній клітинній культурі, і результати представлені на Фіг. 6А. Люциферазну активність не виявляли з необроблених контрольних клітин ("Необроблені") або клітин, оброблених лише Fugene ("Fugene"), що підтверджує, що люциферазна активність є результатом експресії гена з плазмід, як показано на Фіг. 6А та Фіг. 6В, стійку експресію люциферази виявляли з конструктів 1 і 7. Експресія з конструкту-7 експресувала люциферазу з виявленням залежного від дози підвищення люциферазної активності.

Ріст і життєздатність клітин, трансфікованих кожною з плазмід, також було визначено та представлено на Фіг. 7А та Фіг. 7В. Ріст клітин і життєздатність трансфікованих клітин не мали значних відмінностей між різними групами клітин, оброблених різними конструктами.

Відповідно, люциферазна активність, виміряна у кожній групі та нормалізована на основі росту та життєздатності клітин, не відрізнялася від люциферазної активності без нормалізації. ЗкДНК-плазмідна з конструктом 1-Luc демонструвала найбільше стійку експресію люциферази з нормалізацією або без неї.

Таким чином, дані, представлені на ФІГУРАХ 6А, 6В, 7А та 7В, демонструють, що конструкт 1, який включає від 5' до 3'- WT-ITR (SEQ ID NO: 51), CAG промотор (SEQ ID NO: 3), сайт клонування R3/R4 (SEQ ID NO: 7), WPRE (SEQ ID NO: 8), BGHrA (SEQ ID NO: 9) та модифікований ITR (SEQ ID NO: 2), є ефективним у продукуванні вектора зкДНК, який може експресувати білок трансгена в межах вектора зкДНК.

Приклад 4: In vivo експресія білка трансгена люциферази з векторів зкДНК.

In vivo експресію білка трансгена з векторів зкДНК, продукованих із конструктів 1-8, описаних вище, оцінювали у мишей. Вектор зкДНК, одержаний із зкДНК-плазмідного конструкту 1 (як описано у Таблиці 12), було випробувано, і він продемонстрував стійку та тривалу експресію трансгена люциферази у мишачій моделі після гідродинамічної ін'єкції конструкту зкДНК без ліпосоми, повторного введення дози (на 28-й день), і стійкість (до 42-го дня) екзогенної зкДНК люцифераза світляка. В різних експериментах експресію люциферази вибраних векторів зкДНК оцінюють in vivo, де вектори зкДНК включають трансген люциферази та принаймні один модифікований ITR, вибраний з будь-яких, показаних у Таблицях 10А - 10В, або ITR, який включає принаймні одну з послідовностей, показаних на ФІГУРАХ 26А - 26В.

In vivo експресія люциферази: 5-7-тижневим самцям мишей CD-1 IGS (Charles River Laboratories) вводять 0,35 мг/кг вектора зкДНК, який експресує люциферазу, в об'ємі 1,2 мл через внутрішньовенне гідродинамічне введення у хвостову вену в 0-й день. Експресію люциферази оцінюють за допомогою IVIS-візуалізації на 3, 4, 7, 14, 21, 28, 31, 35 і 42-й дні. У загальних рисах, мишам шляхом внутрішньочеревинної ін'єкції вводять 150 мг/кг субстрату люциферину, а потім люмінесценцію всього тіла оцінювали за допомогою візуалізації IVIS®.

IVIS-візуалізацію здійснюють на 3-й день, 4-й день, 7-й день, 14-й день, 21-й день, 28-й день, 31-й день, 35-й день та 42-й день, і зібрані органи піддають візуалізації ex vivo після умертвіння на 42-й день.

У процесі дослідження тварин зважували і щодня спостерігали на загальний стан здоров'я та самопочуття. При умертвінні кров з кожної тварини збирають за допомогою пристрою terminal cardiac stick, розділяють на дві частини й обробляють на 1) плазму та 2) сироватку, плазму швидко заморожують, а сироватку застосовують для панелі ферментів печінки з наступним швидким заморожуванням. Крім того, печінку, селезінку, нирки та пахові лімфатичні вузли (LN) збирають та візуалізують ex vivo за допомогою IVIS.

Експресію люциферази оцінюють у печінці за допомогою аналізу MAXDISCOVERY® Luciferase ELISA (BIO Scientific/PerkinElmer), кПЛР на люциферазу в зразках печінки, гістопатологію зразків печінки та/або панелі ферментів печінки в сироватці (VetScanVS2; Abaxis Preventative Care Profile Plus).

Приклад 5: Скринінг мутантів ITR Walk

Виконували подальші аналізи зв'язку структури ITR з утворенням зкДНК. Створювали низку мутантів для з'ясування впливу конкретних структурних змін на утворення зкДНК та здатність до експресії кодованого зкДНК трансгена. Побудова мутантів, аналіз утворення зкДНК й оцінка експресії трансгена зкДНК в культурі клітин людини детально описуються далі.

Побудова мутанта ITR

Бібліотеку з 31 плазмід з унікальними асиметричними мутантними касетами ITR AAV II типу створювали in silico, після чого оцінювали у клітинах комах Sf9 й ембріональних клітинах нирок людини (HEK293). Кожна касета ITR містила репортерний ген люциферази (LUC) або зеленого флуоресцентного білка (GFP), який приводиться промоторною послідовністю p10 для експресії у клітинах комах і промоторною послідовністю CAG для експресії у клітинах ссавців. Мутації послідовності ITR створювали на правій або лівій ділянці ITR. Бібліотека містила 15 правих (RS) і 16 лівих (LS) мутантів, представлених у Таблиці 10А та 10В і на ФІГУРАХ 26А та 26В цього опису.

Суспензійні культури Sf9 підтримували у середовищі Sf900 III (Gibco) у вентильованих 200 мл колбах з тканинною культурою. Культури пересіювали кожні 48 годин, і число клітин та показники

росту вимірювали перед кожним пересіюванням за допомогою лічильника ViCell (Beckman Coulter). Клітини підтримували в умовах струшування (орбіта 1", 130 об/хв) при 27 °С. Культури адгезивних клітин HEK293 підтримували у GlutIMax DMEM (модифіковане способом Дульбекко середовище Ігла, Gibco) з 1% ембріональної сироватки великої рогатої худоби та 0,1% PenStrep у 250 мл колбах для культивування при 37 °С з 5% CO₂. Культури трипсинізували та пересіювали кожні 96 годин. Для кожного пересіювання застосовували розведення 1:10 90-100% вмісту конфлюентної колби.

Вектори зкДНК генерували та будували, як описано вище у Прикладі 1. У загальних рисах, як показано на Фіг. 4В, клітини Sf9, трансдуковані плазмідними конструктами залишали для адгезивного росту на 24 години в стаціонарних умовах при 27 °С. Через 24 години трансфіковані клітини Sf9 інфікували вектором Rep через інфіковані бакуловірусом клітини комах (BIC). BIC попередньо аналізували для характеристики інфективності та використовували у кінцевому розведенні 1:2000. BIC, розведені у співвідношенні 1:100 у середовищі клітин комах Sf900, додавали в кожен лунку з попередньо трансфікованими клітинами. Не інфіковані вектором Rep BIC додавали до підгрупи лунок як негативний контроль. Вміст планшетів перемішували шляхом обережного збовтування на струшувачі планшетів протягом 2 хвилин. Потім клітини вирощували протягом додаткових 48 годин при 27 °С в стаціонарних умовах. Усі експериментальні конструкти та контрольні послідовності аналізували у трьох примірниках.

Через 48 годин 96-лунковий планшет забирали з інкубатора, швидко врівноважували до кімнатної температури й аналізували на експресію люциферази (OneGlo Luciferase Assay (Promega Corporation)). Загальну люмінесценцію вимірювали із застосуванням зчитувача мікропланшетів SpectraMax M Series. Реплікати усереднювали. Результати показані на Фіг. 27. Як й очікувалося, три негативні контрольні зразки (лише середовище, імітаційна трансфекція без донорної ДНК та зразок, який обробляли за відсутності Rep-вмісної бакуловірусної клітини) не демонстрували значної експресії люциферази. Стійка експресія люциферази спостерігалася у кожному з мутантних зразків, що вказувало на те, що для кожного зразка зкДНК-кодований трансген був успішно трансфікований і експресований незалежно від мутації.

Аналіз утворення зкДНК

Для того, щоб пересвідчитись у тому, що зкДНК, генерована у попередньому дослідженні, має очікувану структуру із закритим кінцем, здійснювали експерименти для продукування достатньої кількості кожної зкДНК, яка згодом може бути випробувана на належну структуру. У загальних рисах, суспензійні культури Sf9 трансфікували з використанням ДНК, яка відноситься до мутантної плазміди з одним ITR з бібліотеки. Культури висіювали в кількості 1,25x10⁶ клітин/мл у колби Ерленмеєра для культивування з обмеженим газообміном. Трансфекційні комплекси ДНК:ліпід приготували, застосовуючи трансфекційний реагент fuGene згідно з інструкціями виробника. Комплексні суміші приготували й інкубували у такий самий спосіб, як було описано вище для аналізу планшетів із люциферазою, зі збільшенням об'ємів пропорційно кількості трансфікованих клітин. Так само, як в аналізі репортерного гена, використовували співвідношення 4,5:1 (об'єм реагента/маса ДНК). Паралельно приготували імітаційні (лише реагенти для трансфекції) та необроблені зразки для контролю росту з експериментальними культурами. Після додавання реагентів для трансфекції культурам давали відновитися протягом 10 - 15 хвилин при кімнатній температурі з обережним вихруванням перед перенесенням до струшувача-інкубатора при 27 °С. Після 24 годин інкубації в умовах струшування число клітин і показники росту для всіх колб (експериментальних і контрольних) вимірювали за допомогою лічильника ViCell (Beckman Coulter). Усі колби (за винятком контролю росту) інфікували BIC, які містили Rep-вектор, у кінцевому розведенні 1:5000. Також приготували позитивний контроль із застосуванням усталеної процедури подвійної інфекції BIC для продукування зкДНК. Подвійно інфіковану культуру висіювали з кількістю клітин, яка дорівнювала середньому числу життєздатних клітин усіх експериментальних культур. Подвійний інфекційний контроль інфікували BIC з Rep і репортерним геном у кінцевому розведенні 1:5000 для кожного конструкту, відповідно. Після інфікування культури повертали до інкубатора в описаних вище умовах струшування. Число клітин, показники росту та життєздатності вимірювали щодня для всіх колб протягом 3 днів після інфікування. Вимірювання у момент часу T=0 здійснювали після того, як щойно інфіковані культури були залишені для відновлення протягом ~2 годин в умовах інкубації зі струшуванням. Через 3 дні клітини збирали шляхом центрифугування протягом 15 хвилин. Супернатант зливали, масу згустків записували та згустки заморожували при -80 °С до виділення ДНК.

Можливу необроблену зкДНК видобували з усіх колб (експериментальних і контрольних) із застосуванням комплексу Qiagen Plasmid Plus Midi Purification (Qiagen) згідно з "високопродуктивним" протоколом. Елюати підраховували із застосуванням вимірювань оптичної густини, отриманих від NanoDrop OneC (ThermoFisher). Одержані в результаті екстракти зкДНК зберігали при 4 °С.

Вищезазначені екстракти зкДНК проганяли на природному агарозному (1% агарози, 1x TAE буфера) гелі, приготуваному при розведенні 1:10 000 SYBR Safe Gel Stain (ThermoFisher Scientific), разом з маркером довжини ДНК 1kb Plus TrackIt. Після цього гель візуалізували із застосуванням пристрою для візуалізації Gbox Mini Imager під УФ/синім світлом. Як було описано вище, очікувалися дві первинні смуги у зразках зкДНК, які проганяли на природних гелях: смуга ~5500 п.о., яка представляє мономерні види, та смуга ~11000 п.о., яка відповідає димерним видам. Усі мутантні зразки випробували, і вони демонстрували очікувані мономерні та димерні смуги на природних

агарозних гелях. Результати для типового зразка мутантів показані на Фіг. 28. Можливу необроблену ITR-мутантну зкДНК та контрольні екстракти від маломасштабного продукування піддавали подальшому аналізу із застосуванням з'єднання фрагмента рестрикції та денатуруючого агарозного гелю для підтвердження дволанцюгової структури ДНК, що свідчить про зкДНК. Очікується, що кожна мутантна зкДНК має єдиний сайт рестрикції EcoR1, і, таким чином, при належному утворенні має продукувати два характерні фрагменти після розщеплення EcoR1. Високоточну рестрикційну ендонуклеазу EcoRI (New England Biolabs) застосовували для розщеплення можливого екстракту зкДНК згідно з інструкціями виробника. Екстракти з імітаційних зразків та контролю росту не аналізували, оскільки спектрофотометричний підрахунок із застосуванням NanoDrop (ThermoFisher), а також аналіз на природному агарозному гелі виявили відсутність в елюатах продукту, подібного до зкДНК/плазмід. Розщеплений матеріал очищали, застосовуючи комплект для ПЛР-очищення (Qiagen) згідно з інструкціями виробника, за винятком того, що очищений розщеплений матеріал елюювали у безнуклеазній воді замість елююючого буфера Qiagen. Лужний агарозний гель (0,8% лужної агарози) врівноважували у врівноважувальному буфері (1 mM EDTA, 200 mM NaOH) протягом доби при 4 °C. 10x денатуруючого розчину (50 mM NaOH, 1 mM EDTA) додавали до зразків очищених фрагментів розщеплення зкДНК та відповідної нерозщепленої зкДНК (загалом 1 мкг) і зразки нагрівали при 65 °C протягом 10 хвилин. До кожного денатурованого зразка додавали 10x завантажувального носія (бромфеноловий синій, 50% гліцерину) та змішували. Маркер довжини ДНК TrackIt 1kb Plus (ThermoFisher Scientific) також завантажували на гель як контроль. Гель проганяли протягом ~18 год при 4 °C і постійній напрузі (25 В) з наступним промиванням деіонізованою H₂O та нейтралізацією в 1xTAE (Tris-ацетат, EDTA) буфер, pH 7,6, протягом 20 хвилин з обережним перемішуванням. Після цього гель переносили до розчину 1x TAE/1x SYBR Gold протягом ~1 години при обережному перемішуванні. Після цього гель піддавали візуалізації із застосуванням пристрою для візуалізації Gbox Mini Imager (Syngene) під УФ/синім світлом. Очікувалося, що нерозрізані денатуровані зразки мають мігрувати при ~11 000 п.о., а оброблені EcoRI зразки повинні були мати дві смуги, одну при ~4000 п.о. й одну при ~6000 п.о.

Усі мутантні зразки у цьому експерименті мали подібні результати. Дві значні смуги були видимими у кожному ряді зразків в оброблених EcoRI зразках, які мігрують на денатуруючому гелі в очікуваних розмірах, що різко контрастує з нерозщепленими мутантними зразками, які мігрували при очікуваному розмірі ~11000 п.о. Фіг. 27 показує результати для типового зразка мутантів, у якому дві смуги понад фоновий показник спостерігаються для кожного розщепленого мутантного зразка, у порівнянні з єдиною смугою, яка є видимою у нерозщеплених мутантних зразках. Таким чином, очевидно, мутантні зразки правильно утворюють зкДНК.

Функціональна експресія в культурі клітин людини

Для оцінки функціональності зкДНК з мутантним ITR, яка продукується із застосуванням маломасштабного процесу продукування, клітини HEK293 трансфікували деякими типовими зразками мутантних зкДНК. Клітини HEK293, які активно зв'язуються, поміщали у 96-лункові мікротитрувальні планшети в кількості 3x10⁶ клітин на лунку (конфлюентність 80%) й інкубували протягом 24 годин у вищеописаних умовах для адгезивних культур HEK293. Через 24 години загалом 200 нг необробленої маломасштабної зкДНК трансфікували із застосуванням LIPOFECTAMINE (Invitrogen, ThermoFisher Scientific). Трансфекційні комплекси приготували згідно з інструкціями виробника та загальний об'єм 10 мкл трансфекційного комплексу застосовували для трансфекції попередньо поміщених у планшети клітин HEK293. Усі експериментальні конструкти та контрольні послідовності аналізували у трьох примірниках. Трансфіковані клітини інкубували у вищеописаних умовах протягом 72 годин. Через 72 години 96-лунковий планшет забирали з інкубатора та залишали на короткий час для врівноваження до кімнатної температури. Виконували люциферазний аналіз OneGlo. Через 10 хвилин на орбітальному шейкері загальну люмінесценцію вимірювали із застосуванням зчитувача мікропланшетів SpectraMax M Series. Реплікати усереднювали. Результати показані на Фіг. 30. Кожний з випробуваних мутантних зразків експресував люциферазу в культурі клітин людини, вказуючи на те, що зкДНК була правильно утворена й експресована для кожного зразка в контексті людських клітин.

Посилання.

Всі посилання, перелічені та розкриті в описі та Прикладах, включаючи патенти, патентні заявки, міжнародні патентні заявки та публікації, тут включені у повному обсязі шляхом посилання.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> GENERATION BIO INC.

<120> МОДИФІКОВАНА ДНК З ЗАКРИТИМ КІНЦЕМ (CEDNA)

<130> 080170-090580WORT

<140>

<141>

<150> 62/556,335

<151> 2017-09-08

<150> 62/556,281

<151> 2017-09-08

<150> 62/556,319

<151> 2017-09-08

<150> 62/556,324

<151> 2017-09-08

<150> 62/556,329

<151> 2017-09-08

<150> 62/556,331

<151> 2017-09-08

<160> 557

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 141

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 1

aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc 120

gagcgcgag ctgcctgcag g 141

<210> 2

<211> 130

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 2

aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccg gcggcctcag tgagcgagcg agcgcgagc 120

tgccctgcagg 130

<210> 3

<211> 1923

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний

полінуклеотид

<400> 3

tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta	60
ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc	120
aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg	180
gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc	240
gcctggctga ccgccaacg acccccggc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat	300
agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc	360
ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaagtccg cccctattg acgtcaatga	420
cggtaaatgg ccgcctggc attatgcca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg	480
gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatggtc gaggtgagcc ccacgttctg	540
cttcactctc cccatctccc cccctcccc accccaatt ttgtatttat ttatTTTTTA	600
attatTTTgt gcagcgatgg gggcgggggg gggggggggg cgcgcgccag gcggggcggg	660
gcggggcgag gggcggggcg gggcgaggcg gagaggtgcg gcggcagcca atcagagcgg	720
cgcgctccga aagtttctt ttatggcgag gcggcgggcg cggcgggcct ataaaaagcg	780
aagcgcgcg cgggcgggag tcgctgcgac gctgccttcg cccgtgccc cgctccgccg	840
ccgcctcgcg ccgcccggc cggctctgac tgaccgcgtt actcccacag gtgagcgggc	900
gggacggccc ttctctccg ggctgtaatt agcgcttggg ttaatgacgg cttgtttctt	960
ttctgtggct gcgtgaaagc cttgaggggc tccgggaggg ccctttgtgc gggggggagc	1020
ggctcggggg gtgcgtgcgt gtgtgtgtgc gtggggagcg ccgctgctgc cccgcgctgc	1080
ccggcggctg tgagcgctgc gggcgggcg cggggctttg tgcgctccgc agtgtgcgcg	1140
aggggagcgc ggccgggggc ggtgccccgc ggtgcggggg gggctgcgag gggaaacaaag	1200
gctgcgtgcg ggggtgtgtc gtgggggggt gagcaggggg tgtgggcgcg gcggtcgggc	1260
tgtaaccccc ccctgcacc ccctccccga gttgctgagc acggcccggc ttcgggtgcg	1320
gggctccgta cggggcggtg cgcggggctc gccgtgccgg gcgggggggtg gcggcaggtg	1380
ggggtgccgg gcggggcggg gccgcctcgg gccggggagg gctcggggga ggggcgcggc	1440
ggccccgga gcgccggcgg ctgtcgaggc gcggcgagcc gcagccattg ctttttatgg	1500
taatcgtgcg agagggcgca gggacttcct ttgtccaaa tctgtgcgga gccgaaatct	1560
gggaggcgcc gccgcacccc ctctagcggg cgcggggcga agcgggtgcgg cgccggcagg	1620
aaggaaatgg gcggggaggg ctttcgtgcg tcgccgcgcc gccgtcccct tctccctctc	1680
cagcctcggg gctgtccgcg gggggacggc tgccttcggg ggggacgggg cagggcgggg	1740
ttcggcttct ggctgtgac cggcggctct agagcctctg ctaaccatgt tttagccttc	1800
ttctttttcc tacagctcct gggcaacgtg ctggttattg tgctgtctca tcatttgtcg	1860

acagaattcc tcgaagatcc gaaggggttc aagcttggca ttccggtact gttggtaaag	1920
сса	1923

<210> 4
 <211> 1272
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 полінуклеотид

<400> 4	
aggctcagag gcacacagga gtttctgggc tcaccctgcc cccttccaac ccctcagttc	60
ccatcctcca gcagctgttt gtgtgctgcc tctgaagtcc aactgaaca aacttcagcc	120
tactcatgtc cctaaaatgg gcaaacattg caagcagcaa acagcaaca cacagccctc	180
cctgcctgct gaccttggag ctggggcaga ggtcagagac ctctctgggc ccatgccacc	240
tccaacatcc actcgacccc ttggaatttc ggtggagagg agcagagggt gtcctggcgt	300
ggtttaggta gtgtgagagg gtccgggttc aaaaccactt gctgggtggg gagtctcag	360
taagtggcta tgccccgacc ccgaagcctg tttcccatc tgtacaatgg aaatgataaa	420
gacgcccatac tgatagggtt tttgtggcaa ataaacattt ggTTTTTTTg ttttgttttg	480
TTTTGTTTT tgagatggag gtttgctctg tcgcccaggc tggagtgcag tgacacaatc	540
tcatctcacc acaaccttcc cctgcctcag cctcccaagt agctgggatt acaagcatgt	600
gccaccacac ctggctaatt ttctatTTTT agtagagacg ggTTTTtcca tgttggtcag	660
cctcagcctc ccaagtaact gggattacag gcctgtgcc ccaaccccgg ctaatTTTTt	720
ctatTTTTga cagggacggg gtttcacat gttggtcagg ctggtctaga ggtaccggat	780
cttgctacca gtggaacagc cactaaggat tctgcagtga gagcagaggg ccagctaagt	840
ggtactctcc cagagactgt ctgactcac ccaccccctc caccttggac acaggacgct	900
gtggtttctg agccaggtag aatgactcct ttcggtaagt gcagtggaag ctgtacactg	960
cccaggcaaa gcgtccgggc agcgtaggcg ggcgactcag atcccagcca gtggacttag	1020
cccctgtttg ctctccgat aactgggggtg accttgggta atattcacca gcagcctccc	1080
ccgttgcccc tctggatcca ctgcttaaatacggacgagg acagggccct gtctcctcag	1140
cttcaggcac caccactgac ctgggacagt gaatccggac tctaaggtaa atataaaatt	1200
tttaagtgtg taatgtgtta aactactgat tctaattgtt tctctctttt agattccaac	1260
ctttggaact ga	1272

<210> 5
 <211> 547
 <212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 5

ccctaaaatg ggcaaacatt gcaagcagca aacagcaaac acacagccct ccctgcctgc	60
tgaccttgga gctggggcag aggtcagaga cctctctggg cccatgccac ctccaacatc	120
cactcgaccc cttggaatth ttcggtggag aggagcagag gttgtcctgg cgtgggttag	180
gtagtgtgag aggggaatga ctcttttcgg taagtgcagt ggaagctgta cactgcccag	240
gcaaacgctc cgggcagcgt aggcgggcga ctcatatccc agccagtggg cttagcccct	300
gtttgctcct ccgataactg gggtgacctt ggtaaatatt caccagcagc ctccccggt	360
gccccctgg atccactgct taaatacggg caggacagg gccctgtctc ctgagcttca	420
ggcaccacca ctgacctggg acagtgaatc cggactctaa ggtaaatata aaatthttaa	480
gtgtataatg tgttaacta ctgattctaa ttgtttctct ctttagatt ccaaccttg	540
gaactga	547

<210> 6

<211> 1179

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 6

ggctccggtg cccgtcagtg ggcaagcgc acatcgccca cagtccccga gaagttgggg	60
ggaggggtcg gcaattgaac cgggtgcctag agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt	120
gatgtcgtgt actggctccg cttttttccc gaggggtggg gagaaccgta tataagtgca	180
gtagtgcgg tgaacgttct ttttcgcaac gggtttgccc ccagaacaca ggtaagtgcc	240
gtgtgtggtt cccgcgggccc tggcctcttt acgggttatg gcccttgctg gccttgaatt	300
acttccacct ggctgcagta cgtgattctt gatcccagc ttcgggttgg aagtgggtgg	360
gagagttcga ggccttgccg ttaaggagcc ctttcgcctc gtgcttgagt tgaggcctgg	420
cctgggcccgt ggggcccggc cgtgcgaatc tgggtggcacc ttcgcgcctg tctcgtgct	480
ttcgataagt ctctagccat ttaaaattht tgatgacctg ctgcgacgt tttttctgg	540
caagatagtc ttgtaaatgc gggccaagat ctgcacactg gtatttcggg ttttggggcc	600
gcgggcccgc acggggcccg tgcgtcccag cgcacatgtt cggcgaggcg gggcctgcga	660
gcgcggccac cgagaatcgg acgggggtag tctcaagctg gccggcctgc tctggtgcct	720
ggtctcgcgc cgccgtgtat cggccgccc tgggcggcaa ggctggcccg gtcggcacca	780

gttgctgag cggaagatg gccgcttccc ggccctgctg caggagctc aaaatggagg	840
acgcggcgct cgggagagcg ggcgggtgag tcacccacac aaaggaaaag ggcctttccg	900
tcctcagccg tcgcttcattg tgactccacg gaggaccggg cggcgtccag gcacctcgat	960
tagttctcga gcttttggag tacgtcgtct ttaggttggg gggaggggtt ttatgcgatg	1020
gagtttcccc aactgagtg ggtggagact gaagttaggc cagcttggca cttgatgtaa	1080
ttctccttgg aatttgccct ttttgagttt ggatcttggg tcattctcaa gcctcagaca	1140
gtggttcaaa gtttttttct tccatttcag gtgtcgtga	1179

<210> 7
 <211> 8
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 7	
gtttaaac	8

<210> 8
 <211> 581
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 полінуклеотид

<400> 8	
gagcatctta cgcattta ttcccatatt tgttctgttt ttcttgattt ggtatacat	60
ttaaatgtta ataaaaaaa atggtggggc aatcatttac atttttaggg atatgtaatt	120
actagttcag gtgtattgcc acaagacaaa catgttaaga aactttcccg ttatttacgc	180
tctgttcctg ttaatcaacc tctggattac aaaatttgtg aaagattgac tgatattctt	240
aactatgttg ctctttttac gctgtgtgga tatgctgctt tatagcctct gtatctagct	300
attgcttccc gtacggcttt cgttttctcc tccttgata aatcctgggt gctgtctctt	360
ttagaggagt tgtggcccg tgtccgtcaa cgtggcgtgg tgtgctctgt gtttgctgac	420
gcaaccccc ctggctgggg cattgccacc acctgtcaac tcctttctgg gactttcgct	480
ttccccctcc cgatcgccac ggcagaactc atcgccgcct gccttgcccg ctgctggaca	540
ggggctagggt tgctgggcac tgataattcc gtggtgttgt c	581

<210> 9
 <211> 225
 <212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 9

tgtgccttct agttgccagc catctgttgt ttgccctcc cccgtgcctt ccttgaccct	60
ggaagggtgcc actccactg tcctttccta ataaaatgag gaaattgcat cgatttgtct	120
gagtaggtgt cattctattc tgggggggtgg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg	180
ggaagacaat agcaggcatg ctggggatgc ggtgggctct atggc	225

<210> 10

<211> 213

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 10

taagatacat tgatgagttt ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa aaatgcttta	60
tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaaccat tataagctgc aataaacaag	120
ttaacaacaа caattgcatt cattttatgt ttcaggttca gggggagggtg tgggagggtt	180
tttaaagcaa gtaaaacctc tacaatgtg gta	213

<210> 11

<211> 1260

<212> ДНК

<213> Аденоасоційований вірус - 2

<400> 11

atggagctgg tcgggtggct cgtggacaag gggattacct cggagaagca gtggatccag	60
gaggaccagg cctcatacat ctcttcaat gcggcctcca actcgcggtc ccaaatcaag	120
gctgccttgg acaatgcggg aaagattatg agcctgacta aaaccgcccc cgactacctg	180
gtgggccagc agcccgtgga ggacatttcc agcaatcgga ttataaaat ttggaacta	240
aacgggtacg atccccaata tgcggcttcc gtctttctgg gatgggccac gaaaaagttc	300
ggcaagagga acaccatctg gctgtttggg cctgcaacta ccgggaagac caacatcgcg	360
gaggccatag cccacactgt gcccttctac ggggtcgtaa actggaccaа tgagaacttt	420
cccttcaacg actgtgtcga caagatgggtg atctggtggg aggaggggaa gatgaccgcc	480
aaggctcgtgg agtcggccaa agccattctc ggaggaagca aggtgcgcgt ggaccagaaa	540
tgcaagtctt cggcccagat agaccgact cccgtgatcg tcacctcaa caccaacatg	600
tgcgccgtga ttgacgggaa ctcaacgacc ttcgaacacc agcagccgtt gcaagaccgg	660
atgttcaaat ttgaactcac ccgccgtctg gatcatgact ttgggaaggt caccaagcag	720

gaagtcaaag actttttccg gtgggcaaag gatcacgtgg ttgaggtgga gcatgaattc	780
tacgtcaaaa aggggtggagc caagaaaaga cccgccccca gtgacgcaga tataagtgag	840
cccaaacggg tgcgcgagtc agttgcgcag ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc	900
aactacgcag acaggtacca aaacaaatgt tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg	960
tttccctgca gacaatgcga gagaatgaat cagaattcaa atatctgctt cactcacgga	1020
cagaaagact gtttagagtg ctttcccggtg tcagaatctc aaccggtttc tgtcgtcaaa	1080
aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat catatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc	1140
actgcctgcg atctgggtcaa tgtggatttg gatgactgca tctttgaaca ataaatgatt	1200
taaatcaggt atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca ctctctctga	1260

<210> 12

<211> 1932

<212> ДНК

<213> Аденоасоційований вірус - 2

<400> 12

atgccgggggt ttacagagat tgtgattaag gtccccagcg accttgacga gcatctgccc	60
ggcatttctg acagctttgt gaactgggtg gccgagaagg aatgggagtt gccgccagat	120
tctgacatgg atctgaatct gattgagcag gcacccctga ccgtggccga gaagctgcag	180
cgcgactttc tgacggaatg gcgccgtgtg agtaaggccc cggaggccct tttctttgtg	240
caatttgaga agggagagag ctacttcac atgcacgtgc tcgtggaaac caccggggtg	300
aaatccatgg ttttgggacg tttcctgagt cagattcgcg aaaaactgat tcagagaatt	360
taccgcggga tcgagccgac ttgtccaaac tggttcgcg tcacaaagac cagaaatggc	420
gccggaggcg ggaacaaggt ggtggatgag tgctacatcc ccaattactt gctcccaaa	480
accagcctg agctccagtg ggcgtggact aatatggaac agtatttaag cgcctgtttg	540
aatctcacgg agcgtaaacg gttggtggcg cagcatctga cgcacgtgtc gcagacgcag	600
gagcagaaca aagagaatca gaatccaat tctgatgcgc cggatgatcag atcaaaaact	660
tcagccaggt acatggagct ggtcgggtgg ctcgtggaca aggggattac ctcggagaag	720
cagtggatcc aggaggacca ggcctcatac atctccttca atgcggcctc caactcgcg	780
tcccaaatca aggctgcctt ggacaatgcg ggaaagatta tgagcctgac taaaaccgcc	840
cccgactacc tgggtgggcca gcagcccgtg gaggacattt ccagcaatcg gatttataaa	900
attttgaac taaacgggta cgatcccaa tatgcggctt ccgtctttct gggatgggcc	960
acgaaaaagt tcggcaagag gaacaccatc tggctgtttg ggcctgcaac taccgggaag	1020
accaacatcg cggaggccat agcccacact gtgcccttct acgggtgcgt aaactggacc	1080
aatgagaact ttcccttcaa cgactgtgtc gacaagatgg tgatctggtg ggaggagggg	1140

aagatgaccg ccaaggtcgt ggagtcggcc aaagccattc tcggaggaag caaggtgcgc	1200
gtggaccaga aatgcaagtc ctcggcccag atagaccga ctcccgtgat cgtcacctcc	1260
aacaccaaca tgtgcgccgt gattgacggg aactcaacga ccttcgaaca ccagcagccg	1320
ttgcaagacc ggatgttcaa atttgaactc acccgccgtc tggatcatga ctttggaag	1380
gtcaccaagc aggaagtcaa agactttttc cgggtgggcaa aggatcacgt ggttgagggtg	1440
gagcatgaat tctacgtcaa aaagggtgga gccaagaaaa gacccgcccc cagtgcgcga	1500
gatataagtg agcccaaacg ggtgcgcgag tcagttgcgc agccatcgac gtcagacgcg	1560
gaagcttcga tcaactacgc agacaggtac caaaacaaat gttctcgtca cgtgggcatg	1620
aatctgatgc tgtttccctg cagacaatgc gagagaatga atcagaattc aaatatctgc	1680
ttcactcacg gacagaaaga ctgttttagag tgctttcccg tgcagaatc tcaaccggtt	1740
tctgtcgtca aaaaggcgta tcagaaactg tgctacattc atcatatcat gggaaagggtg	1800
ccagacgctt gcactgcctg cgatctggtc aatgtggatt tggatgactg catctttgaa	1860
caataaatga tttaaatcag gtatggctgc cgatggttat cttccagatt ggctcgagga	1920
cactctctct ga	1932

<210> 13

<211> 1876

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 13

cgagccacc atggcggggt ttacgagat tgtgattaag gtccccagcg accttgacgg	60
gcatctgccc ggcatttctg acagctttgt gaactgggtg gccgagaagg aatgggagtt	120
gccgccagat tctgacatgg atctgaatct gattgagcag gcacccctga ccgtggccga	180
gaagctgcag cgcgactttc tgacggaatg gcgccgtgtg agtaaggccc cggaggccct	240
tttctttgtg caatttgaga agggagagag ctacttcac atgcacgtgc tcgtggaac	300
caccgggggtg aaatccatgg ttttgggacg tttcctgagt cagattcgcg aaaaactgat	360
tcagagaatt taccgcggga tcgagccgac ttgccaac tggttcgcgg tcacaaagac	420
cagaaatggc gccggaggcg ggaacaagggt ggtggatgag tgctacatcc ccaattactt	480
gctcccaaaa acccagcctg agctccagtg ggctggact aatatggaac agtatttaag	540
cgctgtttg aatctcacgg agcgtaaacg gttggtggcg cagcatctga cgacgtgtc	600
gcagacgcag gagcagaaca aagagaatca gaatccaat tctgatgcgc cggatgatcag	660
atcaaaaact tcagccaggt acatggagct ggtcgggtgg ctctgggaca aggggattac	720
ctcggagaag cagtggatcc aggaggacca ggctcatac atctccttca atgcggcctc	780

caactcgcgg tcccaaatca aggctgcctt ggacaatgcg ggaagatta tgagcctgac	840
taaaaccgcc cccgactacc tgggtgggcca gcagcccgtg gaggacattt ccagcaatcg	900
gatttataaa attttggaaac taaacgggta cgatcccaa tatgcggctt ccgtctttct	960
gggatgggcc acgaaaaagt tcggcaagag gaacaccatc tggctgtttg ggcctgcaac	1020
taccgggaag accaacaatcg cggaggccat agcccacact gtgcccttct acgggtgcgt	1080
aaactggacc aatgagaact ttcccttcaa cgactgtgtc gacaagatgg tgatctggtg	1140
ggaggagggg aagatgaccg ccaaggtcgt ggagtcggcc aaagccattc tcggaggaag	1200
caaggtgcgc gtggaccaga aatgcaagtc ctcggcccag atagaccga ctcccgatgat	1260
cgtcacctcc aacaccaaca tgtgcgccgt gattgacggg aactcaacga cttcgaaca	1320
ccagcagccg ttgcaagacc ggatgttcaa atttgaactc acccgccgtc tggatcatga	1380
ctttgggaag gtcaccaagc aggaagtcaa agactttttc cgggtgggcaa aggatcacgt	1440
ggttgaggtg gagcatgaat tctacgtcaa aaagggtgga gccaagaaaa gaccgcccc	1500
cagtgcgcga gatataagt agcccaaacg ggtgcgcgag tcagttgcgc agccatcgac	1560
gtcagacgcg gaagcttcga tcaactacgc agacaggtac caaaacaaat gttctcgtca	1620
cgtgggcatg aatctgatgc tgtttccctg cagacaatgc gagagaatga atcagaattc	1680
aaatatctgc ttcactcacg gacagaaaga ctgttttagag tgctttcccg tgtcagaatc	1740
tcaacccgtt tctgtcgtca aaaaggcgta tcagaaactg tgctacattc atcatatcat	1800
gggaaaggtg ccagacgctt gcactgcctg cgatctggtc aatgtggatt tggatgactg	1860
catctttgaa caataa	1876

<210> 14

<211> 1194

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 14

atggagctgg tcgggtggct cgtggacaag gggattacct cggagaagca gtggatccag	60
gaggaccagg cctcatacat ctcttcaat gcggcctcca actcgcggtc ccaaatcaag	120
gctgccttgg acaatgcggg aaagattatg agcctgacta aaaccgcccc cgactacctg	180
gtgggccagc agcccggtga ggacatttcc agcaatcgga ttataaaaat tttggaacta	240
aacgggtacg atccccaata tcgggcttcc gtctttctgg gatgggccac gaaaaagttc	300
ggcaagagga acaccatctg gctgtttggg cctgcaacta ccgggaagac caacatcgcg	360
gaggccatag cccacactgt gcccttctac gggtgcgtaa actggacca tgagaacttt	420

cccttcaacg actgtgtcga caagatgggtg atctggtggg aggaggggaa gatgaccgcc	480
aaggtcgtgg agtcggccaa agccattctc ggaggaagca aggtgcgcgt ggaccagaaa	540
tgcaagtcct cggcccagat agacccgact cccgtgatcg tcacctcaa caccaacatg	600
tgcgccgtga ttgacgggaa ctcaacgacc ttcgaacacc agcagccgtt gcaagaccgg	660
atgttcaa at ttgaactcac ccgccgtctg gatcatgact ttgggaaggt caccaagcag	720
gaagtcaaag actttttccg gtgggcaaag gatcacgtgg ttgaggtgga gcatgaattc	780
tacgtcaaaa aggggtggagc caagaaaaga cccgccccca gtgacgcaga tataagtgag	840
cccaaacggg tgcgcgagtc agttgcgcag ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc	900
aactacgcag accgctacca aaacaaatgt tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg	960
tttccctgca gacaatgcga gagaatgaat cagaattcaa atatctgctt cactcacgga	1020
cagaaagact gtttagagtg ctttcccggtg tcagaatctc aaccggtttc tgtcgtcaaa	1080
aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat catatcatgg gaaagggtgcc agacgcttgc	1140
actgcctgcg atctggtcaa tgtggatttg gatgactgca tctttgaaca ataa	1194

<210> 15

<211> 141

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 15

aataaacgat aacgccgttg gtggcgtgag gcatgtaaaa ggttacatca ttatcttggt	60
---	----

cgccatccgg ttggtataaa tagacgttca tgttggtttt tgtttcagtt gcaagttggc	120
---	-----

tgcggcgcgc gcagcacctt t	141
-------------------------	-----

<210> 16

<211> 556

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 16

ccctaaaatg ggcaaacatt gcaagcagca aacagcaaac acacagccct ccctgcctgc	60
---	----

tgaccttgga gctggggcag aggtcagaga cctctctggg cccatgccac ctccaacatc	120
---	-----

cactcgaccc cttggaattt cgggtggagag gagcagaggt tgtcctggcg tggtttaggt	180
--	-----

agtgtagagag gggaatgact cttttcggtg agtgtagtgg aagctgtaca ctgcccaggc	240
--	-----

aaagcgtccg ggcagcgtag gcgggcgact cagatcccag ccagtggact tagccccgtg	300
---	-----

ttgctcctcc gataactggg gtgaccttgg ttaatattca ccagcagcct cccccgttgc	360
ccctctggat ccactgctta aatacggacg aggacactcg agggccctgt ctcctcagct	420
tcaggcacca ccactgacct gggacagtga atccggacat cgattctaag gtaaataata	480
aatttttaag tgtataattt gttaaaactac tgattctaat tgtttctctc ttttagattc	540
caacctttgg aactga	556

<210> 17
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 17	
gcgcgctcgc tcgctcactg agggccgggсg ассааaggtc gcccгacгcc cgggcggcct	60
cagtgagcga gсgagcгcгc	80

<210> 18
 <211> 241
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 полінуклеотид

<400> 18	
gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc tgtagagag	60
ataattggaа ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag taaaaatac gtgacgtaga	120
aagtaataat ttcttgggta gtttgcagtt ttaaaattat gttttaaaat ggactatcat	180
atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttggctt tatatatctt gtggaaagga	240
с	241

<210> 19
 <211> 215
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 полінуклеотид

<400> 19	
gaacгctгac gtcатсаacc cгctccaagg aatcгcgggc ccagtgtcac taggcgggaa	60
сacccagcгc гcgtгcгccc tggcaggaag atggctgtga gggacagggg agtggcгccc	120
tgcaatattt гcatgtcгct atgtgttctg ggaaatcacc ataaacgtga aatgtctttg	180

gatttgggaa tcgtataaga actgtatgag ассас

215

<210> 20

<211> 150

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 20

ataaacgata acgccgttgg tggcgtgagg catgtaaaag gttacatcat tatcttgttc 60

gccatccggt tgggtataaat agacgttcat gttggttttt gtttcagttg caagttggct 120

gcggcgcgcg cagcaccttt gcggccatct 150

<210> 21

<211> 546

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 21

ccctaaaatg ggcaaacatt gcaagcagca aacagcaaac acacagccct ccctgcctgc 60

tgaccttgga gctggggcag aggtcagaga cctctctggg cccatgccac ctccaacatc 120

cactcgaccc cttggaatth ttcggtggag aggagcagag gttgtcctgg cgtggtttag 180

gtagtgtgag aggggaatga ctcctttcgg taagtgcagt ggaagctgta cactgcccag 240

gcaaagcgtc cgggcagcgt aggcgggcga ctcagatccc agccagtgga cttagcccct 300

gtttgctcct ccgataactg gggtgacctt ggtaaatatt caccagcagc ctccccggtt 360

gcccctctgg atccactgct taaatacggg cgaggacagg gccctgtctc ctcagcttca 420

ggcaccacca ctgacctggg acagtgaatc cggactctaa ggtaaatata aaatthttta 480

gtgtataatg tgttaaacata ctgattctaa ttgtttctct ctttttagatt ccaacctttg 540

gaactg 546

<210> 22

<211> 317

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 22

ggtgtggaaa gtccccaggc tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt 60

agtcagcaac caggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca 120

tgcatctcaa ttagtcagca accatagtcc cgcccctaac tccgcccatac ccgcccctaa	180
ctccgcccag ttccgcccata tctccgcccc atggctgact aatTTTTTTTT atttatgcag	240
aggccgaggc cgcctcggcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc ttttttggag	300
gcctaggctt ttgcaaa	317

<210> 23
 <211> 576
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 полінуклеотид

<400> 23	
tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg cgttacataa	60
cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata	120
atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag	180
tatttacggt aaactgcccc cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc	240
cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta catgacctta	300
tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtgatg	360
cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt	420
ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg ggactttcca	480
aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt acggtgggag	540
gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cgtag	576

<210> 24
 <211> 1313
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 полінуклеотид

<400> 24	
ggagccgaga gtaattcata caaaaggagg gatcgccttc gcaaggggag agcccaggga	60
ccgtccctaa attctcacag accaaaatcc ctgtagccgc cccacgacag cgcgaggagc	120
atgcgcccag ggctgagcgc gggtagatca gagcacacaa gctcacagtc cccggcggtg	180
gggggagggg cgcgctgagc gggggccagg gagctggcgc ggggcaaaact gggaaagtgg	240
tgctgtgtgc tggctccgcc ctcttcccga ggggtggggga gaacggtata taagtgcggt	300
agtcgccttg gacgttcttt ttcgcaacgg gtttgccgtc agaacgcagg tgagtggcgg	360

gtgtggcttc cgcgggcccc ggagctggag ccctgctctg agcggggccgg gctgatatgc	420
gagtgtcgtc cgcagggttt agctgtgagc attcccactt cgagtggcgg gcggtgcggg	480
ggtgagagtg cgaggcctag cggcaacccc gtagcctcgc ctcgtgtccg gcttgaggcc	540
tagcgtgggtg tccgccgccg cgtgccactc cggccgcact atgcgttttt tgccttgct	600
gccctcgatt gccttcagc agcatgggct aacaaaggga ggggtgtggg ctcactctta	660
aggagcccat gaagcttacg ttggatagga atggaagggc aggaggggcg actggggccc	720
gcccccttc ggagcacatg tccgacgcca cctggatggg gcgaggcctg tggctttccg	780
aagcaatcgg gcgtgagttt agcctacctg ggccatgtgg ccctagcact gggcacggtc	840
tggcctggcg gtgccgcgtt cccttgctc ccaacaaggg tgaggccgtc ccgccggca	900
ccagttgctt gcgcggaaag atggccgctc cggggccct gttgcaagga gctcaaatg	960
gaggacgcgg cagcccgggtg gagcgggcgg gtgagtcacc cacacaaagg aagagggcct	1020
tgcccctcgc cggccgctgc ttcctgtgac cccgtggtct atcgccgca tagtcacctc	1080
gggcttctct tgagcaccgc tcgtcgcggc ggggggaggg gatctaattg cgttgagtt	1140
tgttcacatt tgggtgggtg agactagtca ggccagcctg gcgctggaag tcattcttg	1200
aatttgcccc tttagagttg gagcgaggct aattctcaag cctcttagcg gttcaaaggt	1260
atcttctaaa cccgtttcca ggtgttgtga aagccaccgc taattcaaag caa	1313

<210> 25

<211> 19

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид

<400> 25

Met	Asp	Trp	Thr	Trp	Arg	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Ala	Ala	Thr	Gly
1				5				10						15	

Ala His Ser

<210> 26

<211> 19

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид

<400> 26

Met	Leu	Pro	Ser	Gln	Leu	Ile	Gly	Phe	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Pro	Ala
1				5				10						15	

Ser Arg Gly

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
пептид

<400> 27

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

1

5

<210> 28

<400> 28

000

<210> 29

<400> 29

000

<210> 30

<400> 30

000

<210> 31

<400> 31

000

<210> 32

<400> 32

000

<210> 33

<400> 33

000

<210> 34

<400> 34

000

<210> 35

<400> 35

000

<210> 36

<400> 36
000

<210> 37

<400> 37
000

<210> 38

<400> 38
000

<210> 39

<400> 39
000

<210> 40

<400> 40
000

<210> 41

<400> 41
000

<210> 42

<400> 42
000

<210> 43

<400> 43
000

<210> 44

<400> 44
000

<210> 45

<211> 6

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 45 ggttga	6
<210> 46 <211> 4 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
<220> <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 46 agtt	4
<210> 47 <211> 6 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
<220> <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 47 ggttgg	6
<210> 48 <211> 6 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
<220> <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 48 agttgg	6
<210> 49 <211> 6 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
<220> <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 49 agttga	6
<210> 50 <211> 6 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 50
 rrttrr 6

<210> 51
 <211> 141
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 полінуклеотид

<400> 51
 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60
 gggcgacctt tggtcgcccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120
 actccatcac taggggttcc t 141

<210> 52
 <211> 130
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 полінуклеотид

<400> 52
 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60
 ggtcgccccg cctcagttag cgagcgagcg gcgagagagg gagtggccaa ctccatcact 120
 aggggttcct 130

<210> 53
 <211> 3123
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 полінуклеотид

<400> 53
 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggaaacc cgggcgtgcc 60
 cgggcgcctc agtgagcgag cgagcgcgca gagagggagt ggccaactcc atcactaggg 120
 gttcctgaac agagaaacag gagaatatgg gccaaacagg atatctgtgg taagcagttc 180
 ctgccccggc tcaggggcaa gaacagttgg aacagcagaa tatggggcaa acaggatatc 240
 tgttgtaagc agttcctgcc ccggctcagg gccaaagaaca gatggtcccc agatgcggtc 300
 ccgccctcag cagtttctag agaaccatca gatgtttcca gggtgccccca aggacctgaa 360

atgaccctgt gccttatttg aactaaccaa tcagttcgct tctcgcttct gttcgcgcgc	420
ttctgctccc cgagctctat ataagcagag ctctgttagt gaaccgtcag atcgccctgga	480
gacgccatcc acgctgtttt gacttccata gaaggccgcc accatggaag acgccccaaa	540
cataaagaaa ggccccggcgc cattctatcc gctggaagat ggaaccgctg gagagcaact	600
gcataaggct atgaagagat acgccctggg tcctggaaca attgctttta cagatgcaca	660
tatcgagggtg gacatcactt acgctgagta cttcgaaatg tccgttcggg tggcagaagc	720
tatgaaacga tatgggctga atacaaatca cagaatcgct gtatgcagtg aaaactctct	780
tcaattcttt atgccgggtg tgggcgcggt atttatcgga gttgcagttg cgcccgcgaa	840
cgacatttat aatgaacgtg aattgctcaa cagtatgggc atttcgcagc ctaccgtggg	900
gttcgtttcc aaaaaggggt tgcaaaaaat tttgaacgtg caaaaaaagc tcccaatcat	960
ccaaaaaatt attatcatgg attctaaaac ggattaccag ggatttcagt cgatgtacac	1020
gttcgtcaca tctcatctac ctcccgggtt taatgaatac gattttgtgc cagagtcctt	1080
cgatagggac aagacaattg cactgatcat gaactcctct ggatctactg gtctgcctaa	1140
agggtgcgct ctgcctcata gaactgcctg cgtgagattc tcgcatgccca gagatcctat	1200
ttttggcaat caaatcattc cggatactgc gattttaagt gttgttccat tccatcacgg	1260
ttttggaatg ttactacac tcggatattt gatattgtga tttcgagtcg tcttaatgta	1320
tagatttgaa gaagagctgt ttctgaggag cttcaggat tacaagattc aaagtgcgct	1380
gctggtgcca accctattct ctttcttcgc caaaagcact ctgattgaca aatacgattt	1440
atctaattta cacgaaattg cttctgggtg cgctcccctc tctaaggaag tcggggaagc	1500
ggttgccaag aggttccatc tgccagggtat caggcaagga tatgggctca ctgagactac	1560
atcagctatt ctgattacac ccgaggggga tgataaaccg ggcgcggtcg gtaaagtgtg	1620
tccatttttt gaagcgaagg ttgtggatct ggataccggg aaaacgctgg gcgttaatca	1680
aagaggcgaa ctgtgtgtga gaggtcctat gattatgtcc ggttatgtaa acaatccgga	1740
agcgaccaac gccttgattg acaaggatgg atggctacat tctggagaca tagcttactg	1800
ggacgaagac gaacacttct tcatcgttga ccgcctgaag tctctgatta agtacaagg	1860
ctatcagggtg gctcccgtg aattggaatc catcttgctc caacaccca acatcttcga	1920
cgcagggtgc gcaggctctc ccgacgatga cgccggtgaa cttcccgcg ccgttgttgt	1980
tttggagcac ggaaagacga tgacggaaaa agagatcggt gattacgtcg ccagtcaagt	2040
aacaaccgag aaaaagttgc gcggaggagt tgtgtttgtg gacgaagtac cgaaagggtc	2100
taccggaaaa ctcgacgcaa gaaaaatcag agagatcctc ataaaggcca agaaggcg	2160
aaagatcgcc gtgtaagagc atcttaccgc cttttattcc catatttggt ctgtttttct	2220
tgatttgggt atacatttaa atgttaataa aacaaaatgg tggggcaatc atttacattt	2280

ttagggatat gtaattacta gttcaggtgt attgccacaa gacaaacatg ttaagaaact	2340
ttcccgttat ttacgctctg ttcctgttaa tcaacctctg gattacaaaa tttgtgaaag	2400
attgactgat attcttaact atgttgctcc ttttacgctg tgtggatatg ctgctttata	2460
gcctctgtat ctagctattg cttcccgtac ggctttcgtt ttctcctcct tgtataaatc	2520
ctggttgctg tctcttttag aggagttgtg gcccgttgtc cgtcaacgtg gcgtgggtgtg	2580
ctctgtgttt gctgacgcaa cccccactgg ctggggcatt gccaccacct gtcaactcct	2640
ttctgggact ttcgctttcc ccctcccgat cgccacggca gaactcatcg ccgcctgcct	2700
tgtcccgtgc tggacagggg ctaggttgct gggcactgat aattccgtgg tgttgtctgt	2760
gccttctagt tgccagccat ctgttgtttg cccctcccc gtgccttcct tgacctgga	2820
agggtgccact ccactgtcc tttcctaata aaatgaggaa attgcatcg attgtctgag	2880
taggtgtcat tctattctgg ggggtggggg ggggcaggac agcaaggggg aggattggga	2940
agacaatagc aggcattgtg gggatgcggt gggctctatg gcaggaaccc ctagtgatgg	3000
agttggccac tccctctctg cgcgctcgct cgctcactga ggccgggcga ccaaaggctc	3060
cccgacgccc gggctttgcc cgggcggcct cagtgagcga gcgagcgcgc agctgcctgc	3120
agg	3123

<210> 54

<211> 3117

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 54

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaaag cccgggcgtc	60
gggcgacctt tggctgcccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca	120
actccatcac taggggttcc tgaacagaga aacaggagaa tatgggccaac acaggatatc	180
tgtggtaagc agttcctgcc ccggctcagg gccaagaaca gttggaacag cagaatatgg	240
gccaacaggc atatctgtgg taagcagttc ctgccccggc tcagggccaa gaacagatgg	300
tccccagatg cgggtccgcc ctgagcagtt tctagagaac catcagatgt ttccagggtg	360
ccccaaggac ctgaaatgac cctgtgcctt atttgaacta accaatcagt tcgcttctcg	420
cttctgttcg cgcgcttctg ctccccgagc tctatataag cagagctcgt ttagtgaacc	480
gtcagatcgc ctggagacgc catccacgct gttttgactt ccatagaagg ccgccaccat	540
ggaagacgcc aaaaacataa agaaaggccc ggcgccattc tatccgctgg aagatggaac	600
cgctggagag caactgcata aggttatgaa gagatacgcc ctggttcctg gaacaattgc	660
ttttacagat gcacatatcg aggtggacat cacttacgct gagtacttcg aaatgtccgt	720

tcggttggca gaagctatga aacgatatgg gctgaataca aatcacagaa tcgtcgtatg	780
cagtgaaaac tctcttcaat tctttatgcc ggtgttgggc gcgttattta tcggagttagc	840
agttgcgccc gcgaacgaca ttataatga acgtgaattg ctcaacagta tgggcatttc	900
gcagcctacc gtggtgttcg tttccaaaaa ggggttgcaa aaaattttga acgtgcaaaa	960
aaagctccca atcatccaaa aaattattat catggattct aaaacggatt accagggatt	1020
tcagtcgatg tacacgttcg tcacatctca tctacctccc ggttttaatg aatacgattt	1080
tgtgccagag tccttcgata gggacaagac aattgcactg atcatgaact cctctggatc	1140
tactggctctg cctaaagggtg tcgctctgcc tcatagaact gcctgcgtga gattctcgca	1200
tgccagagat cctatTTTTg gcaatcaaat cattccggat actgcgattt taagtgttgt	1260
tccattccat cacggTTTTg gaatgtttac tacactcgga tttttgatat gtggatttcg	1320
agtcgtctta atgtatagat ttgaagaaga gctgtttctg aggagccttc aggattacaa	1380
gattcaaagt gcgctgctgg tgccaaccct attctccttc ttcgccaaaa gcactctgat	1440
tgacaaatac gatttatcta atttacacga aattgcttct ggtggcgctc ccctctctaa	1500
ggaagtcggg gaagcggttg ccaagagggt ccatctgcc aagtatcaggc aaggatatgg	1560
gctcactgag actacatcag ctattctgat tacacccgag ggggatgata aaccgggcgc	1620
ggtcggtaaa gttgttccat tttttgaagc gaaggttgtg gatctggata ccgggaaaac	1680
gctgggcgtt aatcaaagag gcgaactgtg tgtgagaggt cctatgatta tgtccggtta	1740
tgtaaacaat ccggaagcga ccaacgcctt gattgacaag gatggatggc tacattctgg	1800
agacatagct tactgggacg aagacgaaca cttcttcacg gttgaccgcc tgaagtctct	1860
gattaagtac aaaggctatc aggtggctcc cgctgaattg gaatccatct tgctccaaca	1920
ccccaacatc ttcgacgcag gtgtcgcagg tcttcccgac gatgacgccg gtgaacttcc	1980
cgccgccgtt gttgttttgg agcacggaaa gacgatgacg gaaaaagaga tcgtggatta	2040
cgtcgccagt caagtaacaa ccgcgaaaaa gttgcgcgga ggagtgtgtt ttgtggacga	2100
agtaccgaaa ggtcttaccg gaaaactcga cgcaagaaaa atcagagaga tcctcataaa	2160
ggccaagaag ggcggaaaaga tcgccgtgta agagcatctt accgccattt attcccatat	2220
ttgttctgtt tttcttgatt tgggtataca tttaaatgtt aataaaacaa aatggtgggg	2280
caatcattta ctttttagg gatatgtaat tactagttca ggtgtattgc cacaagacaa	2340
acatgtaag aaactttccc gttattttacg ctctgttctt gttaatcaac ctctggatta	2400
caaaatttgt gaaagattga ctgatattct taactatgtt gctcctttta cgctgtgtgg	2460
atatgctgct ttatagcctc tgtatctagc tattgcttcc cgtacggctt tcgttttctc	2520
ctccttgat aaatcctggg tgctgtctct tttagaggag ttgtggcccg ttgtccgtca	2580
acgtggcgtg gtgtgctctg tgtttgctga cgcaaccccc actggctggg gcattgccac	2640

cacctgtcaa ctcctttctg ggacttttcgc tttccccctc ccgatcgcca cggcagaact	2700
catcgccgcc tgccttgccc gctgctggac aggggctagg ttgctgggca ctgataattc	2760
cgtggtgttg tctgtgcctt ctagttgcca gccatctgtt gtttgcccct cccccgtgcc	2820
ttccttgacc ctggaagggt ccactccac tgtcctttcc taataaaatg aggaaattgc	2880
atcgcatgtg ctgagtaggt gtcattctat tctgggggggt ggggtggggc aggacagcaa	2940
gggggaggat tgggaagaca atagcaggca tgctggggat gcggtgggct ctatggcagg	3000
aaccctagt gatggagttg gccactccct ctctgcgcgc tcgctcgctc actgaggccg	3060
cccgggaaac cggggcgtgc gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagctgc ctgcagg	3117

<210> 55

<400> 55
000

<210> 56

<400> 56
000

<210> 57
<211> 3912
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 57	
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggaaacc cgggcgtgcc	60
cgggcgcctc agtgagcgag cgagcgcgca gagaggaggt ggccaactcc atcactaggg	120
gttcctggct cagaggctca gaggcacaca ggagtttctg ggctcacctt gcccccttcc	180
aaccctcag ttccatcct ccagcagctg tttgtgtgct gcctctgaag tccacactga	240
acaaacttca gcctactcat gtccctaaaa tgggcaaaca ttgcaagcag caaacagcaa	300
acacacagcc ctccctgcct gctgaccttg gagctggggc agaggtcaga gacctctctg	360
ggcccatgcc acctccaaca tccactcgac cccttggaat ttcggtggag aggagcagag	420
gttgtcctgg cgtggtttag gtagtgtgag agggtcggg ttcaaaacca cttgctgggt	480
ggggagtcgt cagtaagtgg ctatgccccg acccgaagc ctgtttcccc atctgtacaa	540
tggaaatgat aaagacgcc atctgatagg gtttttgtgg caaataaaca tttggttttt	600
ttgttttgtt ttgttttgtt ttttgagatg gaggtttgct ctgtcgccca ggctggagtg	660
cagtgcacaa atctcatctc accacaacct tcccctgcct cagcctccca agtagctggg	720

attacaagca tgtgccacca cacctggcta attttctatt tttagtagag acgggtttct	780
ccatgttggc cagcctcagc ctcccaagta actgggatta caggcctgtg ccaccacacc	840
cggctaattt tttctatttt tgacaggac ggggtttcac catgttggc aggctggctt	900
agaggtaccg gatcttgcta ccagtggaac agccactaag gattctgcag tgagagcaga	960
gggccagcta agtgggtactc tcccagagac tgtctgactc acgccacccc ctccaccttg	1020
gacacaggac gctgtgggtt ctgagccagg tacaatgact cttttcggta agtgcagtgg	1080
aagctgtaca ctgccaggc aaagcgtccg ggcagcgtag gcgggcgact cagatcccag	1140
ccagtggact tagcccctgt ttgctcctcc gataactggg gtgaccttg ttaatatcca	1200
ccagcagcct ccccggtgc ccctctggat ccactgctta aatacggacg aggacagggc	1260
cctgtctcct cagcttcagg caccaccact gacctgggac agtgccgcca ccatggaaga	1320
cgccaaaaac ataaagaaag gcccggcgcc attctatccg ctggaagatg gaaccgctgg	1380
agagcaactg cataaggcta tgaagagata cgccctggtt cctggaacaa ttgcttttac	1440
agatgcacat atcgagggtg acatcactta cgctgagtac ttcgaaatgt ccgttcggtt	1500
ggcagaagct atgaaacgat atgggctgaa tacaatcac agaatcgtcg tatgcagtga	1560
aaactctctt caattcttta tgccggtgtt gggcgcggtta tttatcggag ttgcagttgc	1620
gcccgcgaac gacatttata atgaacgtga attgctcaac agtatgggca tttcgcagcc	1680
taccgtgggtg ttcgtttcca aaaaggggtt gcaaaaaatt ttgaacgtgc aaaaaagct	1740
cccaatcatc caaaaaatta ttatcatgga ttctaaaacg gattaccagg gatttcagtc	1800
gatgtacacg ttcgtcacat ctcatctacc tcccggtttt aatgaatacg attttgtgcc	1860
agagtccttc gatagggaca agacaattgc actgatcatg aactcctctg gatctactgg	1920
tctgcctaaa ggtgtcgtc tgccatag aactgcctgc gtgagattct cgcatgccag	1980
agatcctatt tttggcaatc aaatcattcc ggatactgcg attttaagtg ttgttcatt	2040
ccatcacggt tttggaatgt ttactacact cggatatttg atatgtggat ttcgagtcgt	2100
cttaatgtat agatttgaag aagagctgtt tctgaggagc cttcaggatt acaagattca	2160
aagtgcgctg ctggtgcaa ccctattctc cttcttcgcc aaaagcactc tgattgacaa	2220
atacgattta tctaatttac acgaaattgc ttctggtggc gctcccctct ctaaggaagt	2280
cggggaagcg gttgccaaga ggttccatct gccaggatc aggcaaggat atgggctcac	2340
tgagactaca tcagctattc tgattacacc cgagggggat gataaacgg gcgcggtcgg	2400
taaagtgtt ccattttttg aagcgaagg tgtggatctg gataccggga aaacgctggg	2460
cgttaatcaa agaggcgaac tgttgtgtgag aggtcctatg attatgtccg gttatgtaaa	2520
caatccggaa gcgaccaacg ctttgattga caaggatgga tggctacatt ctggagacat	2580
agcttactgg gacgaagacg aacacttctt catcgttgac cgcctgaagt ctctgattaa	2640

gtacaaaggc tatcaggtgg ctcccgctga attggaatcc atcttgctcc aacaccccaa	2700
catcttcgac gcaggtgtcg caggtcttcc cgacgatgac gccggtgaac ttcccgccgc	2760
cgttgttggt ttggagcacg gaaagacgat gacggaaaaa gagatcgtgg attacgtcgc	2820
cagtcaagta acaaccgcga aaaagttgcg cggaggagt gtgtttgtgg acgaagtacc	2880
gaaaggtctt accggaaaac tcgacgcaag aaaaatcaga gagatcctca taaaggccaa	2940
gaagggcgga aagatcgccg tgtaagagca tcttaccgcc atttattccc atatttgttc	3000
tggttttctt gatttgggta tacatttaaa tgtaataaaa acaaaatggg ggggcaatca	3060
tttacatttt tagggatatg taattactag ttcaggtgta ttgccacaag acaaacatgt	3120
taagaaactt tcccgttatt tacgctctgt tcctgttaat caacctctgg attacaaaat	3180
ttgtgaaaga ttgactgata ttcttaacta tgttgctcct ttacgctgt gtggatatgc	3240
tgctttatag cctctgtatc tagctattgc ttcccgtagc gctttcgttt tctcctcctt	3300
gtataaatcc tgggtgctgt ctcttttaga ggagttgtgg ccggttgtcc gtcaacgtgg	3360
cgtgggtgtgc tctgtgtttg ctgacgcaac cccactggc tggggcattg ccaccacctg	3420
tcaactcctt tctgggactt tcgctttccc cctcccgatc gccacggcag aactcatcgc	3480
cgcctgcctt gcccgtgct ggacaggggc taggttgctg ggcactgata attccgtggg	3540
gttgctgtg ccttctagtt gccagccatc tgttgtttgc ccctccccg tgccttcctt	3600
gacctggaa ggtgccactc ccactgtcct ttcctaataa aatgaggaaa ttgcatcgca	3660
ttgtctgagt aggtgtcatt ctattctggg gggtggggtg gggcaggaca gcaaggggga	3720
ggattgggaa gacaatagca ggcatgctgg ggatgcggtg ggctctatgg caggaaacccc	3780
tagtgatgga gttggccact ccctctctgc gcgctcgtc gctcactgag gccgggcgac	3840
caaaggtcgc ccgacgcccg ggctttgccc gggcggcctc agtgagcgag cgagcgcgca	3900
gctgcctgca gg	3912

<210> 58

<211> 3906

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 58

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc	60
gggcgacctt tggctgcccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca	120
actccatcac taggggttcc tggctcagag gctcagaggc acacaggagt ttctgggctc	180
accctgcccc cttccaaccc ctcagttccc atcctccagc agctgtttgt gtgctgcctc	240
tgaagtccac actgaacaaa cttcagccta ctcatgtccc taaaatgggc aaacattgca	300

agcagcaaac agcaaacaca cagccctccc tgcctgctga ccttggagct ggggcagagg	360
tcagagacct ctctgggccc atgccacctc caacatccac tcgacccctt ggaatttcgg	420
tggagaggag cagaggttgt cctggcgtgg tttaggtagt gtgagagggt ccgggttcaa	480
aaccacttgc tgggtgggga gtcgtcagta agtggctatg ccccgacccc gaagcctgtt	540
tccccatctg tacaatggaa atgataaaga cgcccatctg atagggtttt tgtggcaaat	600
aaacatttgg tttttttgtt ttgttttgtt ttgttttttg agatggagggt ttgctctgtc	660
gcccaggctg gagtgcagtg acacaatctc atctcaccac aaccttcccc tgcctcagcc	720
tcccaagtag ctgggattac aagcatgtgc caccacacct ggctaatttt ctatttttag	780
tagagacggg tttctccatg ttggtcagcc tcagcctccc aagtaactgg gattacaggc	840
ctgtgccacc acacccggct aattttttct atttttgaca gggacgggggt ttcacatgt	900
tggtcaggct ggtctagagg taccgatctt tgctaccagt ggaacagcca ctaaggattc	960
tgcagtgaga gcagagggcc agctaagtgg tactctcca gagactgtct gactcacgcc	1020
acccctcca ccttggacac aggacgctgt ggtttctgag ccagggtacaa tgactccttt	1080
cggtaagtgc agtggaaact gtacactgcc caggcaaagc gtccgggcag ctaggcggg	1140
cgactcagat ccagccagt ggacttagcc cctgtttgct cctccgataa ctggggtgac	1200
cttggttaat attcaccagc agcctcccc gttagccctc tggatccact gcttaaatac	1260
ggacgaggac agggccctgt ctctcagct tcaggcacca ccactgacct gggacagtgc	1320
cgccaccatg gaagacgcca aaaacataaa gaaaggcccg gcgccattct atccgctgga	1380
agatggaacc gctggagagc aactgcataa ggctatgaag agatacgccc tggttcctgg	1440
aacaattgct ttacagatg cacatatcga ggtggacatc acttacgctg agtacttcga	1500
aatgtccgtt cggttggcag aagctatgaa acgatatggg ctgaatacaa atcacagaat	1560
cgtcgtatgc agtgaaaact ctcttcaatt ctttatgccg gtgttgggcg cgttatttat	1620
cggagttgca gttgcgccc cgaacgacat ttataatgaa cgtgaattgc tcaacagtat	1680
gggcatttcg cagcctaccg tgggtgttcgt ttccaaaaag gggttgcaaa aaattttgaa	1740
cgtgcaaaaa aagctcccaa tcatcaaaaa aattattatc atggattcta aaacggatta	1800
ccagggattt cagtcgatgt acacgttcgt cacatctcat ctacctccg gttttaatga	1860
atacgatttt gtgccagagt ctttcgatag ggacaagaca attgcactga tcatgaactc	1920
ctctggatct actggtctgc ctaaagggtgt cgctctgcct catagaactg cctgcgtgag	1980
attctcgcat gccagagatc ctatttttgg caatcaaadc attccggata ctgcgatttt	2040
aagtgttgtt ccattccatc acggttttgg aatgtttact acactcggat atttgatatg	2100
tggatttcga gtcgtcttaa tgtatagatt tgaagaagag ctgtttctga ggagccttca	2160
ggattacaag attcaaagtgc cgctgctgggt gccaaccccta ttctccttct tcgcaaaaag	2220

cactctgatt gacaaatacg atttatctaa ttacacgaa attgcttctg gtggcgctcc	2280
cctctctaag gaagtcgggg aagcggttgc caagaggttc catctgccag gtatcaggca	2340
aggatatggg ctactgaga ctacatcagc tattctgatt acacccgagg gggatgataa	2400
accgggcgcg gtcggtaaag ttgttccatt ttttgaagcg aaggttgtgg atctggatac	2460
cgggaaaacg ctgggcgtta atcaaagagg cgaactgtgt gtgagaggtc ctatgattat	2520
gtccggttat gtaaacaatc cggaagcgac caacgccttg attgacaagg atggatggct	2580
acattctgga gacatagctt actgggacga agacgaacac ttcttcatcg ttgaccgcct	2640
gaagtctctg attaagtaca aaggctatca ggtggctccc gctgaattgg aatccatctt	2700
gctccaacac cccaacatct tcgacgcagg tgtcgcaggc cttcccgcg atgacgccgg	2760
tgaacttccc gccgccgttg ttgttttggg gcacggaaag acgatgacgg aaaaagagat	2820
cgtggattac gtcgccagtc aagtaacaac cgcgaaaaag ttgcgcggag gaggttgtgt	2880
tgtggacgaa gtaccgaaag gtcttaccgg aaaactcgac gcaagaaaaa tcagagagat	2940
cctcataaag gccagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa gagcatctta ccgccattta	3000
ttcccatatt tgttctgttt ttcttgattt ggggtatacat ttaaattgta ataaaacaaa	3060
atggtggggc aatcatttac atttttaggg atatgtaatt actagttcag gtgtattgcc	3120
acaagacaaa catgttaaga aactttcccg ttattttacgc tctgttcctg ttaatcaacc	3180
tctggattac aaaatttgatg aaagattgac tgatattctt aactatgttg ctccttttac	3240
gctgtgtgga tatgctgctt tatagcctct gtatctagct attgcttccc gtacggcttt	3300
cgttttctcc tccttgata aatcctgggt gctgtctctt ttagaggagt tgtggcccgt	3360
tgtccgtcaa cgtggcgtgg tgtgctctgt gtttctgac gcaaccccca ctggctgggg	3420
cattgccacc acctgtcaac tcctttctgg gactttcgct ttccccctcc cgatcgccac	3480
ggcagaactc atcgccgcct gccttgcccg ctgctggaca ggggctaggt tgctgggcac	3540
tgataattcc gtggtgttgt ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg ttgcccctc	3600
ccccgtgcct tccttgaccc tggaagggtgc cactcccact gtcctttcct aataaaatga	3660
ggaaattgca tcgcattgtc tgagtaggtg tcattctatt ctgggggggtg gggtagggca	3720
ggacagcaag ggggaggatt gggaagacaa tagcaggcat gctggggatg cggtagggctc	3780
tatggcagga acccctagtg atggagttgg cactccctc tctgcgcgct cgctcgctca	3840
ctgaggccgc ccgggaaacc cgggcgtgcg cctcagttag cgagcgagcg cgcagctgcc	3900
tgagg	3906

<210> 59

<400> 59

000

<210> 60

<400> 60
000

<210> 61

<400> 61
000

<210> 62

<400> 62
000

<210> 63
<211> 126
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 63
cctgcaggca gctgcgctc cgctcgctca ctgaggccgc ccgggaaacc cgggcgtgcc 60
cgggcgcctc agtgagcgag cgagcgcgca gagaggaggt ggccaactcc atcactaggg 120
gttcct 126

<210> 64
<211> 120
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 64
aggaaccsct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
ccgcccggga aaccgggscg tgcgcctcag tgagcgagcg agcgcgcagc tgcctgcagg 120

<210> 65
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 65
gscgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcgtcgggc gacctttggt cggccggcct 60

<210> 66

<211> 141

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 66

aataaacgat aacgccgttg gtggcgtgag gcatgtaaaa ggttacatca ttatcttggt 60

cgccatccgg ttggtataaa tagacgttca tgttggtttt tgtttcagtt gcaagttggc 120

tgcggcgcgc gcagcacctt t 141

<210> 67

<211> 1876

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 67

cgcagccacc atggcggggt ttacgagat tgtgattaag gtccccagcg accttgacga 60

gcatctgccc ggcatttctg acagctttgt gaactgggtg gccgagaagg aatgggagtt 120

gccgccagat tctgacatgg atctgaatct gattgagcag gcaccctga ccgtggccga 180

gaagctgcag cgcgactttc tgacggaatg gcgccgtgtg agtaaggccc cggaggccct 240

tttctttgtg caatttgaga agggagagag ctacttccac atgcacgtgc tcgtggaaac 300

caccggggtg aaatccatgg ttttgggacg tttcctgagt cagattcgcg aaaaactgat 360

tcagagaatt taccgcggga tcgagccgac tttgccaaac tggttcgcgg tcacaaagac 420

cagaaatggc gccggaggcg ggaacaaggt ggtggatgag tgctacatcc ccaattactt 480

gctcccaaaa acccagcctg agctccagtg ggcgtggact aatatggaac agtatttaag 540

cgctgtttg aatctcacgg agcgtaaacg gttggtggcg cagcatctga cgcacgtgtc 600

gcagacgcag gagcagaaca aagagaatca gaatcccaat tctgatgcgc cggatgatcag 660

atcaaaaaact tcagccaggt acatggagct ggtcgggtgg ctctggaca aggggattac 720

ctcggagaag cagtggatcc aggaggacca ggcctcatac atctccttca atcggcctc 780

caactcgcgg tcccaaatca aggctgcctt ggacaatgcg ggaaagatta tgagcctgac 840

taaaaccgcc cccgactacc tgggtgggcca gcagcccgtg gaggacattt ccagcaatcg 900

gatttataaa attttgaac taaacgggta cgatcccaa tatgcggctt ccgtctttct 960

gggatgggcc acgaaaaagt tcggcaagag gaacaccatc tggctgtttg ggctgcaac 1020

taccgggaag accaacatcg cggaggccat agcccacact gtgcccttct acgggtgcgt	1080
aaactggacc aatgagaact ttcccttcaa cgactgtgtc gacaagatgg tgatctggtg	1140
ggaggagggg aagatgaccg ccaaggtcgt ggagtcggcc aaagccattc tcggaggaag	1200
caaggtgcgc gtggaccaga aatgcaagtc ctcggcccag atagaccga ctcccgtgat	1260
cgtcacctcc aacaccaaca tgtgcgccgt gattgacggg aactcaacga ctttcgaaca	1320
ccagcagccg ttgcaagacc ggatgttcaa atttgaactc acccgccgtc tggatcatga	1380
ctttgggaag gtcaccaagc aggaagtcaa agactttttc cgggtgggcaa aggatcacgt	1440
ggttgagggtg gagcatgaat tctacgtcaa aaagggtgga gccaagaaaa gacccgcccc	1500
cagtgcgcga gatataagtg agcccaaacg ggtgcgcgag tcagttgcgc agccatcgac	1560
gtcagacgcg gaagcttcga tcaactacgc agacaggtac caaaacaaat gttctcgtca	1620
cgtgggcatg aatctgatgc tgtttccctg cagacaatgc gagagaatga atcagaattc	1680
aaatatctgc ttcaactcacg gacagaaaga ctgttttagag tgctttcccg tgtcagaatc	1740
tcaaccggtt tctgtcgtca aaaaggcgta tcagaaactg tgctacattc atcatatcat	1800
gggaaagggtg ccagacgctt gcactgcctg cgatctggtc aatgtggatt tggatgactg	1860
catctttgaa caataa	1876

<210> 68
 <211> 129
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 полінуклеотид

<400> 68	
atcatggaga taattaataa gataaccatc tcgcaaataa ataagtattt tactgttttc	60
gtaacagttt tgtaataaaa aaacctataa atattccgga ttattcatac cgtcccacca	120
tcgggcgcgc	129

<210> 69
 <211> 1203
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 полінуклеотид

<400> 69	
gccgccacca tggagtgggt gggctggctc gtggacaaag gcattacttc ggaaaagcag	60
tggattcagg aggatcaggc atcttacatc tcattcaacg ctgccagtaa ctcgagggtcc	120
cagatcaagg cagcgtgga caacgcggga aagattatga gtctgacca aactgctcca	180

gactacctcg ttggtcagca accggtggaa gatattctcca gcaacaggat ctacaagatt	240
ctggagctca acggctacga ccctcaatac gctgcctcag tgttcttggg ttgggccacc	300
aagaaattcg gcaagagaaa cactatctgg ctgttcggcc ccgctaccac tggaaagaca	360
aacatcgcag aagcgattgc tcacacggtg ccattctacg gctgcgtcaa ctggacaaac	420
gagaacttcc cgttcaacga ctgtgtcgat aagatggtta tctgggtggga ggaaggaaag	480
atgacggcca aagtggtcga aagcgccaag gcaattctgg gtggctctaa agtgcgcgtc	540
gaccagaagt gcaaattctt agctcaaadc gatcctaccc ccgttattgt gacatcaaac	600
acgaacatgt gtgccgtgat cgacggaaac agtacaacgt tcgaacacca gcaacctctc	660
caggatcgta tgttcaagtt cgagctcacc cgccgtttgg accatgattt cggcaaggtc	720
actaaacaag aggttaagga cttcttccgc tgggctaaag atcacgttgt ggaggttgaa	780
catgagttct acgtcaagaa aggaggtgct aagaaacgtc cagccccgtc ggacgcagat	840
atctccgaac ctaagagggt gagagagtcg gtcgcacagc caagcacttc tgacgcagaa	900
gcttccatta actacgcaga taggtaccaa aacaagtgc gcagacacgt gggtatgaac	960
ttgatgctgt tcccatgccg ccagtgtgag cgtatgaacc aaaactctaa catctgtttc	1020
acacatggcc agaaggactg cctcgaatgt ttccctgtgt cagagagtca gcccgctctca	1080
gtcgtaaga aagcttacca aaagttgtgc tacatccacc atattatggg taaagtcctt	1140
gatgcctgta ccgcttgtga tctgggtcaac gtggatttgg acgactgtat tttcgagcaa	1200
taa	1203

<210> 70

<211> 388

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 70

gaacagagaa acaggagaat atgggccaaa caggatatct gtggtaagca gttcctgccc	60
cggctcaggg ccaagaacag ttggaacagc agaatatggg ccaaacagga tatctgtggt	120
aagcagttcc tgccccggct cagggccaag aacagatggt cccagatgc ggtcccgccc	180
tcagcagttt ctagagaacc atcagatggt tccagggtgc cccaaggacc tgaaatgacc	240
ctgtgcctta tttgaactaa ccaatcagtt cgcttctcgc ttctgttcgc gcgcttctgc	300
tccccgagct ctatataagc agagctcgtt tagtgaaccg tcagatcgcc tggagacgcc	360
atccacgctg ttttgacttc catagaag	388

<210> 71

<211> 1662

<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 71
gccgccacca tggaagacgc caaaaacata aagaaaggcc cggcgccatt ctatccgctg 60
gaagatggaa ccgctggaga gcaactgcat aaggctatga agagatacgc cctgggttcct 120
ggaacaattg cttttacaga tgcacatatc gaggtggaca tcacttacgc tgagtacttc 180
gaaatgtccg ttcggttggc agaagctatg aaacgatatg ggctgaatac aaatcacaga 240
atcgtcgtat gcagtgaaaa ctctcttcaa ttctttatgc cgggtgttggg cgcgttattt 300
atcggagttg cagttgcgcc cgcaacgac atttataatg aacgtgaatt gctcaacagt 360
atgggcattt cgcagcctac cgtgggtgtt gtttccaaaa aggggttgca aaaaattttg 420
aacgtgcaaa aaaagctccc aatcatccaa aaaattatta tcatggattc taaaacggat 480
taccagggat ttcagtcgat gtacacgttc gtcacatctc atctacctcc cggttttaat 540
gaatacgatt ttgtgccaga gtccttcgat agggacaaga caattgcact gatcatgaac 600
tcctctggat ctactggtct gcctaaaggt gtcgctctgc ctcatagaac tgcctgcgtg 660
agattctcgc atgccagaga tcctatTTTT ggcaatcaaa tcattccgga tactgcgatt 720
ttaagtgttg ttccattcca tcacggtttt ggaatgttta ctacactcgg atatttgata 780
tgtggatttc gagtcgtctt aatgtataga tttgaagaag agctgtttct gaggagcctt 840
caggattaca agattcaaag tgcgctgctg gtgccaacc tattctcctt cttcgccaaa 900
agcactctga ttgacaaata cgatttatct aatttacacg aaattgcttc tgggtggcgt 960
cccctctcta aggaagtcgg ggaagcgggt gccaaagagg tccatctgcc aggtatcagg 1020
caaggatatg ggctcactga gactacatca gctattctga ttacaccga ggggatgat 1080
aaaccgggcg cggtcggtaa agttgttcca ttttttgaag cgaaggttgt ggatctggat 1140
accgggaaaa cgctgggcgt taatcaaaga ggcaactgt gtgtgagagg tcctatgatt 1200
atgtccgggt atgtaaaca tccggaagcg accaacgcct tgattgacaa ggatggatgg 1260
ctacattctg gagacatagc ttactgggac gaagacgaac acttcttcat cgttgaccgc 1320
ctgaagtctc tgattaagta caaaggctat caggtggctc ccgctgaatt ggaatccatc 1380
ttgtccaac accccaacat cttcgacgca ggtgtcgag gtcttcccga cgatgacgcc 1440
ggatgaacttc ccgccgccgt tgttgttttg gagcacggaa agacgatgac ggaaaaagag 1500
atcgtggatt acgtcgccag tcaagtaaca accgcgaaaa agttgcgcgg aggagttgtg 1560
tttgtggacg aagtaccgaa aggtcttacc ggaaaactcg acgcaagaaa aatcagagag 1620
atcctcataa aggccaaaga gggcggaag atcgccgtgt aa 1662

<210> 72
<211> 581
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 72
gagcatctta cgcgcattta ttcccatatt tgttctgttt ttcttgattt gggatacat 60
ttaaagtgtta ataaaaaaca atggtggggc aatcatttac atttttaggg atatgtaatt 120
actagttcag gtgtattgcc acaagacaaa catgttaaga aactttcccg ttatttacgc 180
tctgttcctg ttaatcaacc tctggattac aaaatttgtg aaagattgac tgatattctt 240
aactatgttg ctctttttac gctgtgtgga tatgctgctt tatagcctct gtatctagct 300
attgcttccc gtacggcttt cgttttctcc tccttgata aatcctggtt gctgtctctt 360
ttagaggagt tgtggcccgt tgtccgtcaa cgtggcgtgg tgtgctctgt gtttgctgac 420
gcaaccccc actggctgggg cattgccacc acctgtcaac tcctttctgg gactttcgct 480
ttccccctcc cgatcgccac ggcagaactc atcgccgcct gccttgcccg ctgctggaca 540
ggggctagggt tgctgggcac tgataattcc gtggtgttgt c 581

<210> 73
<211> 225
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 73
tgtgccttct agttgccagc catctgttgt ttgcccctcc cccgtgcctt ccttgaccct 60
ggaagggtgcc actcccactg tcctttccta ataaaatgag gaaattgcat cgattgtct 120
gagtaggtgt cattctattc tgggggggtgg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg 180
ggaagacaat agcaggcatg ctggggatgc ggtgggctct atggc 225

<210> 74
<211> 1177
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 74
ggctcagagg ctgaggga cacaggagt tctgggctca ccctgcccc ttccaacccc 60
tcagttccca tcctccagca gctgtttgtg tgctgcctct gaagtccaca ctgaacaac 120

ttcagcctac tcatgtccct aaaatgggca aacattgcaa gcagcaaaca gcaaacacac	180
agccctccct gcctgctgac cttggagctg gggcagaggt cagagacctc tctgggcccc	240
tgccacctcc aacatccact cgaccccttg gaatttcggt ggagaggagc agaggttgtc	300
ctggcgtggt ttaggtagtg tgagagggtc cgggttcaaa accacttgct gggtagggag	360
tcgtcagtaa gtggctatgc cccgaccccg aagcctgttt ccccatctgt acaatggaaa	420
tgataaagac gcccatctga tagggttttt gtggcaaata aacatttggt tttttgttt	480
tgtttgtttt tgttttttga gatggagggt tgctctgtcg cccaggctgg agtgcagtga	540
cacaatctca tctcaccaca accttcccct gcctcagcct cccaagtagc tgggattaca	600
agcatgtgcc accacacctg gctaattttc tatttttagt agagacgggt ttctccatgt	660
tggtcagcct cagcctcca agtaactggg attacaggcc tgtgccacca caccggcta	720
atTTTTtcta tttttgacag ggacggggtt tcacatgtt ggtaggctg gtctagagggt	780
accggatctt gctaccagtg gaacagccac taaggattct gcagtgagag cagagggcca	840
gctaagtgggt actctcccag agactgtctg actcacgcca cccctccac cttggacaca	900
ggacgctgtg gtttctgagc caggtacaat gactcctttc ggtaagtgca gtggaagctg	960
tacactgccc aggcaaagcg tccgggcagc gtaggcgggc gactcagatc ccagccagtg	1020
gacttagccc ctgtttgctc ctccgataac tggggtgacc ttggttaata ttcaccagca	1080
gcctcccccg ttgcccctct ggatccactg cttaaatacg gacgaggaca gggccctgtc	1140
tcctcagctt caggcaccac cactgacctg ggacagt	1177

<210> 75

<400> 75
000

<210> 76

<400> 76
000

<210> 77

<400> 77
000

<210> 78

<400> 78
000

<210> 79

<400> 79
000

<210> 80

<400> 80
000

<210> 81

<400> 81
000

<210> 82

<400> 82
000

<210> 83

<400> 83
000

<210> 84

<400> 84
000

<210> 85

<400> 85
000

<210> 86

<400> 86
000

<210> 87

<400> 87
000

<210> 88

<400> 88
000

<210> 89

<400> 89
000

<210> 90

<400> 90
000

<210> 91

<400> 91
000

<210> 92

<400> 92
000

<210> 93

<400> 93
000

<210> 94

<400> 94
000

<210> 95

<400> 95
000

<210> 96

<400> 96
000

<210> 97

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 97

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggсg accaaaggtc gcccгacгcc cggгcггсct 60

сagtgagсga гсgagсгсгс 80

<210> 98

<211> 72

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний

олігонуклеотид

<400> 98
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacggc ctcagtgagc 60
 gagcgagcgc gc 72

<210> 99
 <211> 122
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 полінуклеотид

<400> 99
 aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
 ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacggcctc agtgagcgag cgagcgcgca gctgcctgca 120
 gg 122

<210> 100
 <211> 130
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 полінуклеотид

<400> 100
 aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
 ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacggcgg gggcctcag tgagcgagcg agcgcgcagc 120
 tgcctgcagg 130

<210> 101
 <211> 70
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 101
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggaaccccg gcgtgcgct cagtgagcga 60
 gcgagcgcgc 70

<210> 102
 <211> 70
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний

олігонуклеотид

<400> 102	
gcgcgctcgc tcgctcactg aggcgcacgc ccgggtttcc cgggcggcct cagtgcgca	60
gcgagcgcgc	70
<210> 103	
<211> 72	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 103	
gcgcgctcgc tcgctcactg aggcgcgcgc gcgacctttg gtcgcccggc ctgcgtgagc	60
gagcgagcgc gc	72
<210> 104	
<211> 72	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 104	
gcgcgctcgc tcgctcactg aggcggggcg accaaaggc gcccgcggc ctgcgtgagc	60
gagcgagcgc gc	72
<210> 105	
<211> 72	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 105	
gcgcgctcgc tcgctcactg aggcggcccg ggcaaggcc gggcgctcggc ctgcgtgagc	60
gagcgagcgc gc	72
<210> 106	
<211> 72	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 106	
gcgcgctcgc tcgctcactg aggcgcacgc ccgggctttg cccgggcggc ctgcgtgagc	60

gagcgagcgc gc

72

<210> 107

<211> 83

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 107

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcaaagccc gggcgtcggg ctttgcccgg 60

cctcagtgag cgagcgagcg cgc 83

<210> 108

<211> 83

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 108

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggca aagcccgcgc cccgggcttt gcccgggcgg 60

cctcagtgag cgagcgagcg cgc 83

<210> 109

<211> 77

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 109

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgaaac gtcgggcgac ctttggtcgc ccggcctcag 60

tgagcgagcg agcgcgc 77

<210> 110

<211> 77

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 110

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgtt tcggcctcag 60

tgagcgagcg agcgcgc 77

<210> 111
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

 <400> 111
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggcaaagcc tcagtgagcg agcgagcgcg c 51

 <210> 112
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

 <400> 112
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggctttgcc tcagtgagcg agcgagcgcg c 51

 <210> 113
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

 <400> 113
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcgtcgggc gacctttggt cgcccggcct 60
 cagtgagcga gcgagcgcgс 80

 <210> 114
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

 <400> 114
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggсg ассааaggtc gcccгacгcc cggгcггсct 60
 cagtгagсga gсgagсгсгс 80

 <210> 115
 <211> 77
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 115
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggcgccccgg gcgtcgggcg acctttggtc gcccggcctc 60
 agtgagcgag cgagcgc 77

<210> 116
 <211> 79
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 116
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggcggggcg ассааaggtc gcccgacgcc cgggcgcctc 60
 agtgagcgag cgagcgcgc 79

<210> 117
 <211> 89
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 117
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggcgccccg ggcaaagccc gggcgtcggg cgactttgtc 60
 gcccggcctc agtgagcgag cgagcgcgc 89

<210> 118
 <211> 89
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 118
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggcggggcg асааagtcgc cgcacgcccg ggctttgccc 60
 gggcggcctc agtgagcgag cgagcgcgc 89

<210> 119
 <211> 87
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 119
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggcgccccg ggcaaagccc gggcgtcggg cgattttcgc 60

ccggcctcag tgagcgagcg agcgcgс

87

<210> 120

<211> 87

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 120

gсgсgctcгс tcгctcactg aggcсggгсg aaaatcgccc gacгcccggg ctttgcccgg

60

gсggcctcag tgagcgagcg agcgcgс

87

<210> 121

<211> 85

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 121

gсgсgctcгс tcгctcactg aggcсgcccг ggcaaagccc gggcgtcggg cgtttcgccc

60

ggcctcagtg agcgagcgag cгсгс

85

<210> 122

<211> 85

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 122

gсgсgctcгс tcгctcactg aggcсggгсg aaacгcccga cгcccgggct ttgcccgggc

60

ggcctcagtg agcgagcgag cгсгс

85

<210> 123

<211> 89

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 123

gсgсgctcгс tcгctcactg aggcсgcccг ggaaaccсgg гсgtcggгсg acctttggtc

60

gcccggcctc agtgagcgag cгagcgсгс

89

<210> 124
 <211> 89
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 124
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg ассааaggtc gcccгacгcc cgggtttccc 60
 gggcggcctc agtgagcgag cgagcgcg 89

<210> 125
 <211> 87
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 125
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccг gaaaccgggc gtcgggгac ctttggtcgc 60
 ccggcctcag tgagcgagcg агсгсгс 87

<210> 126
 <211> 87
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 126
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggгг ассааaggtc gcccгacгcc cggtttccгг 60
 gcggcctcag tgagcgagcg агсгсгс 87

<210> 127
 <211> 85
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 127
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccг aaaccgggгgt cgggгacct ttggtгccc 60
 ggcctcagtg агсгagcgag cгсгс 85

<210> 128
 <211> 85
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 128

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg ассааaggтс gcccгacгсс cgtttcgggc 60

ggcctcagtg агсgаgсgаg сgсгс 85

<210> 129

<211> 83

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 129

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgссса аaggгсгтсг ggcгacттт ggtcгсссгг 60

сctcagtgag сgаgсgаgсг сгс 83

<210> 130

<211> 83

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 130

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggсг ассааaggтс gcccгacгсс ctttggгсгг 60

сctcagtgag сgаgсgаgсг сгс 83

<210> 131

<211> 81

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 131

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccгссаа aggcгтсггг сgacттттгг tcгсссггсс 60

тсagtgаgсг агсgаgсгсг с 81

<210> 132

<211> 81

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 132
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggct gcccgacgcc ttggcgggcc 60
 tcagtgcgcg agcgagcgcg c 81

<210> 133
 <211> 79
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 133
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcaaa gcgtcgggcg acctttggct gcccggcctc 60
 agtgagcgag cgagcgcgcg 79

<210> 134
 <211> 79
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 134
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggct gcccgacgct ttgcggcctc 60
 agtgagcgag cgagcgcgcg 79

<210> 135
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 135
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggct gcccgagcc cgggctgcct 60
 cagtgcgcga gcgagcgcgcg 80

<210> 136
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 136
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggct gcccgacacc cgggtggcct 60

cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 137

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 137

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg ассааaggтс gcccгacгac cggтcggcct 60

cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 138

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 138

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg ассааaggтс gcccгacгca cgtгcggcct 60

cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 139

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 139

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg ассааaggтс gcccгacгcc atggcggcct 60

cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 140

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 140

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg ассааaggтс gcccгаagac cggтctгcct 60

cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 141

<211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 141
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggсg ассааaggtc gcccгacaca cgtgtggcct 60
 cagtгagсga gсgagсgсgс 80

<210> 142
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 142
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggсg ассааaggtc gcccгacгac atgtcгgcct 60
 cagtгagсga gсgagсgсgс 80

<210> 143
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 143
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggсg ассааaggtc gcccгaaгca cgtгctгcct 60
 cagtгagсga gсgagсgсgс 80

<210> 144
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 144
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggсg ассааaggtc gcccгaaacc cgggttgсct 60
 cagtгagсga gсgagсgсgс 80

<210> 145
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 145
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg ассааaggtc gcccgaagcc atggctgcct 60
 cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 146
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 146
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg ассааaggtc gcccгасаас cggttgccct 60
 cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 147
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 147
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg ассааaggtc gcccгacacc atggtggcct 60
 cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 148
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 148
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg ассааaggtc gcccгacгaa cgttcggcct 60
 cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 149
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 149
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggct gcccgacgca attgcggcct 60
 cagtgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 150
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 150
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggct gcccgaaaac cgtttgcct 60
 cagtgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 151
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 151
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggct gcccgaaaga cgttctgcct 60
 cagtgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 152
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 152
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggct gcccgagca attgctgcct 60
 cagtgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 153
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 153
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggct gcccgaaaa cgtttgcct 60

cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 154

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 154

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg ассааaggтс gcccгacгaa atttcggcct 60

cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 155

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 155

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg ассааaggтс gcccгaaгca attgctgcct 60

cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 156

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 156

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg ассааaggтс gcccгaaacc atggttgctt 60

cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 157

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 157

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg ассааaggтс gcccгacaac atgttgctt 60

cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 158

<211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 158
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccggggcg ассааaggтс gcccgaagac atgtctgcct 60
 cagtгagcga gcgagcgcgс 80

<210> 159
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 159
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccggggcg ассааaggтс gcccгacaca attgtggcct 60
 cagtгagcga gcgagcgcgс 80

<210> 160
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 160
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccggggcg ассааaggтс gcccгaaaaa cgttttgcct 60
 cagtгagcga gcgagcgcgс 80

<210> 161
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 161
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccggggcg ассааaggтс gcccгaaaac atgtttgcct 60
 cagtгagcga gcgagcgcgс 80

<210> 162
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 162
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggсg ассааaggtc gcccgaaca attgttcct 60
 cagtгagcга gcgagcgсgc 80

<210> 163
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 163
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggсg ассааaggtc gcccgaaga atttctgcct 60
 cagtгagcга gcgagcgсgc 80

<210> 164
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 164
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggсg ассааaggtc gcccгacaaa attttgcct 60
 cagtгagcга gcgagcgсgc 80

<210> 165
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 165
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggсg ассааaggtc gcccгaaaaa atttttcct 60
 cagtгagcга gcgagcgсgc 80

<210> 166
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 166
 gcgcgctcgc tcgctcgctg aggccgggcg accaaaggct gcccgacgcc cgggcggcct 60
 cagcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 167
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 167
 gcgcgctcgc tcgctcaatg aggccgggcg accaaaggct gcccgacgcc cgggcggcct 60
 cattgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 168
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 168
 gcgcgctcgc tcgctcaccg aggccgggcg accaaaggct gcccgacgcc cgggcggcct 60
 cggtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 169
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 169
 gcgcgctcgc tcgctcacta aggccgggcg accaaaggct gcccgacgcc cgggcggcct 60
 tagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 170
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 170
 gcgcgctcgc tcgctcactg gggccgggcg accaaaggct gcccgacgcc cgggcggccc 60

cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 171

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 171

gcgcgctcgc tcgctcactg aagccgggcg ассааaggтс gcccгacгсс cgggcggctt 60

cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 172

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 172

gcgcgctcgc tcgctcactg agaccgggcg ассааaggтс gcccгacгсс cgggcgggtct 60

cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 173

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 173

gcgcgctcgc tcgctcgatg aggccgggcg ассааaggтс gcccгacгсс cgggcggcct 60

catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 174

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 174

gcgcgctcgc tcgctcgagg aggccgggcg ассааaggтс gcccгacгсс cgggcggcct 60

ccgcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 175

<211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 175
 gcgcgctcgc tcgctcgcta aggccgggсg ассааaggtc gcccгacгcc cgggcggcct 60
 tagtgagcga gcgagcgсгс 80

<210> 176
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 176
 gcgcgctcgc tcgctcgctg gggccgggсg ассааaggtc gcccгacгcc cgggcggccc 60
 cagcgagcga gcgagcgсгс 80

<210> 177
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 177
 gcgcgctcgc tcgctcgctg aagccgggсg ассааaggtc gcccгacгcc cgggcggctt 60
 cagcgagcga gcgagcgсгс 80

<210> 178
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 178
 gcgcgctcgc tcgctcgctg agaccgggсg ассааaggtc gcccгacгcc cgggcgggtct 60
 cagcgagcga gcgagcgсгс 80

<210> 179
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 179
 gcgcgctcgc tcgctcgagg aggccgggсg ассааaggtc gcccгacгcc cgggcggcct 60
 cctcgagcga gсgagcгcгс 80

<210> 180
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 180
 gcgcgctcgc tcgctcgata aggccgggсg ассааaggtc gcccгacгcc cgggcggcct 60
 tatcgagcga gсgagcгcгс 80

<210> 181
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 181
 gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccgggсg ассааaggtc gcccгacгcc cgggcggcct 60
 catcgagcga gсgagcгcгс 80

<210> 182
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 182
 gcgcgctcgc tcgctcgatg aagccgggсg ассааaggtc gcccгacгcc cgggcggcct 60
 catcgagcga gсgagcгcгс 80

<210> 183
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 183
 gcgcgctcgc tcgctcgatg agaccgggcg accaaaggctc gcccgacgcc cgggcgggtct 60
 catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 184
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 184
 gcgcgctcgc tcgctcgaga aggccgggcg accaaaggctc gcccgacgcc cgggcggcct 60
 tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 185
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 185
 gcgcgctcgc tcgctcgagg gggccgggcg accaaaggctc gcccgacgcc cgggcggccc 60
 cctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 186
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 186
 gcgcgctcgc tcgctcgagg aagccgggcg accaaaggctc gcccgacgcc cgggcggcctt 60
 cctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 187
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 187
 gcgcgctcgc tcgctcgagg gggccgggcg accaaaggctc gcccgacgcc cgggcggccc 60
 cctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 188
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 188
gcgcgctcgc tcgctcgagg aagccgggcg ассааaggтс gcccгacгсс cgggcggctt 60
cctcgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 189
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 189
gcgcgctcgc tcgctcgagg agaccgggcg ассааaggтс gcccгacгсс cgggcggтct 60
cctcgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 190
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 190
gcgcgctcgc tcgctcgaga gggccgggcg ассааaggтс gcccгacгсс cgggcggccc 60
tctcgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 191

<400> 191
000

<210> 192

<400> 192
000

<210> 193

<400> 193
000

<210> 194

<400> 194
000

<210> 195

<400> 195
000

<210> 196

<400> 196
000

<210> 197

<400> 197
000

<210> 198

<400> 198
000

<210> 199

<400> 199
000

<210> 200

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 200

gcgcgctcgc tcgctcgaga aagccgggсg accaaaggtc gcccгacгcc cgggcggcctt 60

tctcgagcga gcgagcgсgc 80

<210> 201

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 201

gcgcgctcgc tcgctcgaga agaccgggсg accaaaggtc gcccгacгcc cgggcggcct 60

tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 202

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 202

gcgcgctcgc tcgctcgaga gagccgggcg ассааaggтс gcccгacгсс cgggcggггтс 60

tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 203

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 203

gcgcgctcgc tcgctcgaga ggaccgggcg ассааaggтс gcccгacгсс cgggcggггтс 60

tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 204

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 204

gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccgggcg ассааaggтс gcccгacгсс cgggcggггтс 60

tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 205

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 205

gcgcgctcgc tcgctcaaga gaaccgggcg ассааaggтс gcccгacгсс cgggcggггтс 60

tcttgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 206

<211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 206
 gcgcgctcgc tcgctcacga gaaccgggcg ассааaggtc gcccгacгcc cgggcggttc 60
 tcgtgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 207
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 207
 gcgcgctcgc tcgctcacta gaaccgggcg ассааaggtc gcccгacгcc cgggcggttc 60
 tagtgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 208
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 208
 gcgcgctcgc tcgctcactg gaaccgggcg ассааaggtc gcccгacгcc cgggcggttc 60
 cagtgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 209
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 209
 gcgcgctcgc tcgctcactg aaaccgggcg ассааaggtc gcccгacгcc cgggcggttt 60
 cagtgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 210
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 210
 gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggccgggcg ассааaggtc gcccгacгcc cgggcggccc 60
 ccgcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 211
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 211
 gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccgggcg ассааaggtc gcccгacгcc cgggcggttt 60
 tattgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 212
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 212
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccaggcg ассааaggtc gcctгacгcc cgggcggcct 60
 cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 213
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 213
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgagcg ассааaggtc gctгacгcc cgggcggcct 60
 cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 214
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 214
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccggacg accaaaggtc gtccgacgcc cgggcggcct 60
 cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 215
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 215
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggag accaaaggtc tcccgacgcc cgggcggcct 60
 cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 216
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 216
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggca accaaagggt gcccgacgcc cgggcggcct 60
 cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 217
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 217
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg gccaaaggcc gcccgacgcc cgggcggcct 60
 cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 218
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 218
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg aacaaagttc gcccgacgcc cgggcggcct 60
 cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 219
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 219
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg acaaaatgtc gcccgacgcc cgggcggcct 60
cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 220
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 220
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccaaagcg ассааaggtc gcttgacgcc cgggcggcct 60
cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 221
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 221
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccaaaag ассааaggtc gtttgacgcc cgggcggcct 60
cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 222
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 222
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccaaaaag ассааaggtc ttttgacgcc cgggcggcct 60
cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 223
<211> 80

<212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 223
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccaaaaa ассааaggtt ttttgacgcc cgggcggcct 60
 cagtгagcga gcgagcgcgс 80

<210> 224
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 224
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccaaaaa гссааaggct ttttgacgcc cgggcggcct 60
 cagtгagcga gcgagcgcgс 80

<210> 225
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 225
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccaaaaa гасааagtct ttttgacgcc cgggcggcct 60
 cagtгagcga gcgagcgcgс 80

<210> 226
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 226
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccaaaaa гааааattct ttttgacgcc cgggcggcct 60
 cagtгagcga gcgagcgcgс 80

<210> 227
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 227

gcgcgctcgc tcgctcactg aggcсааааа аааааtttt ttttgacgcc cgggcggcct 60

cagtгagcga gcgagcgcgс 80

<210> 228

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 228

gcgcgctcgc tcgctcactg aggcсgаааа аааааtttt tttcgacgcc cgggcggcct 60

cagtгagcga gcgagcgcgс 80

<210> 229

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 229

gcgcgctcgc tcgctcactg aggcсggааа gааааattct ttccgacgcc cgggcggcct 60

cagtгagcga gcgagcgcgс 80

<210> 230

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 230

gcgcgctcgc tcgctcactg aggcсgggаа gааааattct tcccгacgcc cgggcggcct 60

cagtгagcga gcgagcgcgс 80

<210> 231

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 231

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggca gaaaaattct gcccgacgcc cgggcggcct	60
cagtgagcga gcgagcgcgc	80
<210> 232	
<211> 80	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 232	
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg gaaaaattcc gcccgacgcc cgggcggcct	60
cagtgagcga gcgagcgcgc	80
<210> 233	
<211> 80	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 233	
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg aaaaaatttc gcccgacgcc cgggcggcct	60
cagtgagcga gcgagcgcgc	80
<210> 234	
<211> 80	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 234	
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccaggcg accaaaggtc gcctgacacc cgggtggcct	60
cagtgagcga gcgagcgcgc	80
<210> 235	
<211> 80	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 235	
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccaggcg accaaaggtc gcctgacgcc atggcggcct	60
cagtgagcga gcgagcgcgc	80

<210> 236
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 236
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccaggcg ассааaggтс gcctgacgac atgtcggcct 60
cagtгagcgа gcgagcgcgс 80

<210> 237
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 237
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccaggcg ассааaggтс gcctgacgaa cgttcggcct 60
cagtгagcgа gcgagcgcgс 80

<210> 238
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 238
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccaggcg ассааaggтс gcctgaagca attgctgcct 60
cagtгagcgа gcgagcgcgс 80

<210> 239
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 239
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccggggcg gccaaaggcc gcccgacacc cgggtggcct 60
cagtгagcgа gcgagcgcgс 80

<210> 240
<211> 80

<212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 240
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccggggcg gssaaaggcc gcccgacgcc atggcggcct 60
 cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 241
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 241
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccggggcg gssaaaggcc gcccgacgac atgtcggcct 60
 cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 242
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 242
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccggggcg gssaaaggcc gcccgacgaa cgttcggcct 60
 cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 243
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 243
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccggggcg gssaaaggcc gccggaagca attgctgcct 60
 cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 244
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 244

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg acaaaatgtc gcccgcacacc cgggtggcct 60

cagtgcgcga gcgagcgcgс 80

<210> 245

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 245

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg acaaaatgtc gcccgcacgc atggcggcct 60

cagtgcgcga gcgagcgcgс 80

<210> 246

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 246

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg acaaaatgtc gcccgcacgc atgtcggcct 60

cagtgcgcga gcgagcgcgс 80

<210> 247

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 247

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg acaaaatgtc gcccgcacgaa cgttcggcct 60

cagtgcgcga gcgagcgcgс 80

<210> 248

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 248
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg acaaaatgtc gcccgaagca attgctgcct 60
 cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 249
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 249
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccaaaaag accaaaggctc ttttgacacc cgggtggcct 60
 cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 250
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 250
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccaaaaag accaaaggctc ttttgacgcc atggcggcct 60
 cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 251
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 251
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccaaaaag accaaaggctc ttttgacgac atgtcggcct 60
 cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 252
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 252
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccaaaaag accaaaggctc ttttgacgaa cgttcggcct 60
 cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 253
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 253
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccaaaaag accaaaggtc ttttgaagca attgctgcct 60
cagtgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 254
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 254
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccaaaaa aaaaaatttt ttttgacacc cgggtggcct 60
cagtgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 255
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 255
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccaaaaa aaaaaatttt ttttgacgcc atggcgсcct 60
cagtgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 256
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 256
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccaaaaa aaaaaatttt ttttgacgac atgtcgсcct 60
cagtgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 257
<211> 80

<212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 257
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccaaaaa aaaaaatttt ttttgacgaa cgttcggcct 60
 cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 258
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 258
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccaaaaa aaaaaatttt ttttgaagca attgctgcct 60
 cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 259
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 259
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggca gaaaaattct gcccgcaccc cgggtggcct 60
 cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 260
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 260
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggca gaaaaattct gcccgcgcgc atggcggcct 60
 cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 261
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 261

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggca gaaaaattct gcccgcacac atgtcggcct 60

cagtgcgcga ggcgagcgcg 80

<210> 262

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 262

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggca gaaaaattct gcccgcacaa cgttcggcct 60

cagtgcgcga ggcgagcgcg 80

<210> 263

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 263

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggca gaaaaattct gcccgaagca attgctgcct 60

cagtgcgcga ggcgagcgcg 80

<210> 264

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 264

gcgcgctcgc tcgctcacta aggccaggcg accaaaggct gcctgacgcc cgggcggcct 60

tagtgagcga ggcgagcgcg 80

<210> 265

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 265
 gcgcgctcgc tcgctcacta aggccggggcg gccaaaggcc gcccgacgcc cgggcggcct 60
 tagtgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 266
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 266
 gcgcgctcgc tcgctcacta aggccggggcg acaaaatgtc gcccgacgcc cgggcggcct 60
 tagtgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 267
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 267
 gcgcgctcgc tcgctcacta aggccaaaaag accaaaggtc ttttgacgcc cgggcggcct 60
 tagtgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 268
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 268
 gcgcgctcgc tcgctcacta aggccaaaaa aaaaaatttt ttttgacgcc cgggcggcct 60
 tagtgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 269
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 269
 gcgcgctcgc tcgctcacta aggccggggca gaaaaattct gcccgacgcc cgggcggcct 60
 tagtgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 270
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 270
gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccaggcg ассааaggtc gcctgacgcc cgggcggcct 60
catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 271
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 271
gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccgggcg гссааaggcc gcccгacgcc cgggcggcct 60
catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 272
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 272
gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccgggcg асаааатgtc gcccгacgcc cgggcggcct 60
catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 273
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 273
gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccааааg ассааaggtc ttttgacgcc cgggcggcct 60
catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 274

<211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 274
 gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccaaaaa aaaaaatttt ttttgacgcc cgggcggcct 60
 catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 275
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 275
 gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccgggca gaaaaattct gcccgcgcc cgggcggcct 60
 catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 276
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 276
 gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccaggcg accaaaggtc gcctgacgcc cgggcgggttc 60
 tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 277
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 277
 gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccgggcg gccaaaggcc gcccgcgcc cgggcgggttc 60
 tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 278
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 278
 gcgctcgc tcgctcgaga gaaccgggcg acaaaatgtc gcccgcgccc cgggcggttc 60
 tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 279
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 279
 gcgctcgc tcgctcgaga gaaccsaaaag accsaaagtc ttttgacgcc cgggcggttc 60
 tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 280
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 280
 gcgctcgc tcgctcgaga gaaccsaaaaa aaaaaatttt ttttgacgcc cgggcggttc 60
 tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 281
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 281
 gcgctcgc tcgctcgaga gaaccgggca gaaaaattct gcccgcgccc cgggcggttc 60
 tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 282
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 282
 gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggccaggcg accaaaggct gcctgacgcc cgggcggccc 60
 ccgcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 283
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 283
 gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggccgggcg gscaaaggcc gcccgacgcc cgggcggccc 60
 ccgcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 284
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 284
 gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggccgggcg acaaaatgct gcccgacgcc cgggcggccc 60
 ccgcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 285
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 285
 gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggcscaaaag accaaaggct ttttgacgcc cgggcggccc 60
 ccgcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 286
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 286
 gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggcscaaaaa aaaaaatttt ttttgacgcc cgggcggccc 60

ccgсgаgсgа gсgаgсgсgс

80

<210> 287

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 287

gсgсgсtсgс tсgсtсgсgг gggссgggсa gааааattсt gсссgасgсс сggгсgгссс

60

ссgсgаgсgа gсgаgсgсgс

80

<210> 288

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 288

gсgсgсtсgс tсgсtсaаtа ааaccaggсg ассааaggтс gссtгacгсс сggгсgгттт

60

tattgаgсgа gсgаgсgсgс

80

<210> 289

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 289

gсgсgсtсgс tсgсtсaаtа ааaccggгсg gссааaggсс gсссgасgсс сggгсgгттт

60

tattgаgсgа gсgаgсgсgс

80

<210> 290

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 290

gсgсgсtсgс tсgсtсaаtа ааaccggгсg асаааatгтс gсссgасgсс сggгсgгттт

60

tattgаgсgа gсgаgсgсgс

80

<210> 291
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 291
gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccaaaaag accaaaggtc ttttgacgcc cgggcgggttt 60
tattgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 292
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 292
gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccaaaaa aaaaaatttt ttttgacgcc cgggcgggttt 60
tattgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 293
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 293
gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccgggca gaaaaattct gcccgcgcc cgggcgggttt 60
tattgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 294
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 294
gcgcgctcgc tcgctcacta aggccgggcg accaaaggtc gcccgcacc cgggtggcct 60
tagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 295
<211> 80
<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 295

gcgcgctcgc tcgctcacta aggccggggcg ассааaggтс gcccгacгсс atggcgгссt 60

tagtgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 296

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 296

gcgcgctcgc tcgctcacta aggccggggcg ассааaggтс gcccгacгac atgtcgгссt 60

tagtgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 297

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 297

gcgcgctcgc tcgctcacta aggccggggcg ассааaggтс gcccгacгaa cgttcggссt 60

tagtgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 298

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 298

gcgcgctcgc tcgctcacta aggccggggcg ассааaggтс gcccгaagca attgctгссt 60

tagtgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 299

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний

олігонуклеотид

<400> 299
gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccgggcg ассааaggтс gcccгacacc cgggtggcct 60
catcgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 300
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 300
gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccgggcg ассааaggтс gcccгacgcc atggcggcct 60
catcgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 301
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 301
gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccgggcg ассааaggтс gcccгacгac atgtcggcct 60
catcgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 302
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 302
gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccgggcg ассааaggтс gcccгacgaa cgttcggcct 60
catcgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 303
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 303
gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccgggcg ассааaggтс gcccгaagca attgctgcct 60

catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 304

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 304

gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccgggсg ассааaggtc gcccгacacc cgggtggttc 60

tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 305

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 305

gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccgggсg ассааaggtc gcccгacгcc atggcggttc 60

tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 306

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 306

gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccgggсg ассааaggtc gcccгacгac atgtcggttc 60

tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 307

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 307

gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccgggсg ассааaggtc gcccгacгaa cgttcggttc 60

tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 308
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 308
 gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccgggcg ассааaggтс gcccgaagca attgctgttc 60
 tctcgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 309
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 309
 gcgcgctcgc tcgctcgсgg gggccgggсg ассааaggтс gcccгacacc cgggtggccc 60
 ccгcгagcga гсгagcgсгс 80

<210> 310
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 310
 gcgcgctcgc tcgctcgсgg gggccgggсg ассааaggтс gcccгacгсс atggcggccc 60
 ccгcгagcga гсгagcgсгс 80

<210> 311
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 311
 gcgcgctcgc tcgctcgсgg gggccgggсg ассааaggтс gcccгacгac atgtcggccc 60
 ccгcгagcga гсгagcgсгс 80

<210> 312
 <211> 80
 <212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 312

gсgсgctcgc tcgctcgcgg gggccgggсg ассааaggtc gcccгacгaa cgttcggccc 60

ссгсgagсga gсgagсgсгс 80

<210> 313

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 313

gсgсgctcgc tcgctcgcgg gggccgggсg ассааaggtc gcccгaagca attgctgccc 60

ссгсgagсga gсgagсgсгс 80

<210> 314

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 314

gсgсgctcgc tcgctcaata aaaccgggсg ассааaggtc gcccгacacc cgggtggttt 60

tattgagсga gсgagсgсгс 80

<210> 315

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 315

gсgсgctcgc tcgctcaata aaaccgggсg ассааaggtc gcccгacгcc atggcggttt 60

tattgagсga gсgagсgсгс 80

<210> 316

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 316

gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccgggcg accaaaggct gcccgacgac atgtcggttt 60

tattgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 317

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 317

gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccgggcg accaaaggct gcccgacgaa cgttcggttt 60

tattgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 318

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 318

gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccgggcg accaaaggct gcccgagca attgctgttt 60

tattgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 319

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 319

gcgcgctcgc tcgctcacta aggccaggcg accaaaggct gcctgacacc cgggtggcct 60

tagtgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 320

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 320

gcgcgctcgc tcgctcacta aggccaggcg accaaaggtc gcctgacgcc atggcggcct	60
tagtgagcga gcgagcgcgc	80
<210> 321	
<211> 80	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 321	
gcgcgctcgc tcgctcacta aggccaggcg accaaaggtc gcctgacgac atgtcggcct	60
tagtgagcga gcgagcgcgc	80
<210> 322	
<211> 80	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 322	
gcgcgctcgc tcgctcacta aggccaggcg accaaaggtc gcctgacgaa cgttcggcct	60
tagtgagcga gcgagcgcgc	80
<210> 323	
<211> 80	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 323	
gcgcgctcgc tcgctcacta aggccaggcg accaaaggtc gcctgaagca attgctgcct	60
tagtgagcga gcgagcgcgc	80
<210> 324	
<211> 80	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 324	
gcgcgctcgc tcgctcacta aggccgggcg gccaaaggcc gcccgacacc cgggtggcct	60
tagtgagcga gcgagcgcgc	80

<210> 325
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 325
gcgcgctcgc tcgctcacta aggccgggсg gссааaggcc gcccгacгcc atggcggcct 60
tagtgagcga gcgagcgсgс 80

<210> 326
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 326
gcgcgctcgc tcgctcacta aggccgggсg gссааaggcc gcccгacгac atgtcggcct 60
tagtgagcga gcgagcgсgс 80

<210> 327
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 327
gcgcgctcgc tcgctcacta aggccgggсg gссааaggcc gcccгacгaa cgttcggcct 60
tagtgagcga gcgagcgсgс 80

<210> 328
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 328
gcgcgctcgc tcgctcacta aggccgggсg gссааaggcc gcccгaagca attgctgcct 60
tagtgagcga gcgagcgсgс 80

<210> 329
<211> 80
<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 329

gcgcgctcgc tcgctcacta aggccggggcg acaaaatgtc gcccgcacacc cgggtggcct 60

tagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 330

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 330

gcgcgctcgc tcgctcacta aggccggggcg acaaaatgtc gcccgcacgcc atggcggcct 60

tagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 331

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 331

gcgcgctcgc tcgctcacta aggccggggcg acaaaatgtc gcccgcacgac atgtcggcct 60

tagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 332

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 332

gcgcgctcgc tcgctcacta aggccggggcg acaaaatgtc gcccgcagaa cgttcggcct 60

tagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 333

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний

олігонуклеотид

<400> 333	
gcgcgctcgc tcgctcacta aggccgggcg acaaaatgtc gcccgaagca attgctgcct	60
tagtgagcga gcgagcgcgс	80
<210> 334	
<211> 80	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 334	
gcgcgctcgc tcgctcacta aggccaaaaag accaaaggtc ttttgacacc cgggtggcct	60
tagtgagcga gcgagcgcgс	80
<210> 335	
<211> 80	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 335	
gcgcgctcgc tcgctcacta aggccaaaaag accaaaggtc ttttgacgcc atggcggcct	60
tagtgagcga gcgagcgcgс	80
<210> 336	
<211> 80	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 336	
gcgcgctcgc tcgctcacta aggccaaaaag accaaaggtc ttttgacgac atgtcggcct	60
tagtgagcga gcgagcgcgс	80
<210> 337	
<211> 80	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 337	
gcgcgctcgc tcgctcacta aggccaaaaag accaaaggtc ttttgacgaa cgttcggcct	60

tagtgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 338

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 338

gcgcgctcgс tcgctcacta aggссааааg ассааaggtc ttttgaagca attgctgcct 60

tagtgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 339

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 339

gcgcgctcgс tcgctcacta aggссааааа аааааатттт ttttgacacc cgggtggcct 60

tagtgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 340

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 340

gcgcgctcgс tcgctcacta aggссааааа аааааатттт ttttgacgcc atggcggcct 60

tagtgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 341

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 341

gcgcgctcgс tcgctcacta aggссааааа аааааатттт ttttgacgac atgtcggcct 60

tagtgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 342
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 342
 gcgcgctcgc tcgctcacta aggccaaaaa aaaaaatttt ttttgacgaa cgttcggcct 60
 tagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 343
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 343
 gcgcgctcgc tcgctcacta aggccaaaaa aaaaaatttt ttttgaagca attgctgcct 60
 tagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 344
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 344
 gcgcgctcgc tcgctcacta aggccgggca gaaaaattct gcccgcaccc cgggtggcct 60
 tagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 345
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 345
 gcgcgctcgc tcgctcacta aggccgggca gaaaaattct gcccgcaccc atggcggcct 60
 tagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 346
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 346
 gcgcgctcgc tcgctcacta aggccgggca gaaaaattct gcccgacgac atgtcggcct 60
 tagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 347
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 347
 gcgcgctcgc tcgctcacta aggccgggca gaaaaattct gcccgacgaa cgttcggcct 60
 tagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 348
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 348
 gcgcgctcgc tcgctcacta aggccgggca gaaaaattct gcccgaagca attgctgcct 60
 tagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 349
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 349
 gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccaggcg accaaaggtc gcctgacacc cgggtggcct 60
 catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 350
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 350
 gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccaggcg accaaaggct gcctgacgcc atggcggcct 60
 catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 351
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 351
 gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccaggcg accaaaggct gcctgacgac atgtcggcct 60
 catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 352
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 352
 gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccaggcg accaaaggct gcctgacgaa cgttcggcct 60
 catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 353
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 353
 gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccaggcg accaaaggct gcctgaagca attgctgcct 60
 catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 354
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 354
 gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccgggcg gccaaaggcc gcccgacacc cgggtggcct 60

catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 355

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 355

gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccgggcg gccaaaggcc gcccgacgcc atggcggcct 60

catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 356

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 356

gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccgggcg gccaaaggcc gcccgacgac atgtcggcct 60

catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 357

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 357

gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccgggcg gccaaaggcc gcccgacgaa cgttcggcct 60

catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 358

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 358

gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccgggcg gccaaaggcc gccggaagca attgctgcct 60

catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 359

<211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 359
 gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccgggcg acaaaatgtc gcccgcacacc cgggtggcct 60
 catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 360
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 360
 gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccgggcg acaaaatgtc gcccgcacgcc atggcggcct 60
 catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 361
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 361
 gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccgggcg acaaaatgtc gcccgcacgac atgtcggcct 60
 catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 362
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 362
 gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccgggcg acaaaatgtc gcccgcagaa cgttcggcct 60
 catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 363
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 363
 gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccgggcg acaaaatgtc gcccgaagca attgctgcct 60
 catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 364
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 364
 gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccaaaag accaaaggtc ttttgacacc cgggtggcct 60
 catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 365
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 365
 gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccaaaag accaaaggtc ttttgacgcc atggcggcct 60
 catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 366
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 366
 gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccaaaag accaaaggtc ttttgacgac atgtcggcct 60
 catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 367
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 367
gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccaaaag accaaaggtc ttttgacgaa cgttcggcct 60
catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 368
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 368
gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccaaaag accaaaggtc ttttgaagca attgctgcct 60
catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 369
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 369
gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccaaaaa aaaaaatttt ttttgacacc cgggtggcct 60
catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 370
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 370
gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccaaaaa aaaaaatttt ttttgacgcc atggcggcct 60
catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 371
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 371
gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccaaaaa aaaaaatttt ttttgacgac atgtcggcct 60

catcgagcga gcgagcgcgc

80

<210> 372

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 372

gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccaaaaa aaaaaatttt ttttgacgaa cgttcggcct

60

catcgagcga gcgagcgcgc

80

<210> 373

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 373

gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccaaaaa aaaaaatttt ttttgaagca attgctgcct

60

catcgagcga gcgagcgcgc

80

<210> 374

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 374

gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccgggca gaaaaattct gcccgcaccc cgggtggcct

60

catcgagcga gcgagcgcgc

80

<210> 375

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 375

gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccgggca gaaaaattct gcccgcaccc atggcggcct

60

catcgagcga gcgagcgcgc

80

<210> 376

<211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 376
 gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccgggca gaaaaattct gcccgcgcac atgtcggcct 60
 catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 377
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 377
 gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccgggca gaaaaattct gcccgcgcaa cgttcggcct 60
 catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 378
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 378
 gcgcgctcgc tcgctcgatg gggccgggca gaaaaattct gcccgaagca attgctgcct 60
 catcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 379
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 379
 gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccaggcg accaaaggtc gcctgacacc cgggtggttc 60
 tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 380
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 380
 gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccaggcg accaaaggtc gcctgacgcc atggcggttc 60
 tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 381
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 381
 gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccaggcg accaaaggtc gcctgacgac atgtcggttc 60
 tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 382
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 382
 gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccaggcg accaaaggtc gcctgacgaa cgttcggttc 60
 tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 383
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 383
 gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccaggcg accaaaggtc gcctgaagca attgctgttc 60
 tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 384
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 384
 gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccgggcg gccaaaggcc gcccgacacc cgggtggttc 60
 tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 385
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 385
 gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccgggcg gccaaaggcc gcccgacgcc atggcggttc 60
 tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 386
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 386
 gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccgggcg gccaaaggcc gcccgacgac atgtcggttc 60
 tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 387
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 387
 gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccgggcg gccaaaggcc gcccgacgaa cgttcggttc 60
 tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 388
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 388
 gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccgggcg gccaaaggcc gccggaagca attgctgttc 60
 tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 389
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 389
gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccgggcg acaaaatgtc gcccgcacacc cgggtggttc 60
tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 390
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 390
gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccgggcg acaaaatgtc gcccgcacgcc atggcggttc 60
tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 391
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 391
gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccgggcg acaaaatgtc gcccgcacgac atgtcggttc 60
tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 392
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 392
gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccgggcg acaaaatgtc gcccgcagaa cgttcggttc 60
tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 393
<211> 80

<212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 393
 gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccgggcg acaaaatgtc gcccgaagca attgctgttc 60
 tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 394
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 394
 gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccsaaaag accsaaaggtc ttttgacacc cgggtggttc 60
 tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 395
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 395
 gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccsaaaag accsaaaggtc ttttgacgcc atggcggttc 60
 tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 396
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 396
 gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccsaaaag accsaaaggtc ttttgacgac atgtcggttc 60
 tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 397
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 397
 gcgctcgc tcgctcgaga gaaccsaaaag accsaaaggtc ttttgacgaa cgttcggttc 60
 tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 398
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 398
 gcgctcgc tcgctcgaga gaaccsaaaag accsaaaggtc ttttgaagca attgctgttc 60
 tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 399
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 399
 gcgctcgc tcgctcgaga gaaccsaaaaa aaaaaatttt ttttgacacc cgggtggttc 60
 tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 400
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 400
 gcgctcgc tcgctcgaga gaaccsaaaaa aaaaaatttt ttttgacgcc atggcggttc 60
 tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 401
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 401
 gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccaaaaa aaaaaatttt ttttgacgac atgtcggttc 60
 tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 402
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 402
 gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccaaaaa aaaaaatttt ttttgacgaa cgttcggttc 60
 tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 403
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 403
 gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccaaaaa aaaaaatttt ttttgaagca attgctgttc 60
 tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 404
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 404
 gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccgggca gaaaaattct gcccgcaccc cgggtggttc 60
 tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 405
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 405
 gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccgggca gaaaaattct gcccgcgcc atggcggttc 60

tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 406

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 406

gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccgggca gaaaaattct gcccgacgac atgtcggttc 60

tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 407

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 407

gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccgggca gaaaaattct gcccgacgaa cgttcggttc 60

tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 408

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 408

gcgcgctcgc tcgctcgaga gaaccgggca gaaaaattct gcccgaagca attgctgttc 60

tctcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 409

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 409

gcgcgctcgc tcgctcgagg gggccaggcg accaaaggct gcctgacacc cgggtggccc 60

ccgagcgcga gcgagcgcgc 80

<210> 410

<211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 410
 gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggccaggcg ассааaggtc gcctgacgcc atggcggccc 60
 ccgсgagсga gсgagсgсgс 80

<210> 411
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 411
 gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggccaggcg ассааaggtc gcctgacgac atgtcggccc 60
 ccgсgagсga gсgagсgсgс 80

<210> 412
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 412
 gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggccaggcg ассааaggtc gcctgacgaa cgttcggccc 60
 ccgсgagсga gсgagсgсgс 80

<210> 413
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 413
 gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggccaggcg ассааaggtc gcctgaagca attgctgccc 60
 ccgсgagсga gсgagсgсgс 80

<210> 414
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 414
 gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggccgggcg gccaaaggcc gcccgacacc cgggtggccc 60
 ccgcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 415
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 415
 gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggccgggcg gccaaaggcc gcccgacgcc atggcggccc 60
 ccgcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 416
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 416
 gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggccgggcg gccaaaggcc gcccgacgac atgtcggccc 60
 ccgcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 417
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 417
 gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggccgggcg gccaaaggcc gcccgacgaa cgttcggccc 60
 ccgcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 418
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 418	
gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggccgggcg gccaaaggcc gcccgagca attgctgccc	60
ccgcgagcga gcgagcgcgc	80
<210> 419	
<211> 80	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 419	
gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggccgggcg acaaaatgtc gcccgacacc cgggtggccc	60
ccgcgagcga gcgagcgcgc	80
<210> 420	
<211> 80	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 420	
gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggccgggcg acaaaatgtc gcccgacgcc atggcggccc	60
ccgcgagcga gcgagcgcgc	80
<210> 421	
<211> 80	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 421	
gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggccgggcg acaaaatgtc gcccgacgac atgtcggccc	60
ccgcgagcga gcgagcgcgc	80
<210> 422	
<211> 80	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 422	
gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggccgggcg acaaaatgtc gcccgacgaa cgttcggccc	60
ccgcgagcga gcgagcgcgc	80

<210> 423
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 423
gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggccgggcg acaaaatgtc gcccgaagca attgctgccc 60
ccgcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 424
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 424
gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggccaaaag accaaaggtc ttttgacacc cgggtggccc 60
ccgcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 425
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 425
gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggccaaaag accaaaggtc ttttgacgcc atggcggccc 60
ccgcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 426
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 426
gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggccaaaag accaaaggtc ttttgacgac atgtcggccc 60
ccgcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 427
<211> 80

<212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 427
 gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggccaaaag ассааaggtc ttttgacgaa cgttcggccc 60
 ccgcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 428
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 428
 gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggccaaaag ассааaggtc ttttgaagca attgctgccc 60
 ccgcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 429
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 429
 gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggccaaaaa аааааатттт ttttgacacc cgggtggccc 60
 ccgcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 430
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 430
 gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggccaaaaa аааааатттт ttttgacgcc atggcgcccc 60
 ccgcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 431
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 431
 gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggccaaaaa aaaaaatttt ttttgacgac atgtcggccc 60
 ccgcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 432
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 432
 gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggccaaaaa aaaaaatttt ttttgacgaa cgttcggccc 60
 ccgcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 433
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 433
 gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggccaaaaa aaaaaatttt ttttgaagca attgctgccc 60
 ccgcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 434
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 434
 gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggccgggca gaaaaattct gcccgaaccc cgggtggccc 60
 ccgcgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 435
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 435
 gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggccgggca gaaaaattct gcccgcgcgc atggcggccc 60
 ccgcgagcga ggcgagcgcgc 80

<210> 436
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 436
 gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggccgggca gaaaaattct gcccgcgcgc atgtcggccc 60
 ccgcgagcga ggcgagcgcgc 80

<210> 437
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 437
 gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggccgggca gaaaaattct gcccgcgcga cgttcggccc 60
 ccgcgagcga ggcgagcgcgc 80

<210> 438
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 438
 gcgcgctcgc tcgctcgcgg gggccgggca gaaaaattct gcccgaagca attgctgccc 60
 ccgcgagcga ggcgagcgcgc 80

<210> 439
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 439
 gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccaggcg accaaaggct gcctgacacc cgggtggttt 60
 tattgagcga ggcgagcgcgc 80

<210> 440
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 440
gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccaggcg accaaaggctc gcctgacgcc atggcggttt 60
tattgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 441
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 441
gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccaggcg accaaaggctc gcctgacgac atgtcggttt 60
tattgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 442
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 442
gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccaggcg accaaaggctc gcctgacgaa cgttcggttt 60
tattgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 443
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 443
gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccaggcg accaaaggctc gcctgaagca attgctgttt 60
tattgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 444
<211> 80

<212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 444
 gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccgggcg gccaaaggcc gcccgacacc cgggtggttt 60
 tattgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 445
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 445
 gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccgggcg gccaaaggcc gcccgacgcc atggcggttt 60
 tattgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 446
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 446
 gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccgggcg gccaaaggcc gcccgacgac atgtcggttt 60
 tattgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 447
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 447
 gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccgggcg gccaaaggcc gcccgacgaa cgttcggttt 60
 tattgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 448
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 448
 gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccgggcg gccaaaggcc gcccgagca attgctgttt 60
 tattgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 449
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 449
 gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccgggcg acaaaatgtc gcccgacacc cgggtggttt 60
 tattgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 450
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 450
 gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccgggcg acaaaatgtc gcccgacgcc atggcggttt 60
 tattgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 451
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 451
 gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccgggcg acaaaatgtc gcccgacgac atgtcggttt 60
 tattgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 452
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 452
 gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccgggcg acaaaatgtc gcccgacgaa cgttcggttt 60
 tattgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 453
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 453
 gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccgggcg acaaaatgtc gcccgagca attgctgttt 60
 tattgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 454
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 454
 gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccaaaaag accaaagggtc ttttgacacc cgggtggttt 60
 tattgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 455
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 455
 gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccaaaaag accaaagggtc ttttgacgcc atggcggttt 60
 tattgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 456
 <211> 80
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 456
 gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccaaaaag accaaagggtc ttttgacgac atgtcggttt 60
 tattgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 457
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 457
gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccaaaaag accaaaggtc ttttgacgaa cgttcggttt 60
tattgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 458
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 458
gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccaaaaag accaaaggtc ttttgaagca attgctgttt 60
tattgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 459
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 459
gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccaaaaaa aaaaaatttt ttttgacacc cgggtggttt 60
tattgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 460
<211> 80
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 460
gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccaaaaaa aaaaaatttt ttttgacgcc atggcggttt 60
tattgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 461
<211> 80

<213> Штучна послідовність

 $\langle 220 \rangle$

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид

<400> 461

gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccaaaaa aaaaaatttt ttttgacgac atgtcggttt 60

tattgagcga gcgagcgcgC 80

<210> 462

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

 $\langle 220 \rangle$

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид

<400> 462

gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccaaaaa aaaaaatttt ttttgacgaa cgttcggttt 60

tattgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 463

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

 $\langle 220 \rangle$

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид

<400> 463

gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccaaaaa aaaaaatttt ttttgaagca attgctgttt 60

tattgagcga gcgagcgcg 80

<210> 464

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

 $\langle 220 \rangle$

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид

<400> 464

gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccgggca gaaaaattct gcccgacacc cgggtggttt 60

tattgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 465

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

 $\langle 220 \rangle$

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 465

gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccgggca gaaaaattct gcccgacgcc atggcggttt 60

tattgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 466

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 466

gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccgggca gaaaaattct gcccgacgac atgtcggttt 60

tattgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 467

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 467

gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccgggca gaaaaattct gcccgacgaa cgttcggttt 60

tattgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 468

<211> 80

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 468

gcgcgctcgc tcgctcaata aaaccgggca gaaaaattct gcccgagca attgctgttt 60

tattgagcga gcgagcgcgс 80

<210> 469

<211> 120

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 469

aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60

cgcacgcccc gggtttcccg ggcgcctcag tgagcgagcg agcgcgagc tgcctgcagg 120

<210> 470

<211> 122

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 470

aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60

ccgacgcccc ggctttgccc gggcggcctc agtgagcgag cgagcgcgca gctgcctgca 120

gg 122

<210> 471

<211> 129

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 471

aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgccccg ggcgcctcagt gagcgagcga gcgcgagct 120

gcctgcagg 129

<210> 472

<211> 101

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 472

aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60

ctttgcctca gtgagcgagc gagcgcgag ctgcctgcag g 101

<210> 473

<211> 139

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 473
 aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
 ccgggcgaca aagtcgccccg acgcccgggc ttgcccggg cggcctcagt gagcgagcga 120
 gcgcgagct gcctgcagg 139

<210> 474
 <211> 137
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 поліуклеотид

<400> 474
 aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
 ccgggcgaaa atcgccccgac gcccgggctt tggccgggc gcctcagtga gcgagcgagc 120
 gcgagctgc ctgcagg 137

<210> 475
 <211> 135
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 поліуклеотид

<400> 475
 aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
 ccgggcgaaa cggccgacgc cgggctttg cccgggcggc ctgagtgagc gagcgagcgc 120
 gcagctgcct gcagg 135

<210> 476
 <211> 133
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 поліуклеотид

<400> 476
 aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
 ccgggcaaaag cccgacgccc gggctttgcc cgggcggcct cagtgagcga gcgagcgcgc 120
 agctgcctgc agg 133

<210> 477
 <211> 139
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 477

aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gtttcccgagg cggcctcagt gagcgagcga 120

gcgcgagct gcctgcagg 139

<210> 478

<211> 137

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 478

aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg tttccgggcg gcctcagtga gcgagcgagc 120

gcgagctgc ctgcagg 137

<210> 479

<211> 135

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 479

aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgt ttcgggaggc ctactgagc gagcgagcgc 120

gcagctgcct gcagg 135

<210> 480

<211> 133

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 480

aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgt tgggaggcct cagtgagcga gcgagcgagc 120

agctgcctgc agg 133

<210> 481
<211> 131
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 481
aggaaccscct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
ccgggcgacc aaaggctgcc cgacgccttt ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgag 120
ctgcctgcag g 131

<210> 482
<211> 129
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 482
aggaaccscct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
ccgggcgacc aaaggctgcc cgacgccttt ggcctcagt gagcgagcga gcgcgcagct 120
gcctgcagg 129

<210> 483
<211> 127
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 483
aggaaccscct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
ccgggcgacc aaaggctgcc cgacgtttcg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagctgc 120
ctgcagg 127

<210> 484
<211> 120
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 484
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggaaacc cgggcgtgcg 60
cctcagttag cgagcgagcg cgagagagg gaggggccaa ctccatcact aggggttcct 120

<210> 485
<211> 122
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 485
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgt cgggcgacct ttggtcgccc 60
ggcctcagtg agcgagcgag cgcgagaga gggagtggcc aactccatca ctaggggttc 120
ct 122

<210> 486
<211> 122
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 486
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60
ggcctcagtg agcgagcgag cgcgagaga gggagtggcc aactccatca ctaggggttc 120
ct 122

<210> 487
<211> 129
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 487
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggcgcc cgggcgtcgg gcgacctttg 60
gtcgcccggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagagaggg agtggccaac tccatcacta 120
ggggttcct 129

<210> 488
<211> 101
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 488
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggcaaa gcctcagtga gcgagcgagc 60

gcgcagagag ggagtggcca actccatcac taggggttcc t 101

<210> 489

<211> 139

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 489

cctgcaggca gctgcgctcgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

gggcgacttt gtcgcccggc ctcaagtgcg gagcgcgcgc gcagagaggg agtggccaac 120

tccatcacta ggggttcct 139

<210> 490

<211> 137

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 490

cctgcaggca gctgcgctcgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

gggcgatddd cgccggcct cagtgcgcga gcgagcgcgc agagaggagagg tggccaactc 120

catcactagg ggttcct 137

<210> 491

<211> 135

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 491

cctgcaggca gctgcgctcgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

gggcggtttcg cccggcctca gtgagcgcgc gagcgcgcag agaggagagg gccaactcca 120

tcactagggg ttcct 135

<210> 492

<211> 133

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 492
 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60
 gggctttgcc cggcctcagt gagcgagcga gcgcgagag agggagtggc caactccatc 120
 actaggggtt cct 133

<210> 493
 <211> 139
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 поліуклеотид

<400> 493
 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggaaacc cgggcgtcgg 60
 gcgacctttg gtcgcccggc ctcaagttagc gagcgagcgc gcagagaggg agtggccaac 120
 tccatcacta ggggttcct 139

<210> 494
 <211> 137
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 поліуклеотид

<400> 494
 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccggaaaccg ggcgtcgggc 60
 gaccttttgt cggccggcct cagttagcga gcgagcgcgc agagagggag tggccaactc 120
 catcactagg ggttcct 137

<210> 495
 <211> 135
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 поліуклеотид

<400> 495
 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgaaacggg cgtcgggcga 60
 cctttgttcg cccggcctca gtgagcagc gagcgcgag agaggagtg gccaaactca 120
 tcactagggg ttcct 135

<210> 496
 <211> 133
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 496

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccaaagggcg tcgggcgacc 60

tttggtcgcc cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcagag agggagtggc caactccatc 120

actaggggtt cct 133

<210> 497

<211> 131

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 497

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc caaaggcgtc gggcgacctt 60

tggtcgccccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca actccatcac 120

taggggttcc t 131

<210> 498

<211> 129

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 498

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc aaagcgctcg gcgacctttg 60

gtcgccccggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagagaggg agtggccaac tccatcacta 120

ggggttcct 129

<210> 499

<211> 127

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 499

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccga aacgtcgggc gaccttttgt 60

cgccccggcct cagtgagcga gcgagcgcgc agagagggag tggccaactc catcactagg 120

ggttcct 127

<210> 500

<211> 43	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 500	
gccccgtggt ttccagcggg ctgcgggccc gaaacgggccc cgc	43
<210> 501	
<211> 28	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 501	
cgggcccgtg cgggcccсааа gggcccgc	28
<210> 502	
<211> 28	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 502	
gccccgggcac gccccgggttt cccgggccc	28
<210> 503	
<211> 22	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 503	
cgtgcgggccc сааagggccc gc	22
<210> 504	
<211> 21	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 504	
cgggcgacca aaggtcgccc g	21

<210> 505
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

 <400> 505
 cgcccgaggct ttgcccgaggc 20

<210> 506
 <211> 42
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

 <400> 506
 cgggcgacca aaggtcgccc gacgcccggg ctttgcccgg gc 42

<210> 507
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

 <400> 507
 cgggcgacca aaggtcgccc g 21

<210> 508
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

 <400> 508
 cgcccgaggct ttgcccgaggc 20

<210> 509
 <211> 34
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

 <400> 509
 cgggcgacca aaggtcgccc gacgcccggg cggc 34

<210> 510	
<211> 21	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 510	
cgggcgacca aaggtcgccc g	21
<210> 511	
<211> 20	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 511	
cggccgggct ttgcccgggc	20
<210> 512	
<211> 30	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 512	
cggggcccca cggccgggct ttgcccgggc	30
<210> 513	
<211> 21	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 513	
cgggcgacca aaggtcgccc g	21
<210> 514	
<211> 20	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 514	
cggccgggct ttgcccgggc	20

<210> 515	
<211> 29	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 515	
cgggcccgcac gcccgggcctt tgcccgggc	29
<210> 516	
<211> 21	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 516	
cgggcgcacca aaggtcgccc g	21
<210> 517	
<211> 20	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 517	
cggccgggct ttgcccgggc	20
<210> 518	
<211> 20	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 518	
gcccgggcaa agcccgggcg	20
<210> 519	
<211> 21	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 519	

cgggcgacct ttggtcgccc g 21

<210> 520
<211> 42
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 520
gccccgggсаа agccccgggсг tcgggсгacc ttggtcgcc сг 42

<210> 521
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 521
gccccgggсаа agccccgggсг 20

<210> 522
<211> 31
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 522
gccccgggсгt cgggсгacct ttggtcgccc g 31

<210> 523
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 523
gccccgggсаа agccccgggсг 20

<210> 524
<211> 21
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 524 cgggcgacct ttggtcgccc g	21
<210> 525 <211> 34 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
<220> <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 525 gscgcccggg cgacgggcga cctttggtcg cccg	34
<210> 526 <211> 20 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
<220> <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 526 gscgggсаа агсссgggcg	20
<210> 527 <211> 21 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
<220> <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 527 cgggcgacct ttggtcgccc g	21
<210> 528 <211> 31 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
<220> <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 528 gscgggcgt cgggcgacct ttggtcgccc g	31
<210> 529 <211> 21 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
<220> <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	

<400> 529
cgggcgacct ttggtcgccc g

21

<210> 530
<211> 1653
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 530
atgccgccac cccggaccgg ccgaggcctt ctctggctgg gtctggttct gagctccgtc 60
tgcgtcgccc tcggatccga aacgcaggcc aactcgacca cagatgctct gaacgttctt 120
ctcatcatcg tggatgacct gcgcccctcc ctgggctgtt atggggataa gctggtgagg 180
tccccaaata ttgaccaact ggcatcccac agcctcctct tccagaatgc ctttgcgcag 240
caagcagtgt gcgccccgag ccgcgtttct ttcctcactg gcaggagacc tgacaccacc 300
cgctgtacg acttcaactc ctactggagg gtgcacgctg gaaacttctc caccatcccc 360
cagtacttca aggagaatgg ctatgtgacc atgtcggtgg gaaaagtctt tcaccctggg 420
atatcttcta accataccga tgattctccg tatagctggg cttttccacc ttatcatcct 480
tcctctgaga agtatgaaaa cactaagaca tgtcgagggc cagatggaga actccatgcc 540
aacctgcttt gccctgtgga tgtgctggat gttcccagg gcaccttgcc tgacaaacag 600
agcactgagc aagccataca gttgttgga aagatgaaaa cgtcagccag tcctttcttc 660
ctggccgttg ggtatcataa gccacacatc ccttcagat accccaagga atttcagaag 720
ttgtatccct tggagaacat caccctggcc ccgatcccg aggtccctga tggcctaccc 780
cctgtggcct acaaccctg gatggacatc aggcaacggg aagacgtcca agccttaaac 840
atcagtgtgc cgtatgggcc aattcctgtg gactttcagc ggaaaatccg ccagagctac 900
tttgctctg tgtcatattt ggatacacag gtcggccgcc tcttgagtgc ttggacgat 960
cttcagctgg ccaacagcac catcattgca ttacctcgg atcatgggtg ggctctaggt 1020
gaacatggag aatgggcaa atacagcaat ttgatgttg ctacccatgt tcccctgata 1080
ttctatgttc ctggaaggac ggcttcactt ccggaggcag gcgagaagct tttcccttac 1140
ctcgaccctt ttgattccgc ctacagttg atggagccag gcaggcaatc catggacctt 1200
gtggaacttg tgtctctttt tcccacgtg gctggacttg caggactgca ggttcacct 1260
cgctgccccg ttccttcatt tcacgttgag ctgtgcagag aaggcaagaa cttctgaag 1320
cattttcgat tccgtgactt ggaagaggat ccgtacctc ctggtaatcc ccgtgaactg 1380
attgcctata gccagtatcc ccggccttca gacatccctc agtgggaattc tgacaagccg 1440
agtttaaaag atataaagat catgggctat tccatacgca ccatagacta taggtatact 1500

gtgtgggttg gcttcaatcc tgatgaattt ctagctaact tttctgacat ccatgcaggg	1560
gaactgtatt ttgtggattc tgacccattg caggatcaca atatgtataa tgattcccaa	1620
ggtggagatc ttttccagtt gttgatgcct tga	1653

<210> 531
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 531	
gсgсgсtсgс tсgсtс	16

<210> 532
 <211> 8
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 532	
actgaggс	8

<210> 533
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 533	
сggгсgaccа аaggтсgccc ga	22

<210> 534
 <211> 10
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 534	
сgccccggгсg	10

<210> 535
 <211> 8
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>		
<223> Опис штучної послідовності:	Синтетичний	
	олігонуклеотид	
<400> 535		
gcctcagt		8
<210> 536		
<211> 16		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Опис штучної послідовності:	Синтетичний	
	олігонуклеотид	
<400> 536		
gagcgagcga gcgcgc		16
<210> 537		
<211> 20		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Опис штучної послідовності:	Синтетичний	
	олігонуклеотид	
<400> 537		
gccccgggcaa agccccgggscg		20
<210> 538		
<211> 165		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Опис штучної послідовності:	Синтетичний	
	поліонуклеотид	
<400> 538		
aggaaccscct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg		60
ccgccccgggc aaagccccggg cgtcgggcga cctttggctcg cccggcctca gtgagcgagc		120
gagcgcgscag agagggagtg gccaaactcca tcactagggg ttcct		165
<210> 539		
<211> 140		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Опис штучної послідовності:	Синтетичний	
	поліонуклеотид	
<400> 539		
cccctagtga tggagttggc cactccctct ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc		60

cgggcaaagc cggggcgtcg ggcgaccttt ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg	120
cgcagagaga tcactagggg	140
<210> 540	
<211> 91	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 540	
gcgcgctcg ctcgtcactg aggccgcccc ggcaaagccc gggcgtcggg cgacctttgg	60
tcgcccggcc tcagtgagcg agcgagcgcg c	91
<210> 541	
<211> 91	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 541	
gcgcgctcg ctcgtcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgcgccc cgggctttgc	60
ccgggcggcc tcagtgagcg agcgagcgcg c	91
<210> 542	
<211> 8	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 542	
ttaattaa	8
<210> 543	
<211> 80	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 543	
gcgcgctcg ctcgtcactg aggccgcccc ggcgtcgggc gacctttggt cggccggcct	60
cagtgagcga gcgagcgcg	80
<210> 544	

<211> 52
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 544
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggcctttgc ctcaagttagc gagcgagcgc gc 52

<210> 545
 <211> 79
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 545
 gcgcgctcgc tcgctcactg aggcgcccgg gcgtcgggcg acctttggtc gcccggcctc 60
 agtgagcgag cgagcgcgс 79

<210> 546
 <211> 81
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 546
 ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccgcg tttcggcctc 60
 agtgagcgag cgagcgcgса g 81

<210> 547
 <211> 81
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

<400> 547
 ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgaa acgtcgggcg acctttggtc gcccggcctc 60
 agtgagcgag cgagcgcgса g 81

<210> 548
 <211> 42
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний

олігонуклеотид

<400> 548
cgggсgaccа аaggтсgccc gacgcccggg ctttgcccgg gc 42

<210> 549
<211> 42
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 549
gcccgggсаа агcccgggсg тсgggсgacc tttggtcgcc cg 42

<210> 550
<211> 144
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
полінуклеотид

<400> 550
aggaaccста gtgatggagt tggccactcc ctctctgcgc gctcgctcgc tactgaggc 60
cgcccgggса аagcccgggc gtcgggсgac ctttggtcgc ccggcctcag tgagcgagcg 120
agcgсgсaga gagggagtgg cсаа 144

<210> 551
<211> 43
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 551
gcccгtggт ttccagсggg ctгсgggccc gaaacgggcc сгс 43

<210> 552
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
олігонуклеотид

<400> 552
сgggcccгtг сgggсссааа gggcccгс 28

<210> 553
<211> 28

<212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

 <400> 553
 gcccgggсac gcccgggttt cccgggсg 28

<210> 554
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

 <400> 554
 cgtgсggгсс сааaggгссс гс 22

<210> 555
 <211> 43
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

 <400> 555
 гсggгссгга аacggгсссг ctgсссгctg gtttссagсg ggc 43

<210> 556
 <211> 28
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

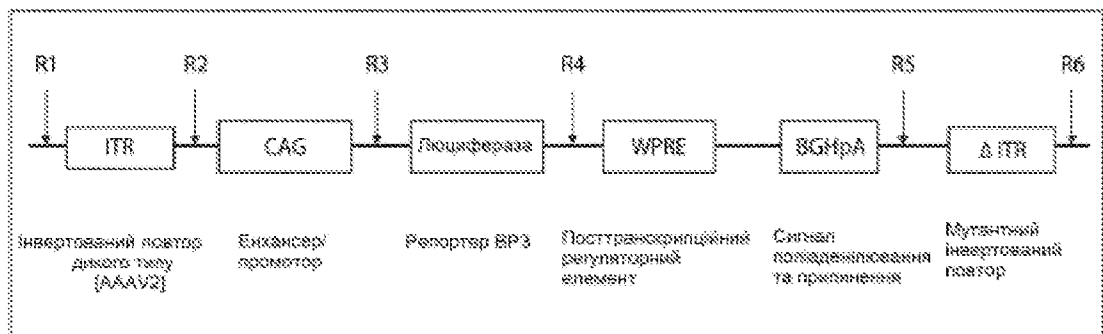
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

 <400> 556
 cгсссggггаа асссggгсgt gсссggгс 28

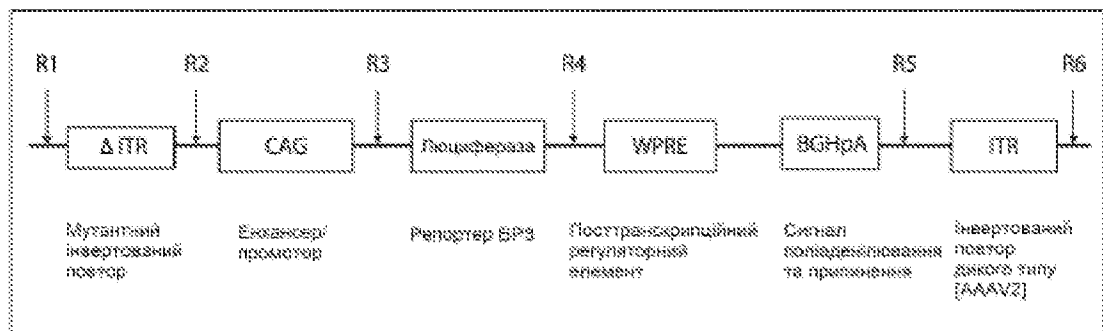
<210> 557
 <211> 28
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний
 олігонуклеотид

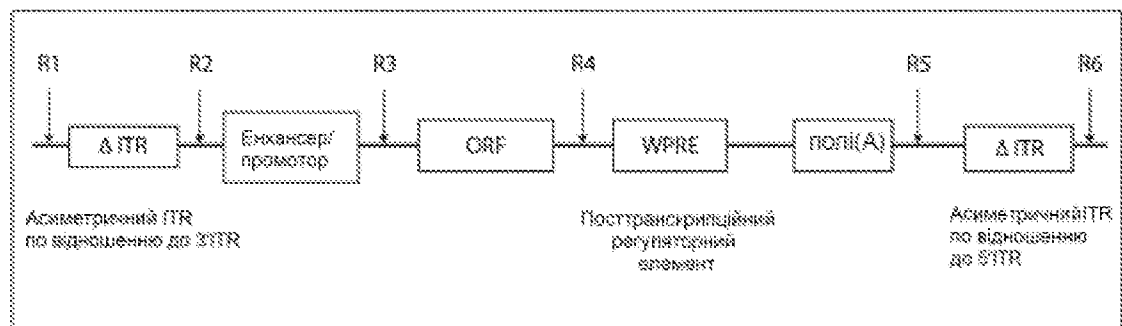
 <400> 557
 ggгссгсссг gгааaccсгг гсgtгссс 28



Фиг. 1А



Фиг. 1В



Фиг. 1С

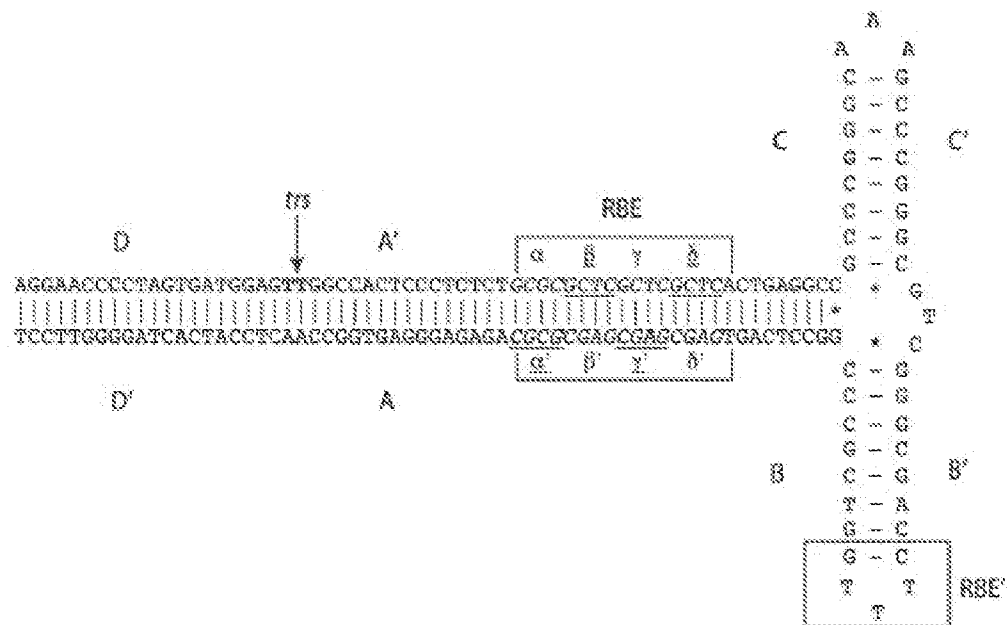


Fig. 2A

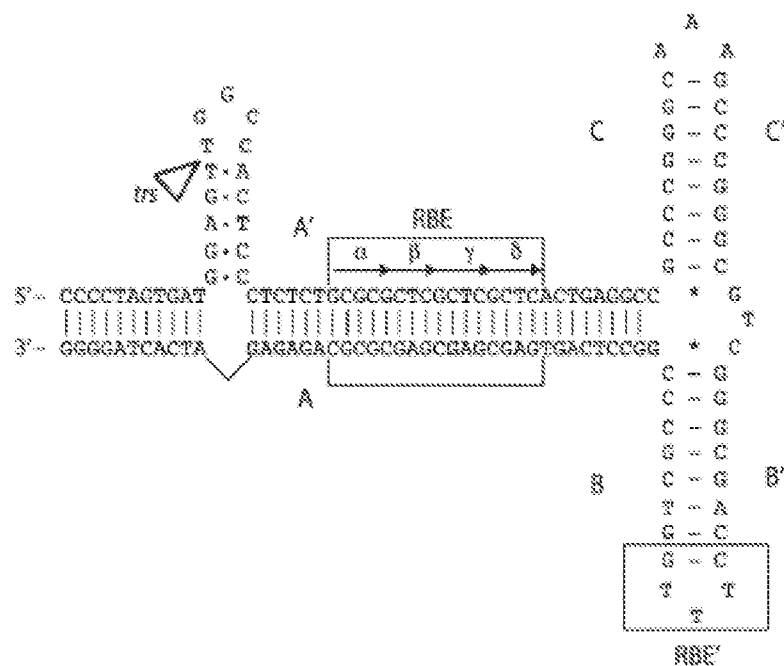
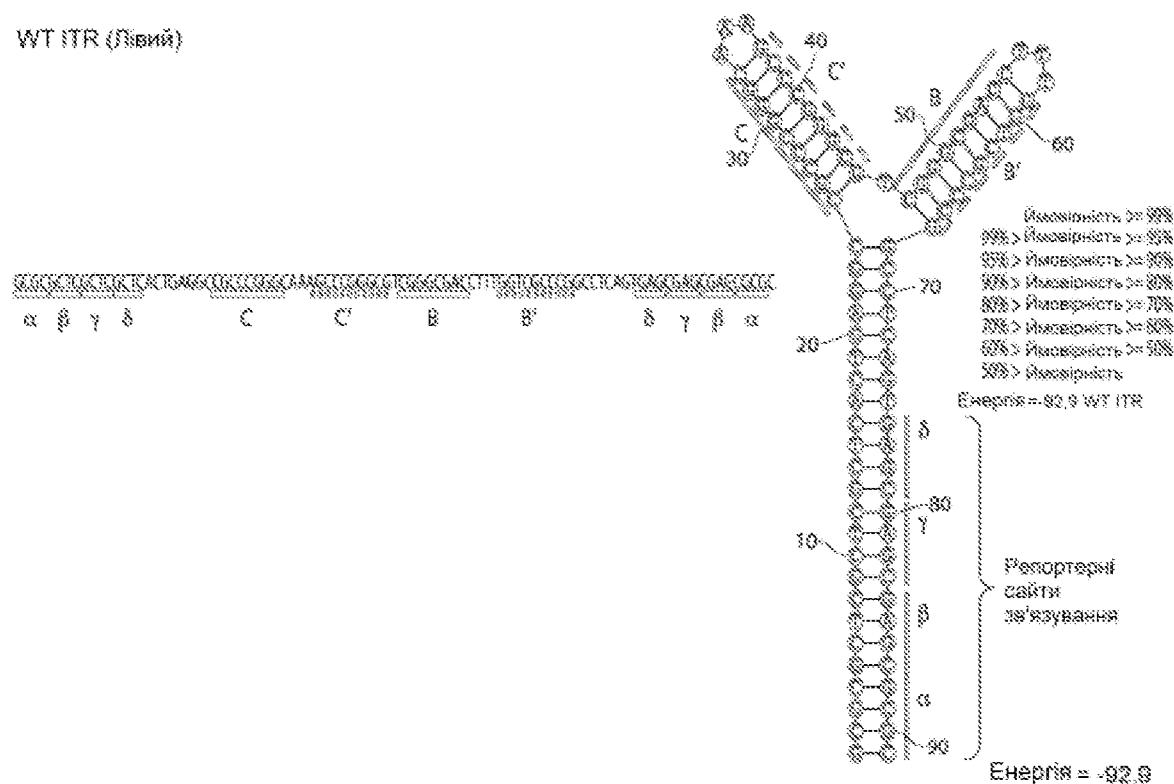


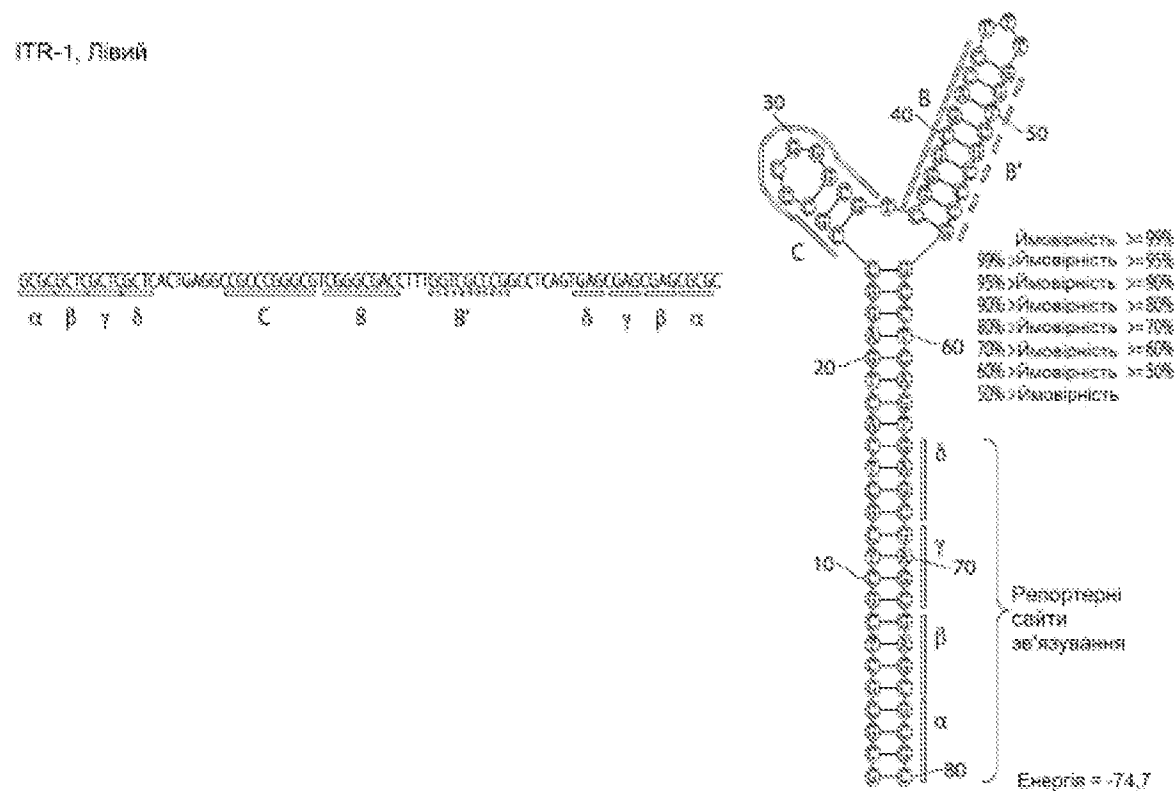
Fig. 2B

WT ITR (Лівий)



Фіг. 3А

ITR-1, Лівий

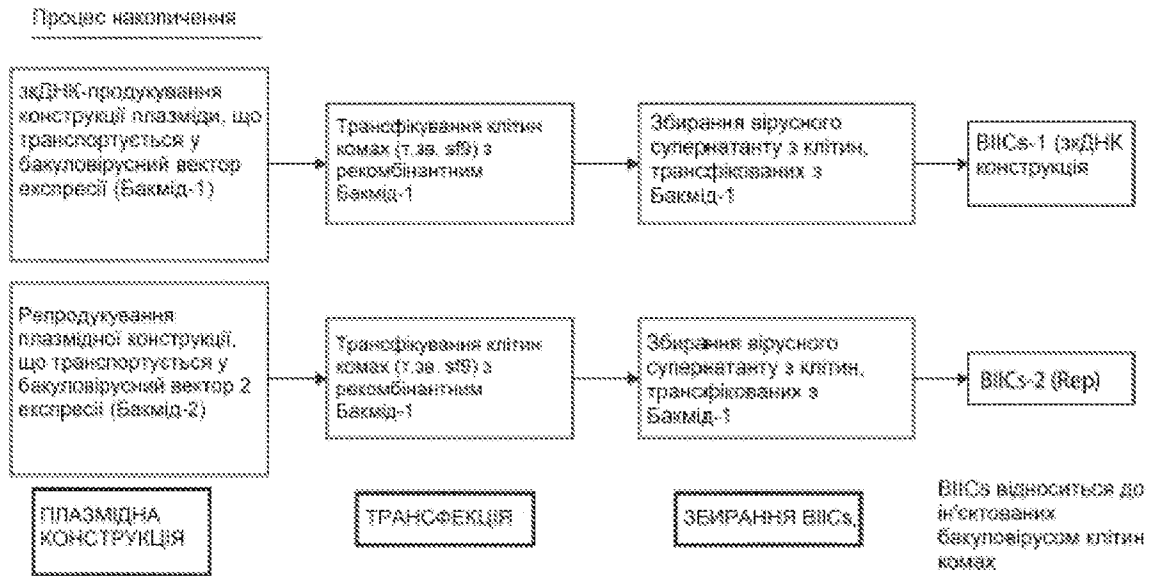


Фіг. 3В

GCATETTDISRAKNLHFMVPQL
α β γ δ ε ζ η θ ι κ λ μ ν ξ ο π ρ σ τ υ φ χ ψ ω

[illegible]

Продуктування зДНК



Фіг. 4А

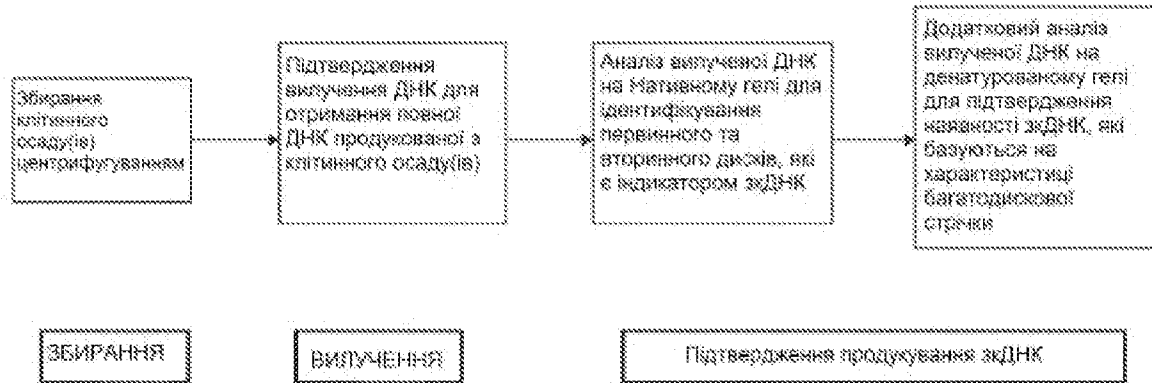
Генерування зДНК



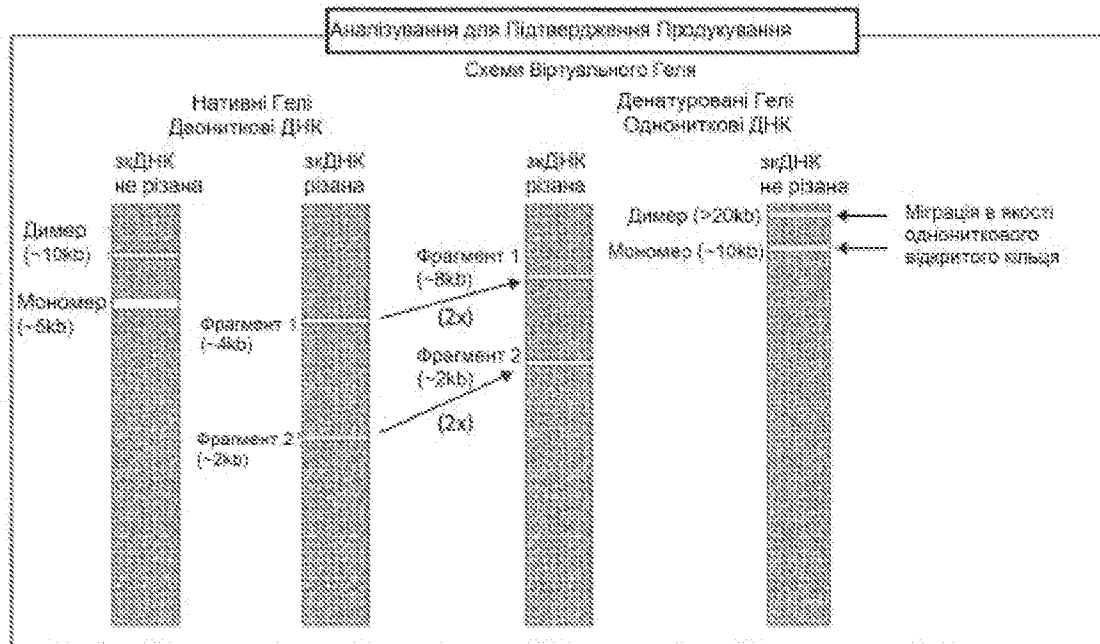
Фіг. 4В

Продуктування зДНК

Етап отримання активної субстанції



Фіг. 4С



Фіг. 4D

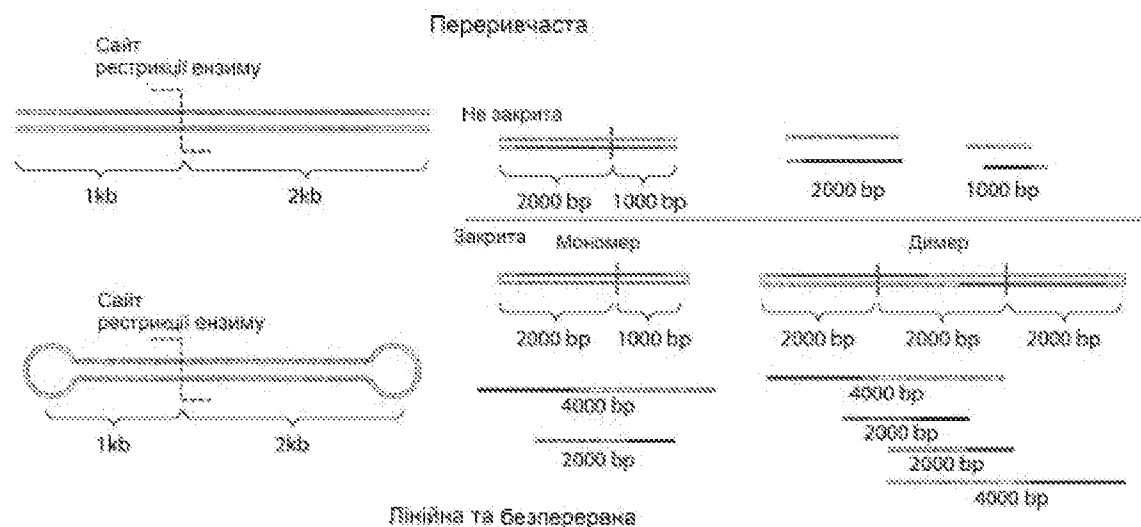


Fig. 4E

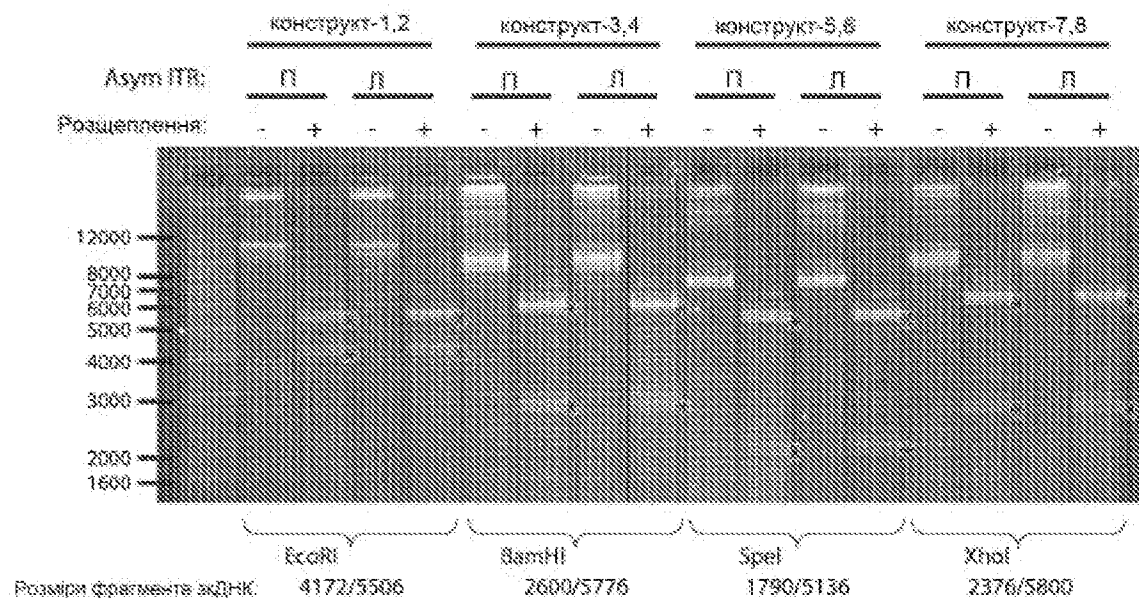
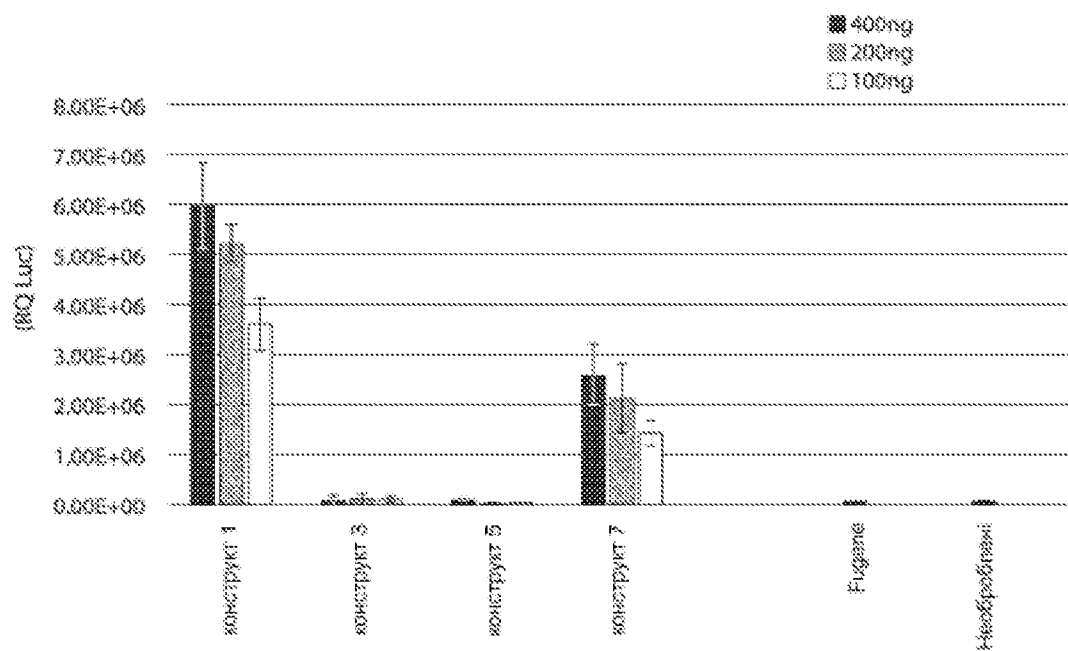
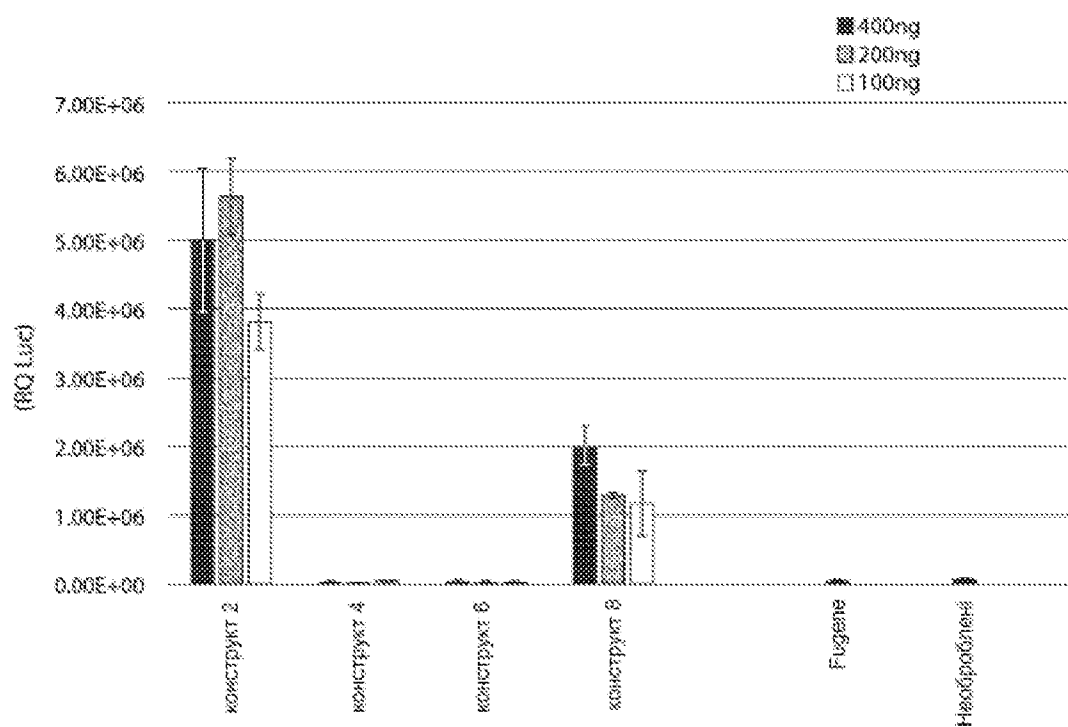


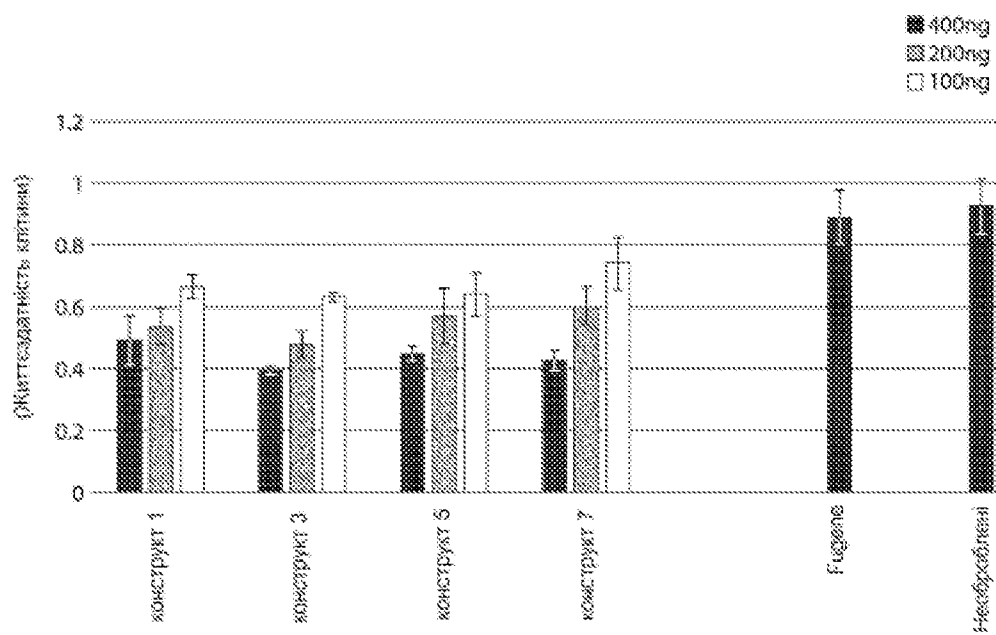
Fig. 5



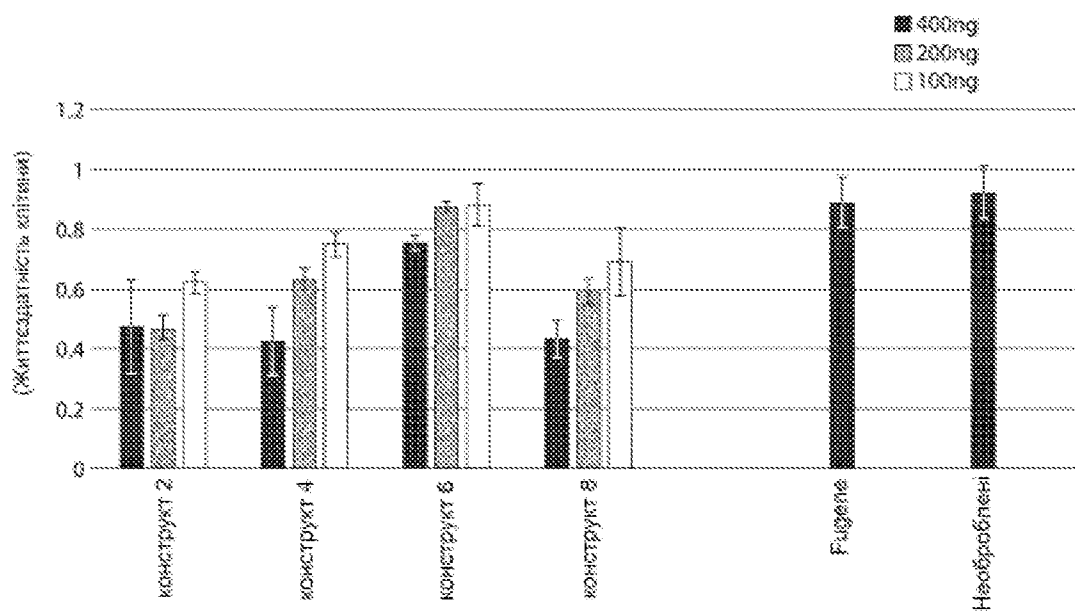
Фиг. 6А



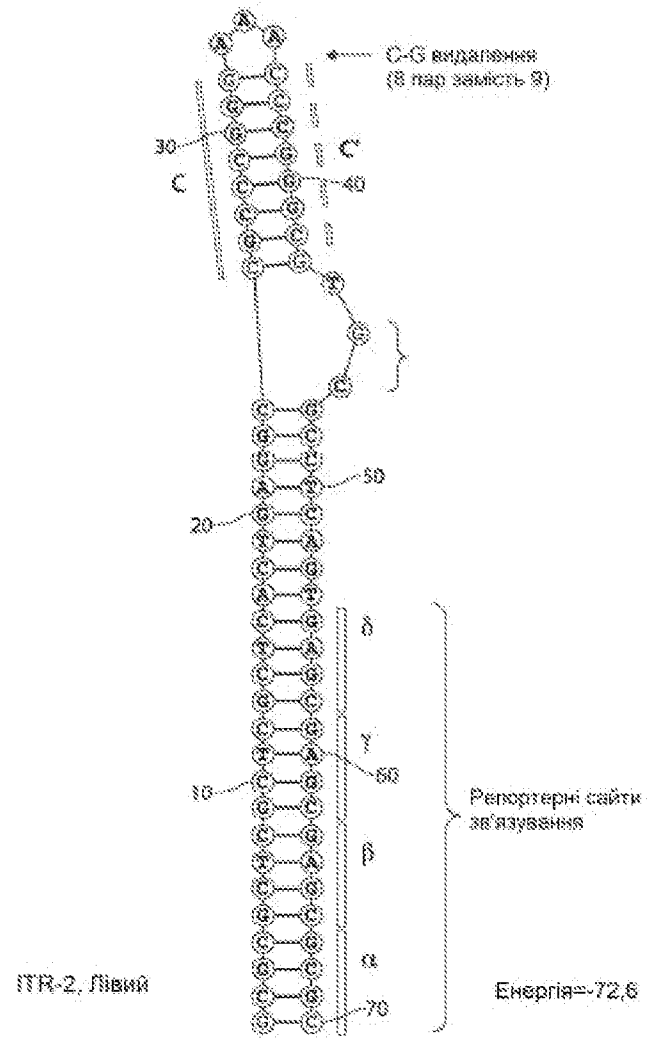
Фиг. 6В



Фіг. 7А



Фіг. 7Б



Фіг. 9А

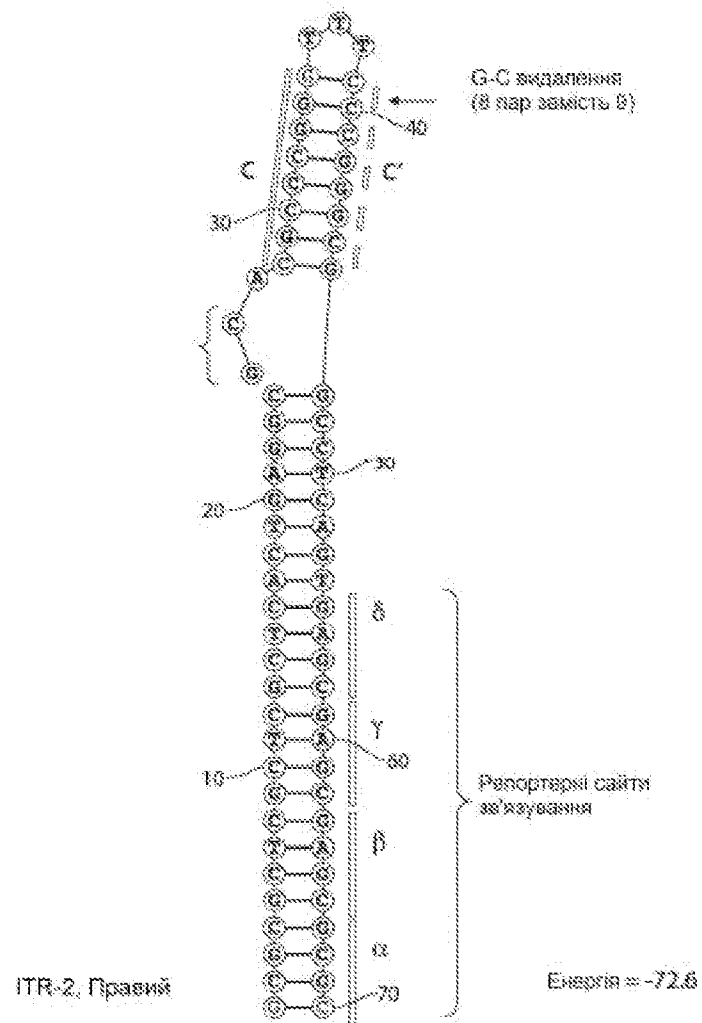


Fig. 9B

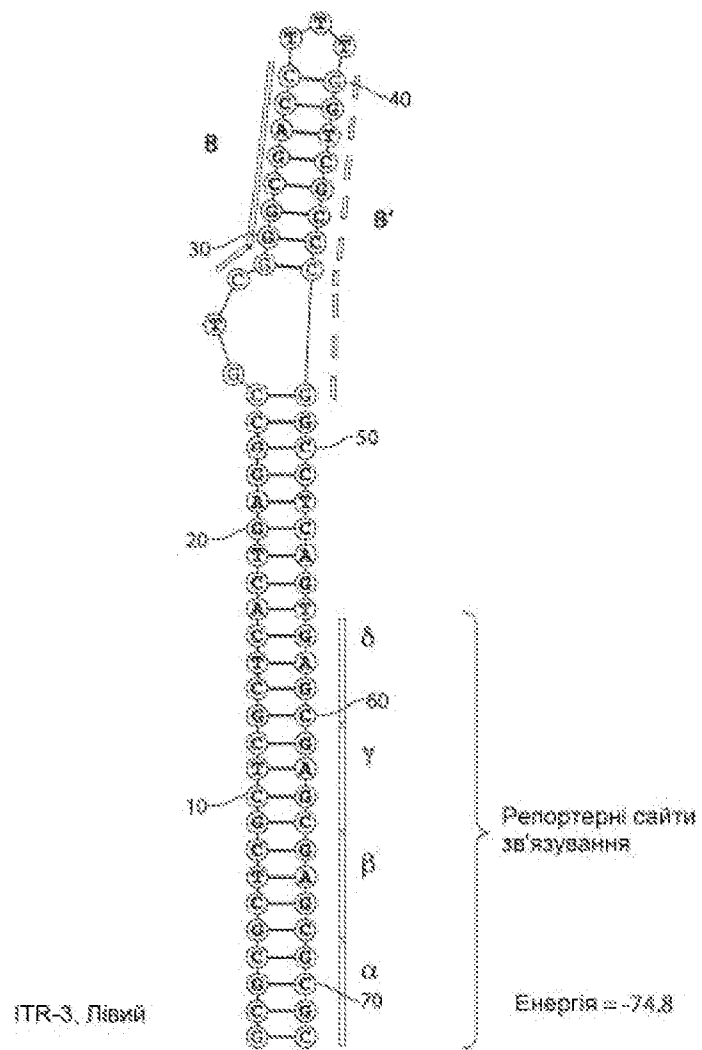


Fig. 10A

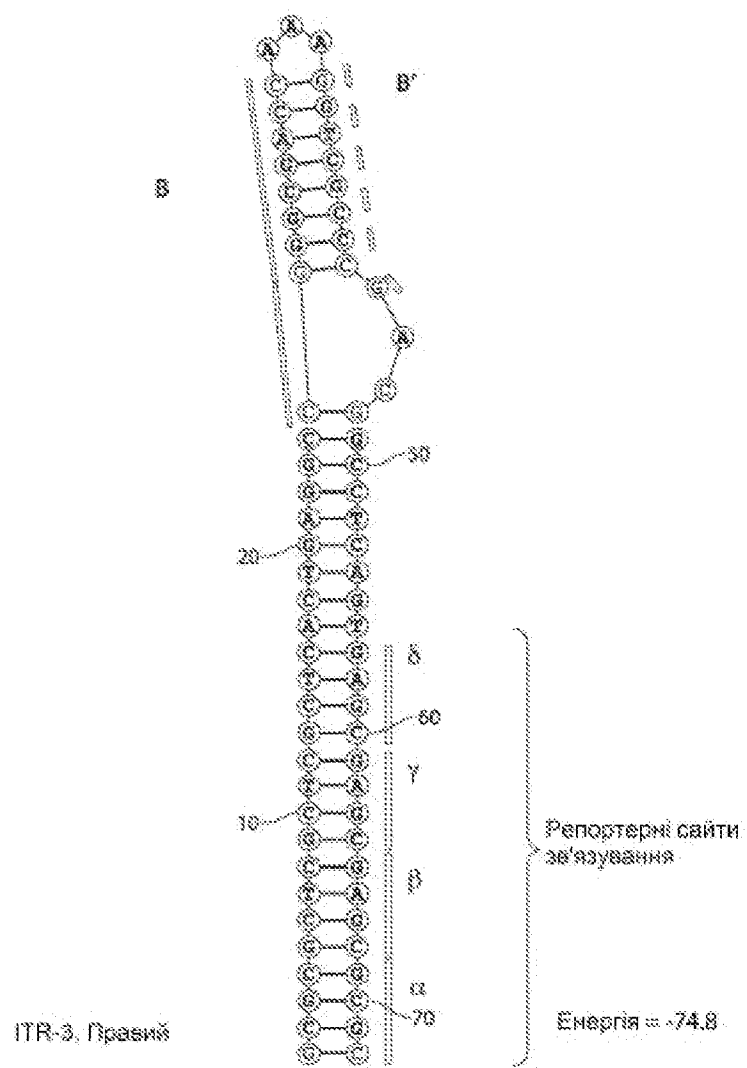


Fig. 10B

ITR-4, Лівий

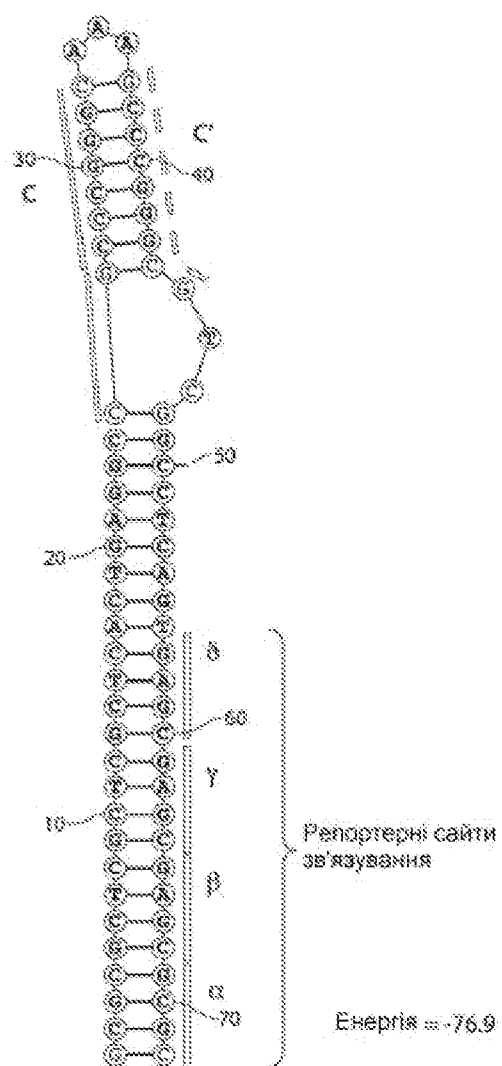
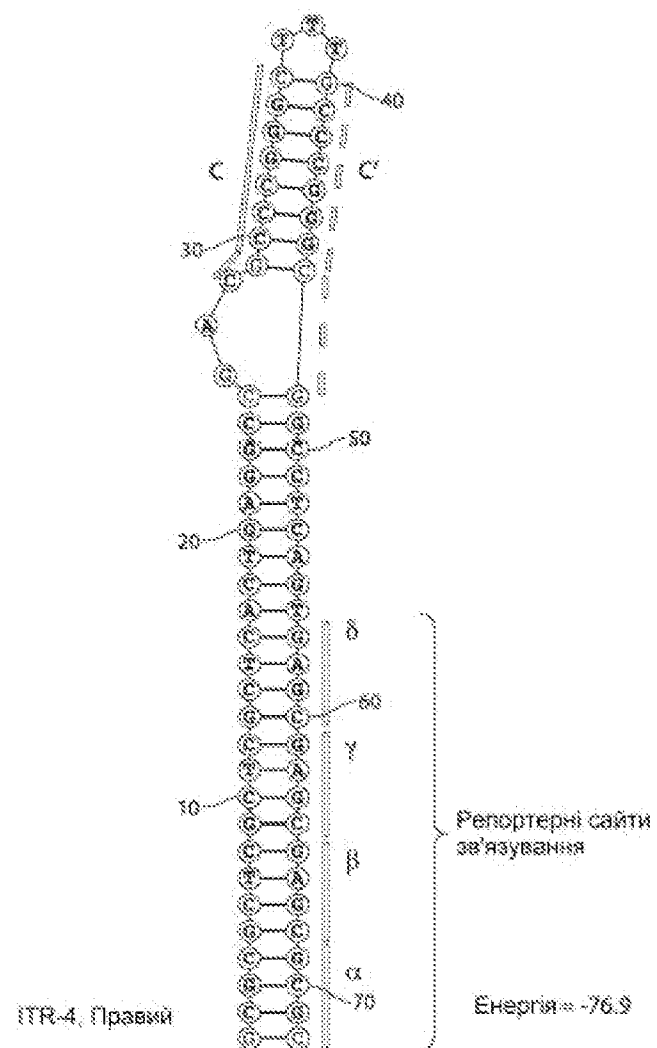
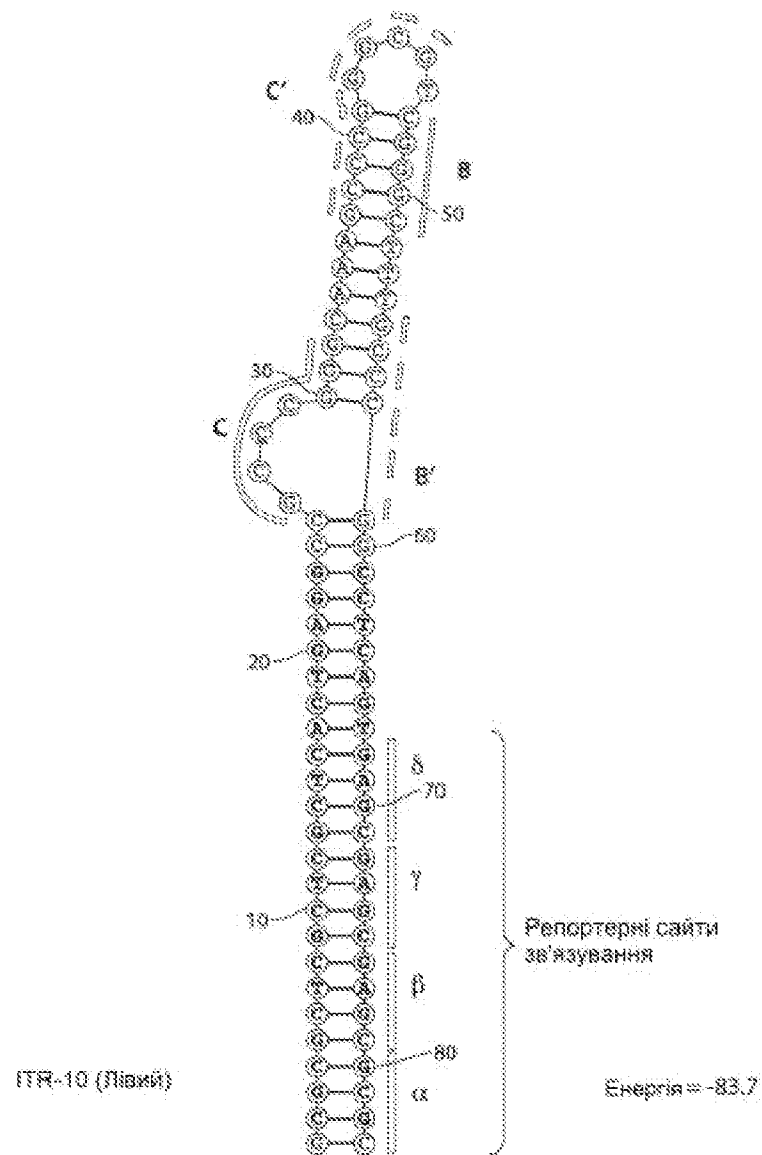


Fig. 11A



Фіг. 11В



Фіг. 12А

ITR-10 (Правий)

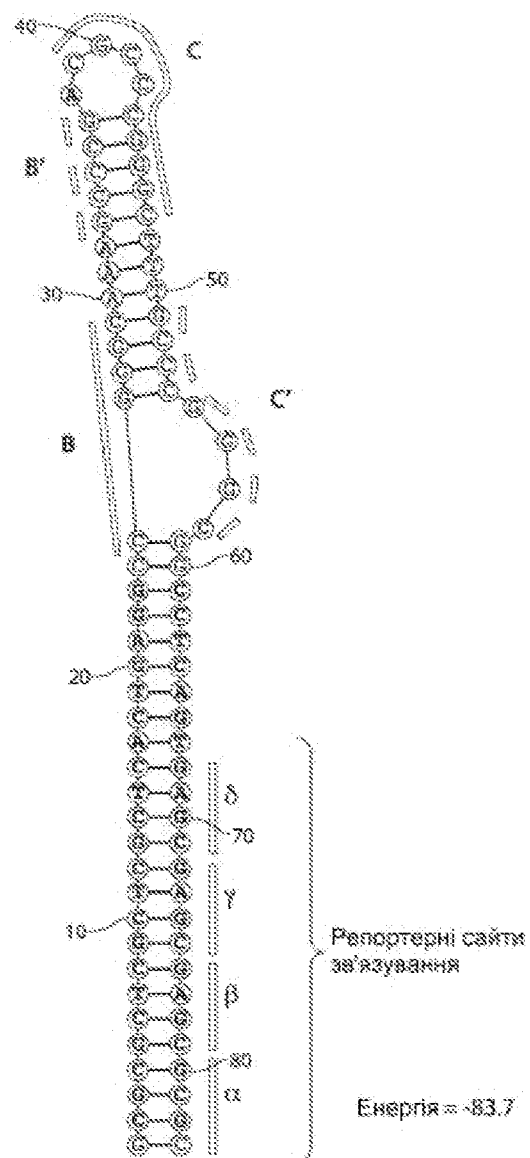


Fig. 12B

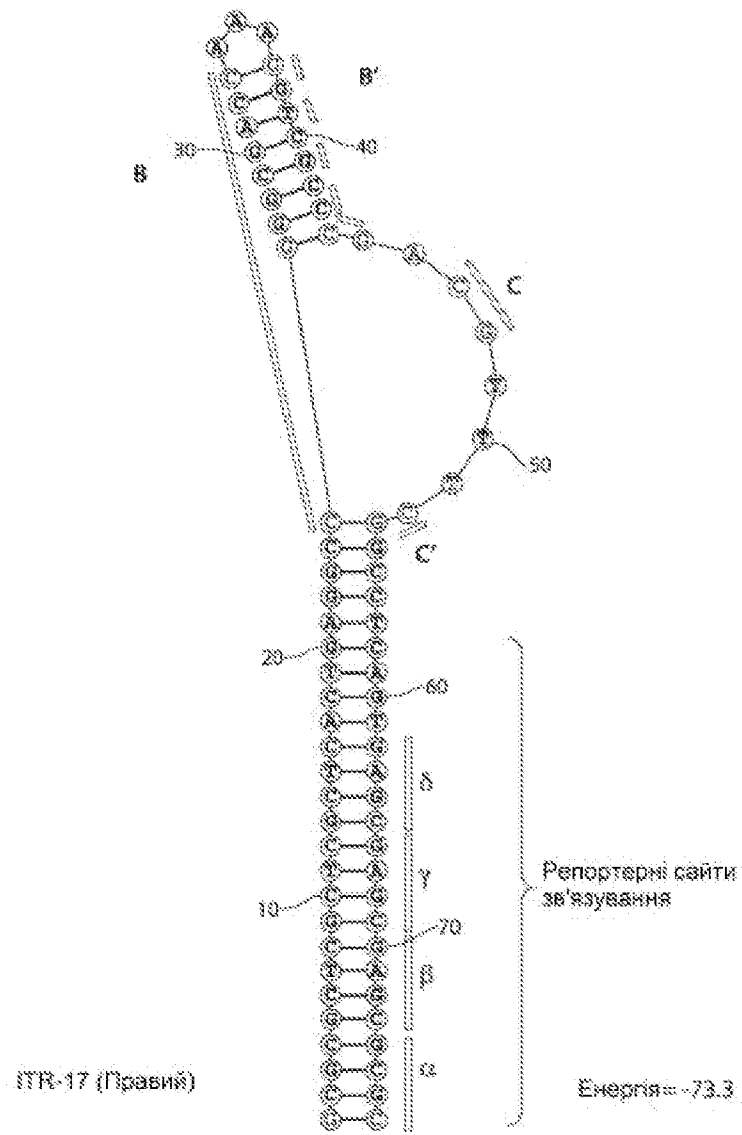


Fig. 13B

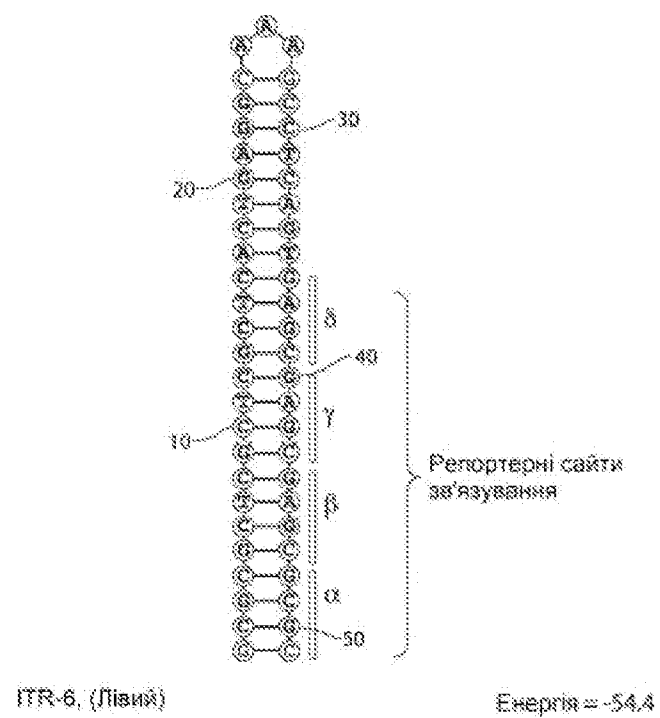


Fig. 14A

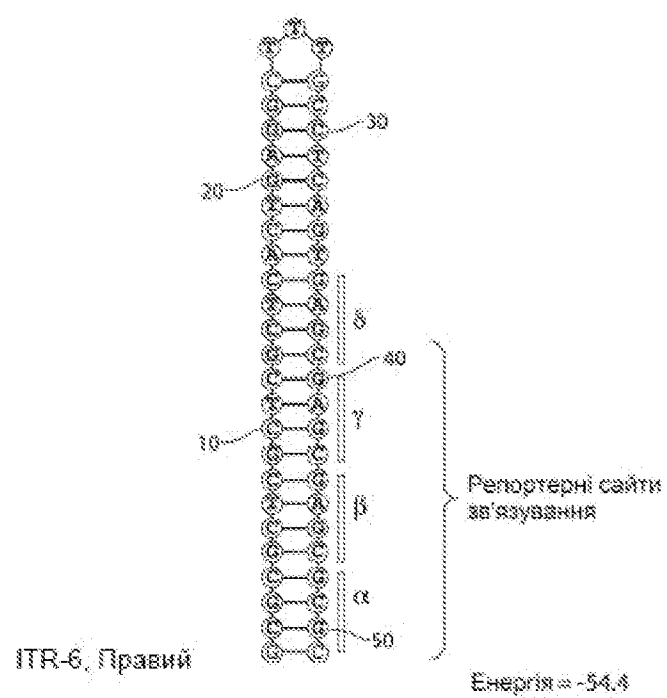


Fig. 14B

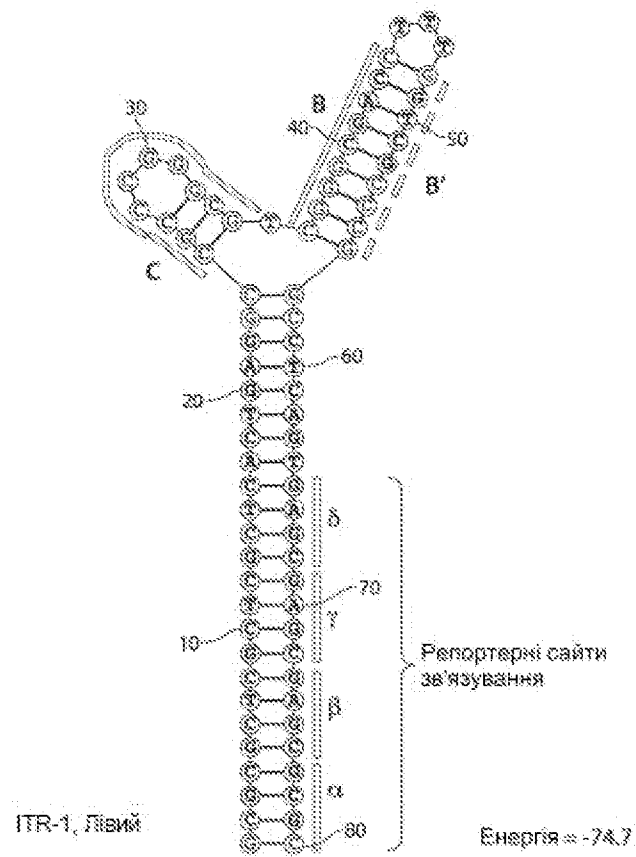


Fig. 15A

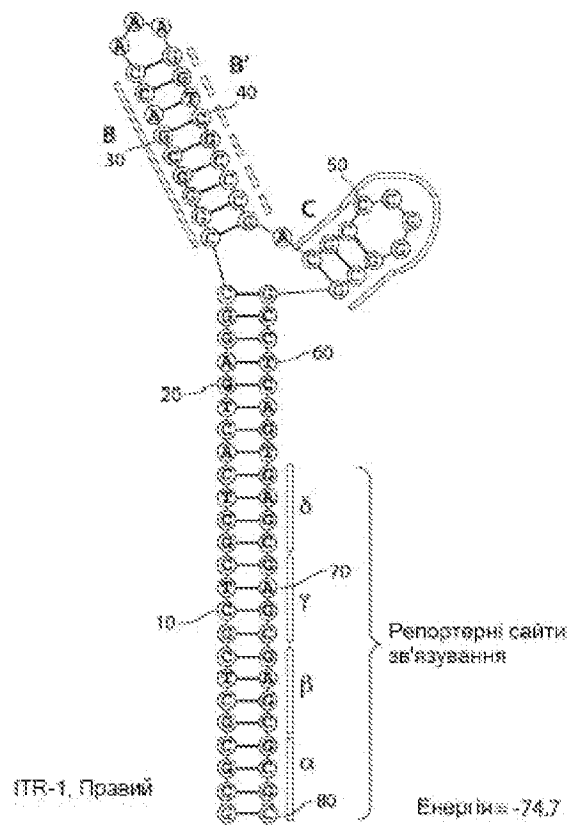


Fig. 15B

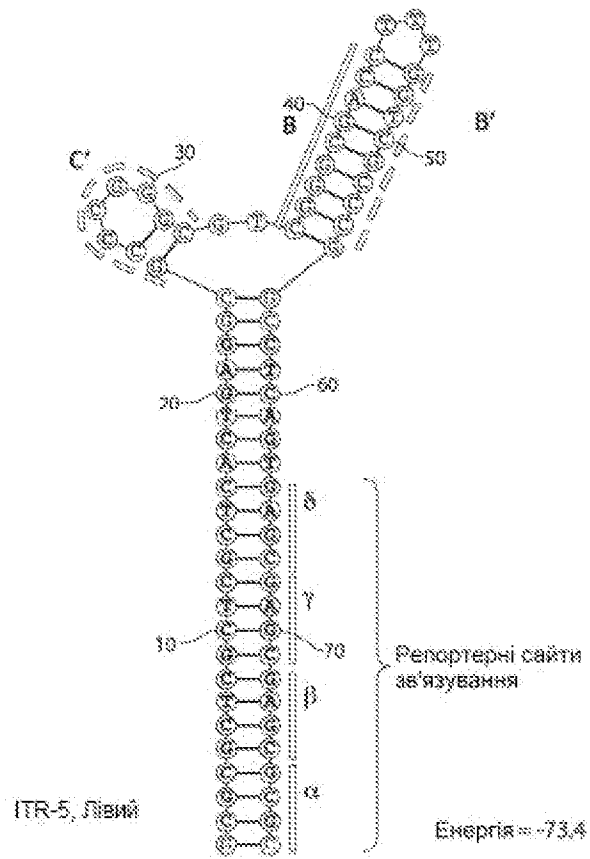


Fig. 16A

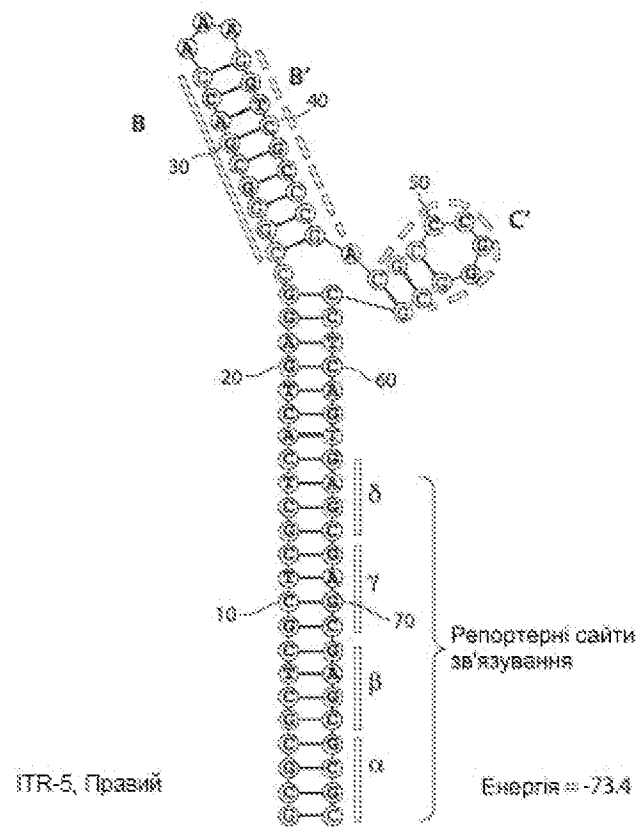
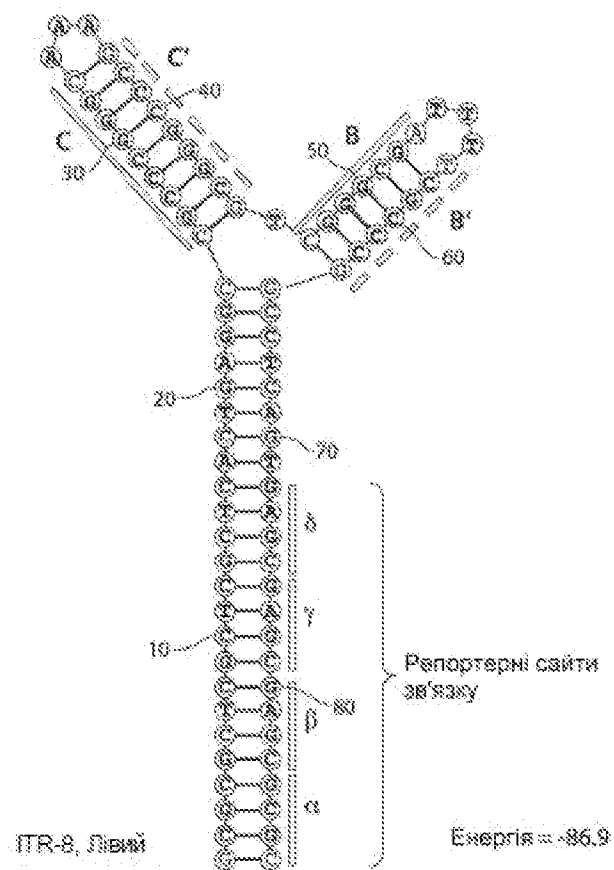
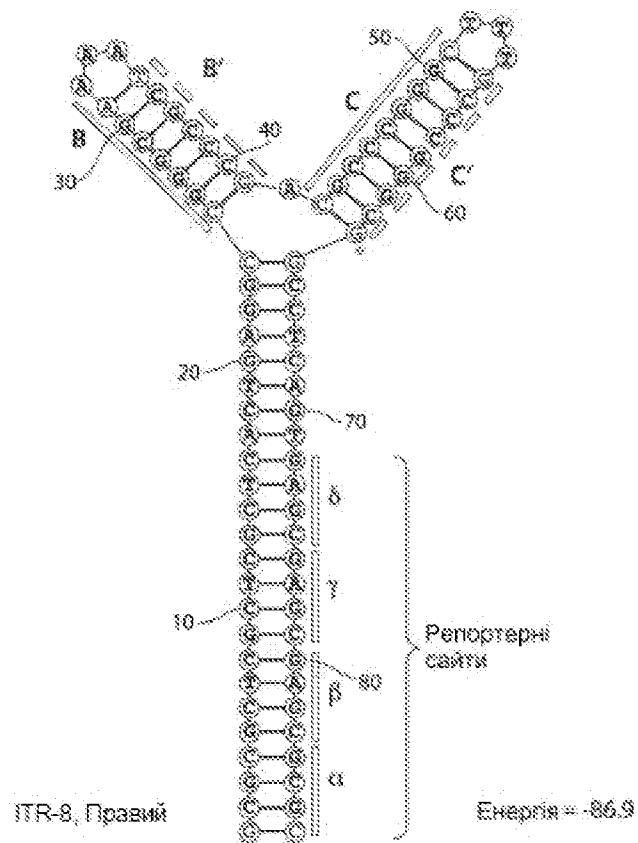


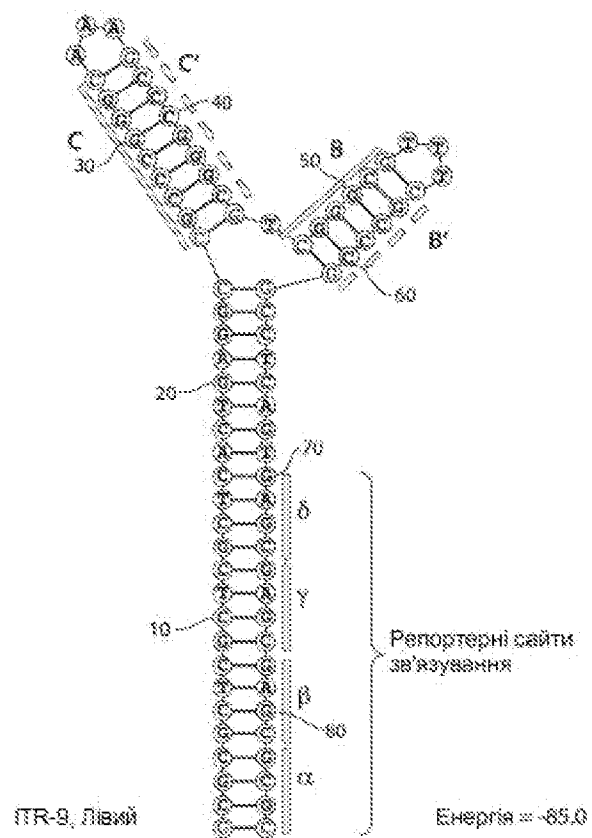
Fig. 16B



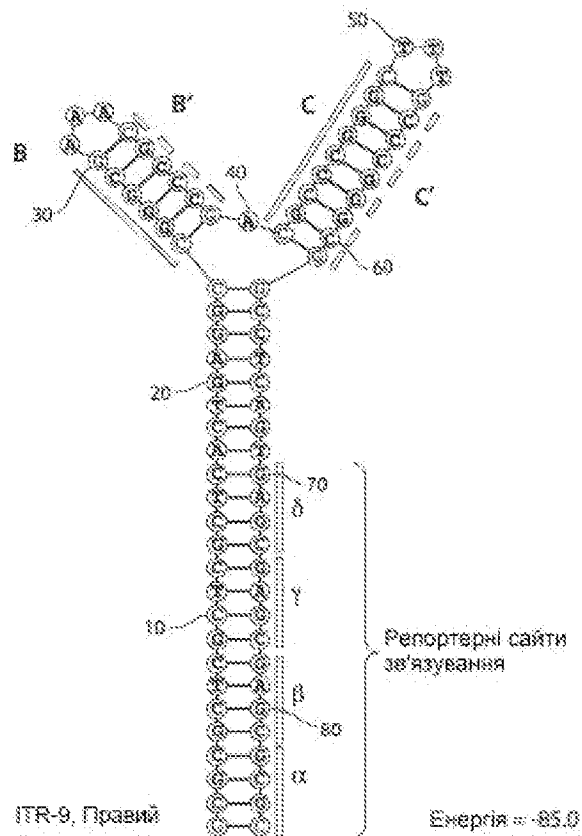
Фіг. 18А



Фіг. 18В



Фіг. 19А



Фіг. 19В

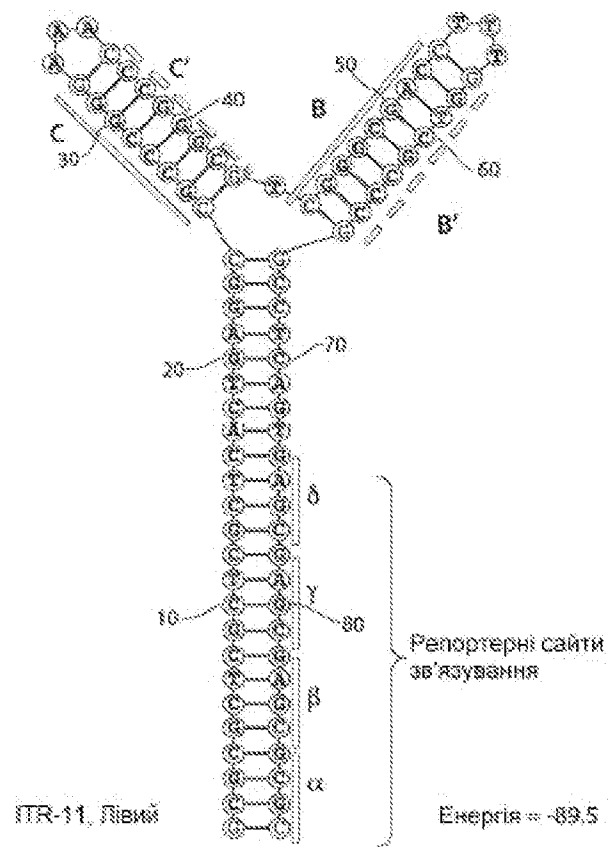


Fig. 20A

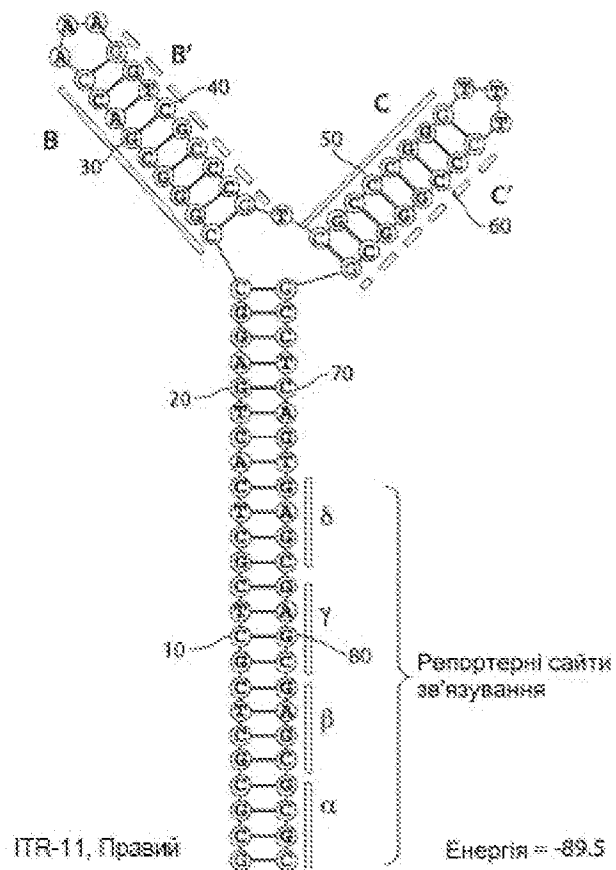
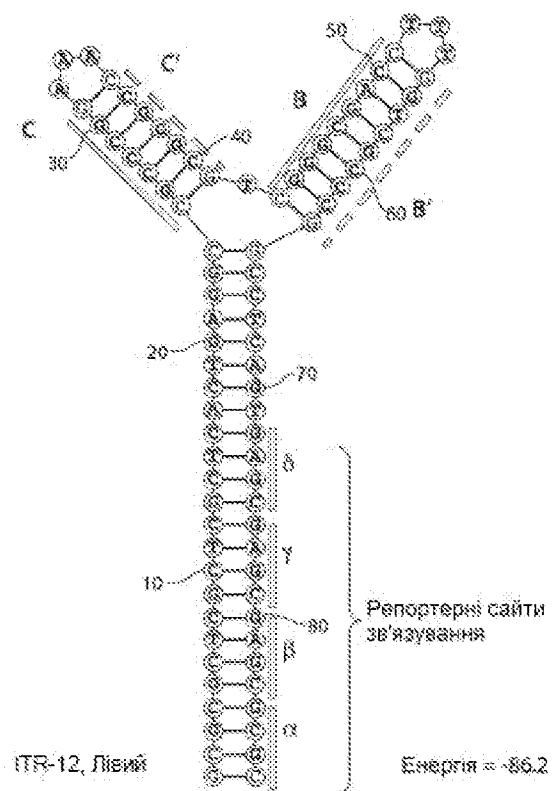
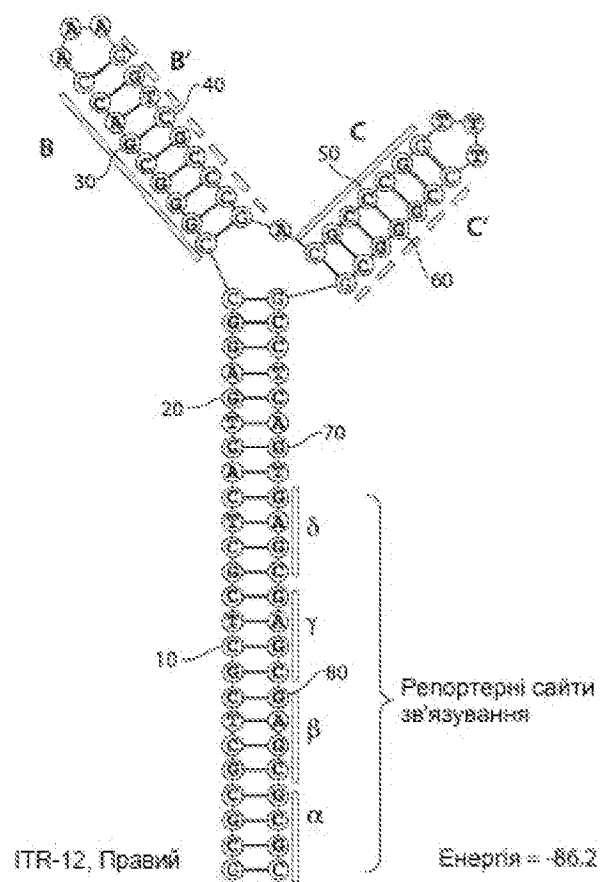


Fig. 20B



Фиг. 21А



Фиг. 21В

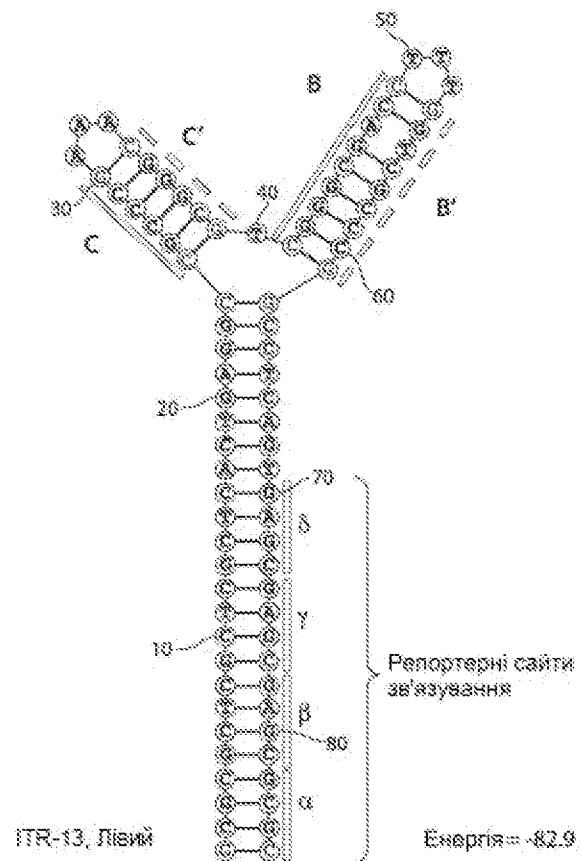


Fig. 22A

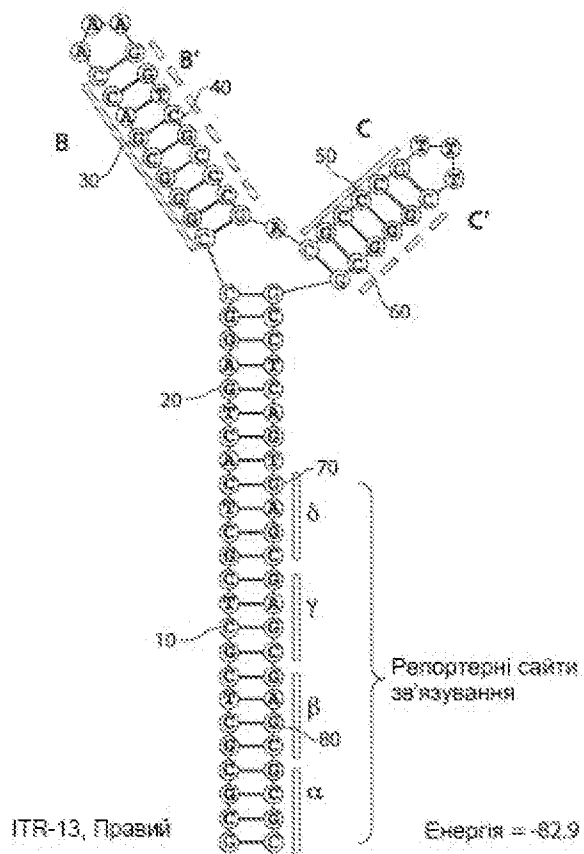


Fig. 22B

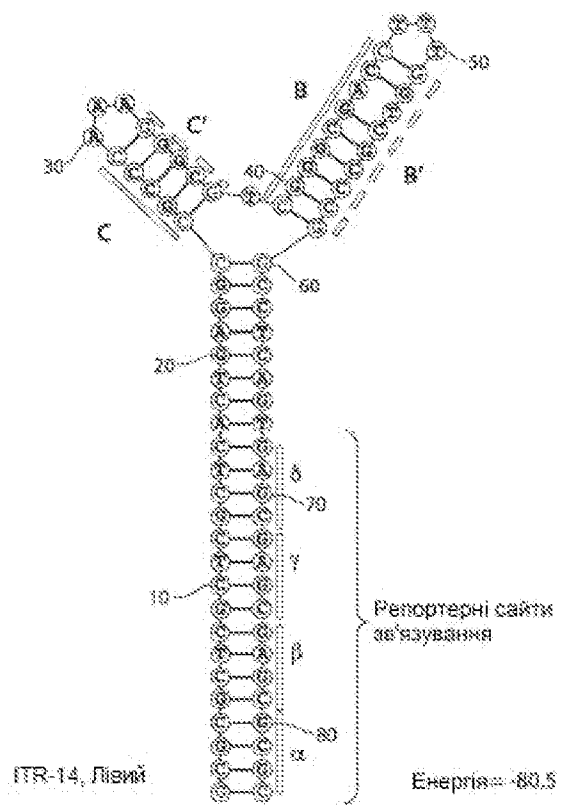


Fig. 23A

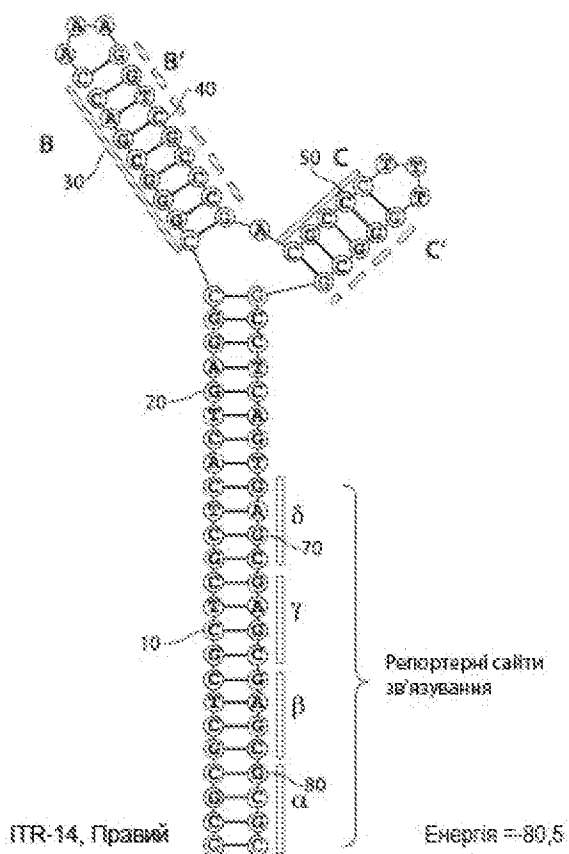


Fig. 23B

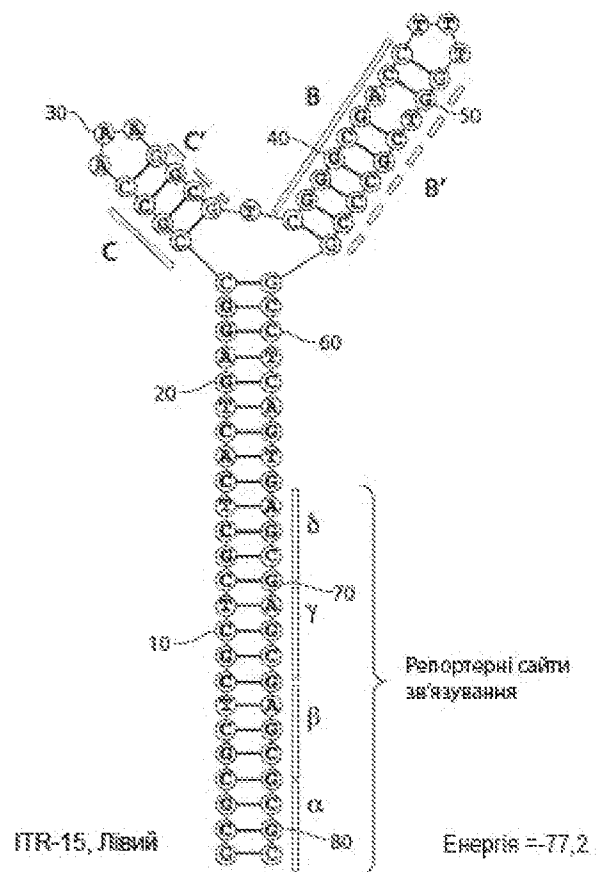


Fig. 24A

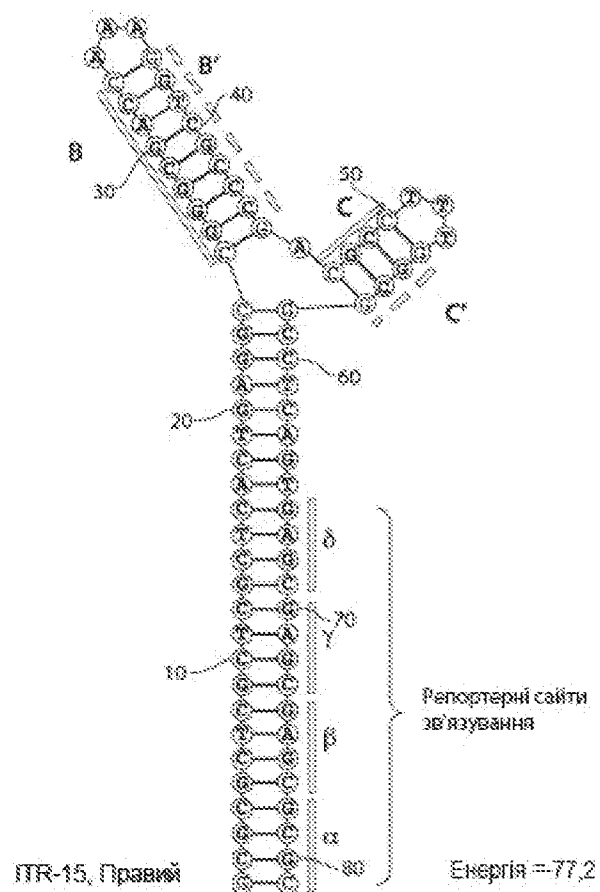
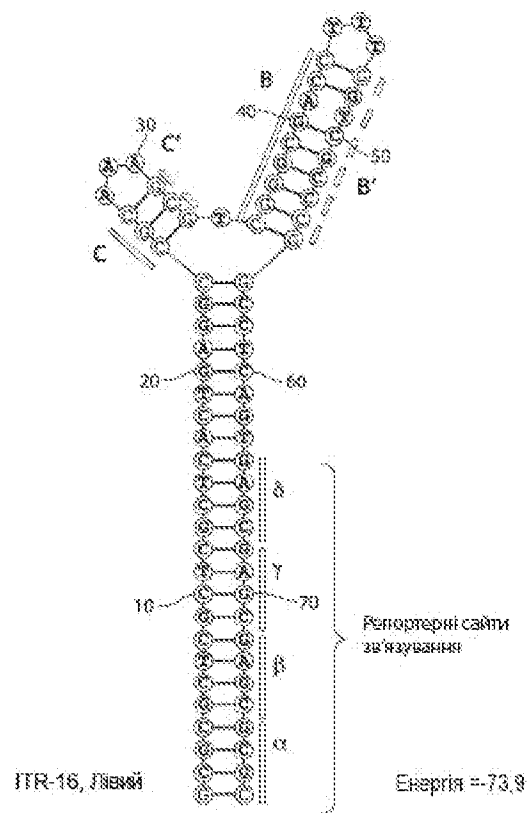
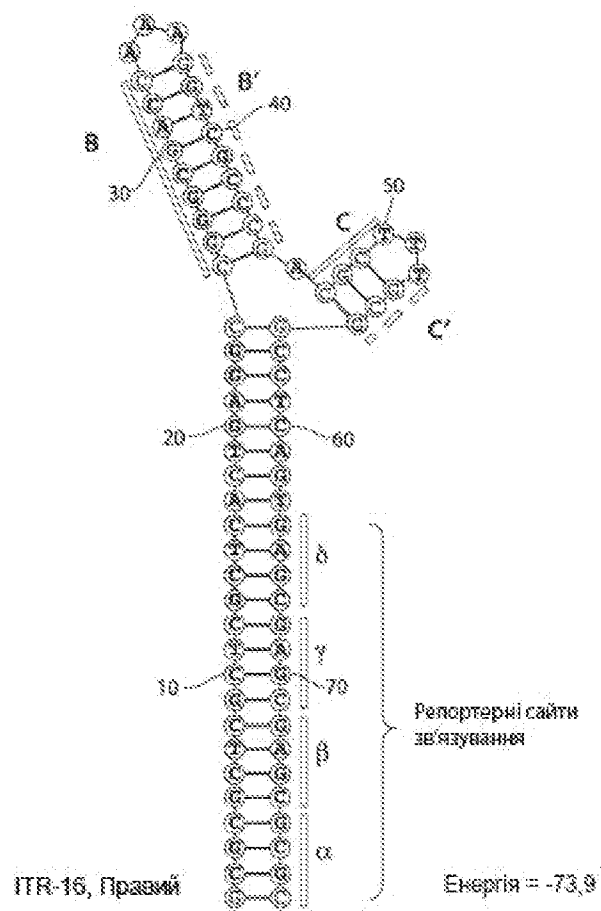


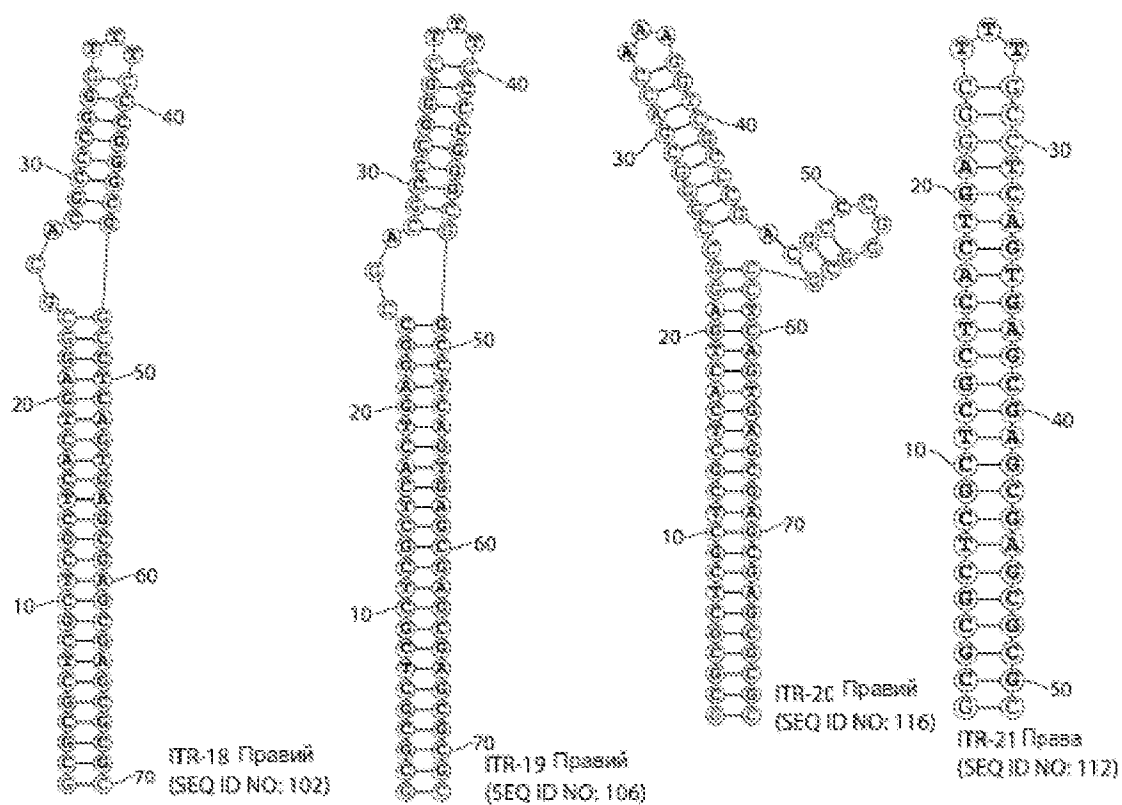
Fig. 24B



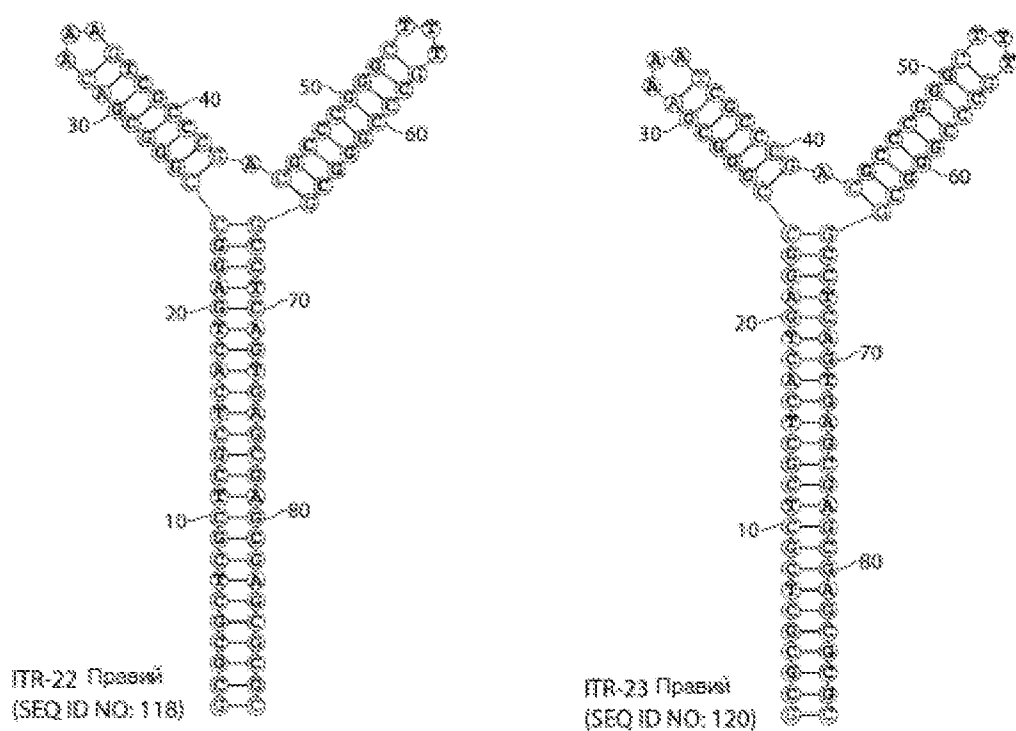
Фіг. 25А



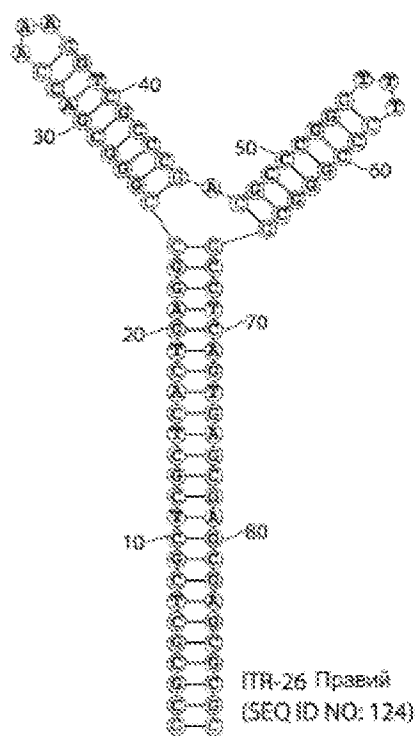
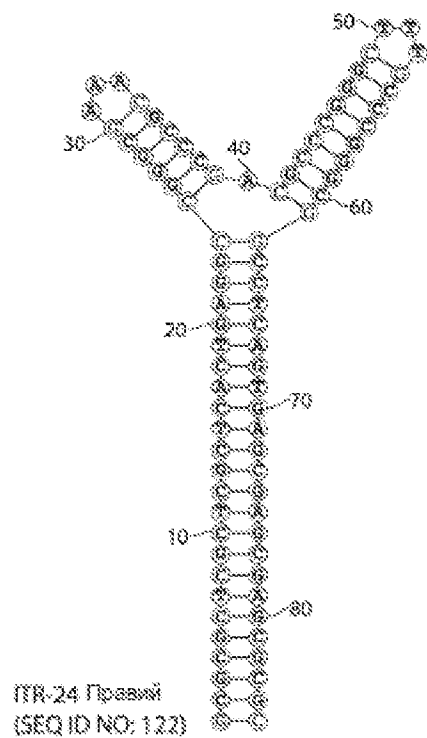
Фіг. 25В



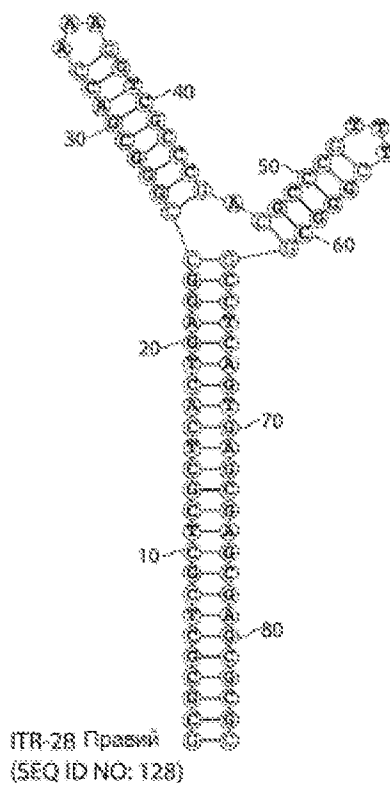
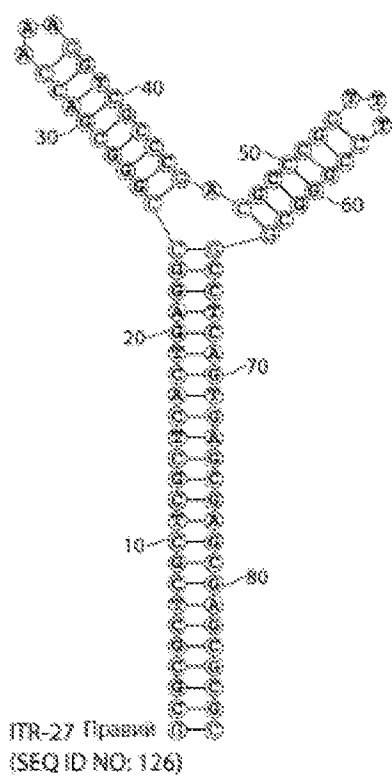
Фиг. 26A-1



Фиг. 26A-2



Фиг. 26А-3



Фиг. 26А-4

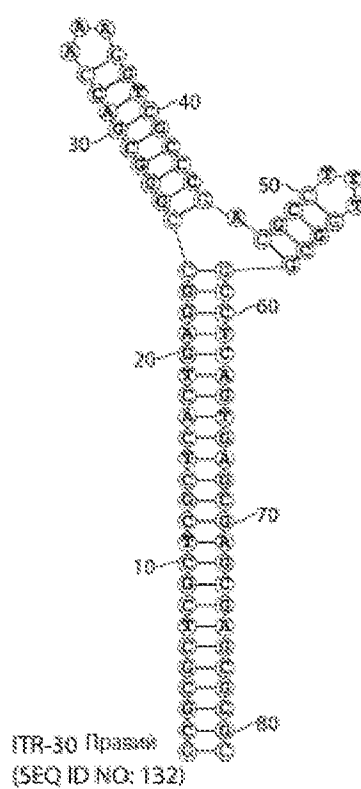
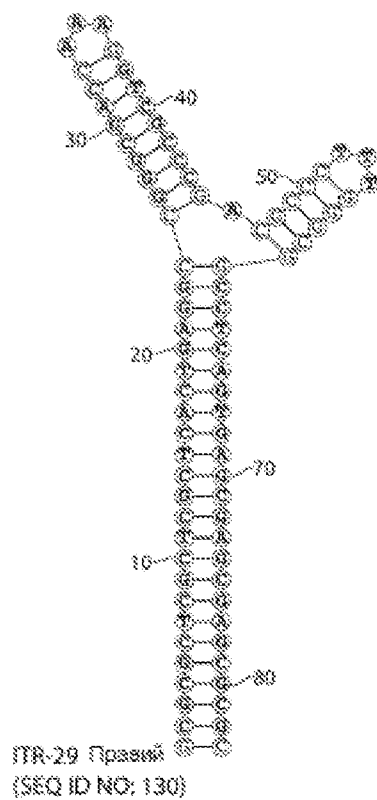


Fig. 26A-5

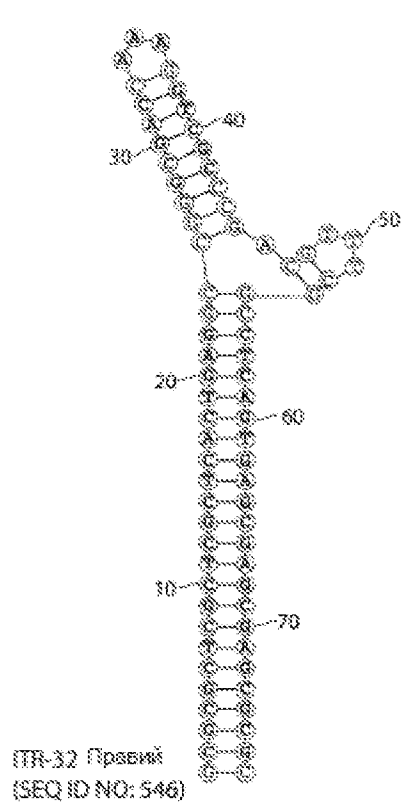
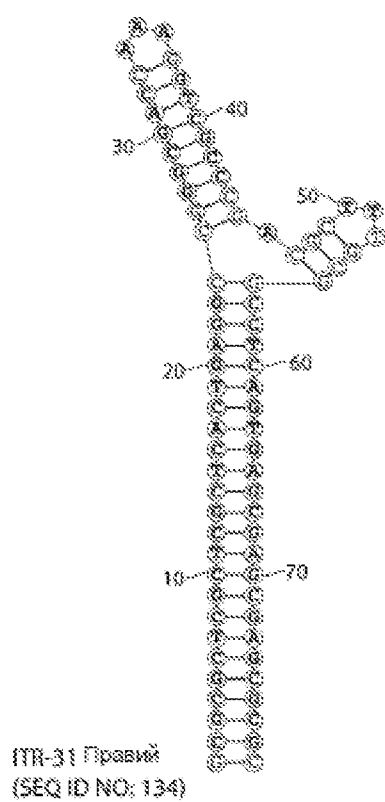
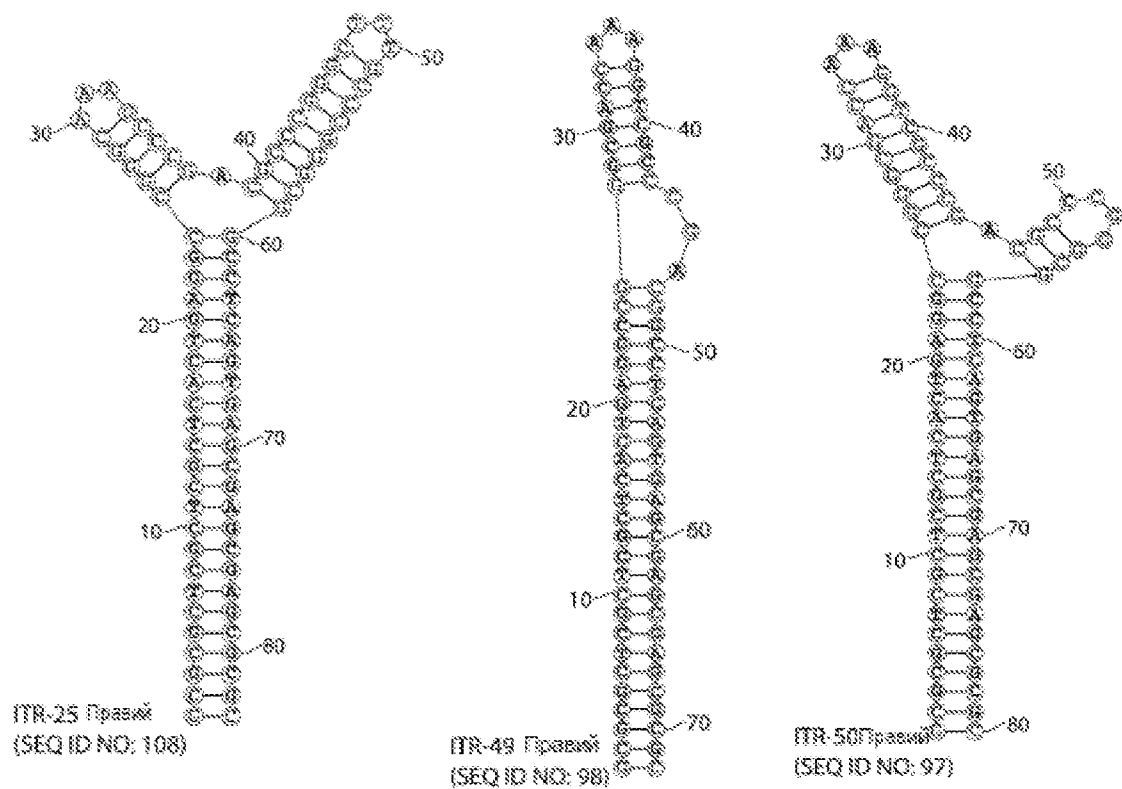
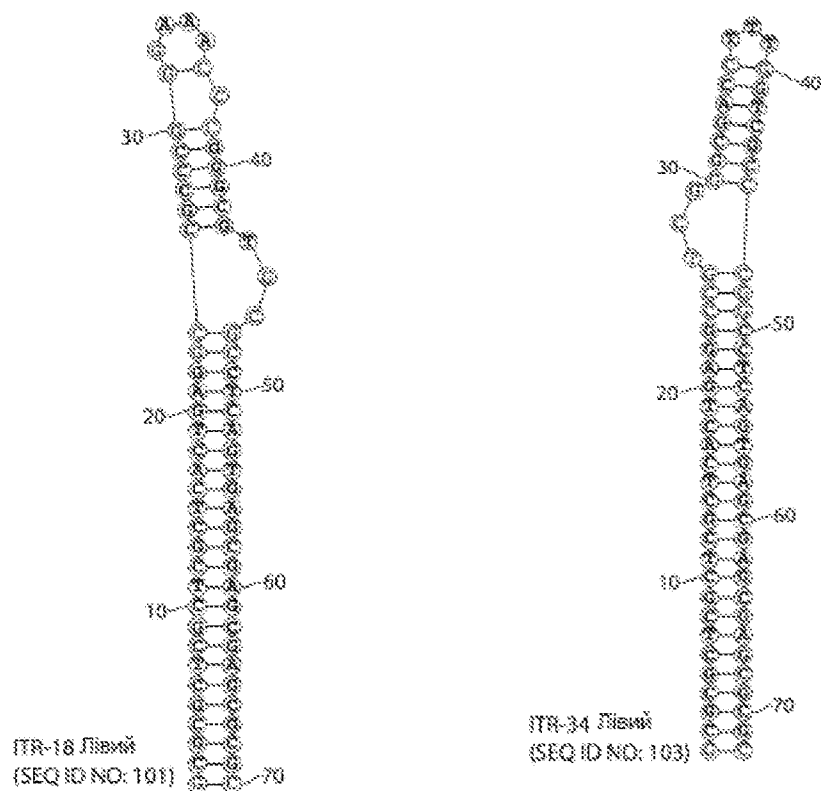


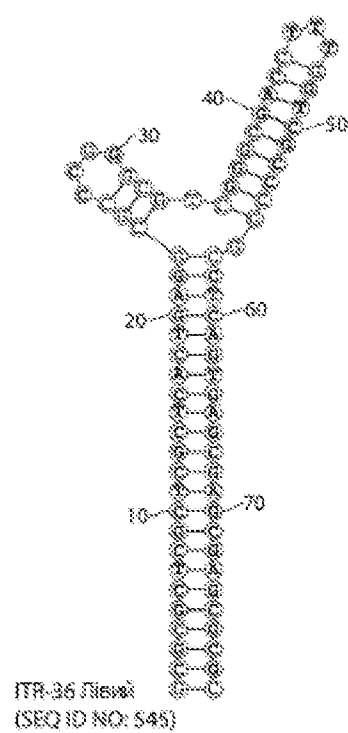
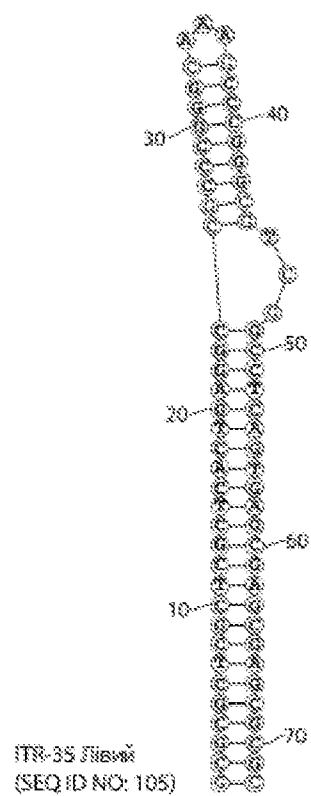
Fig. 26A-6



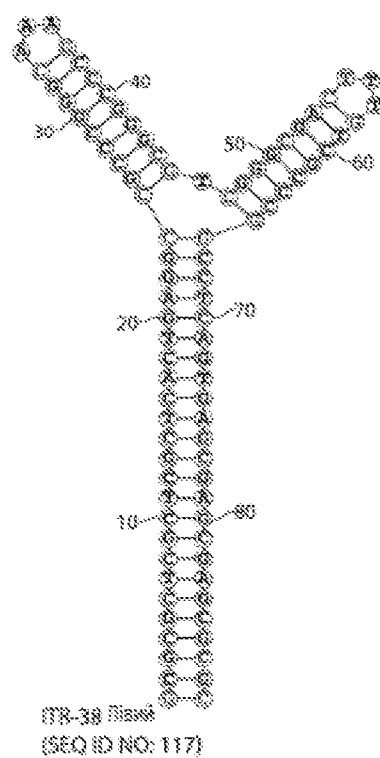
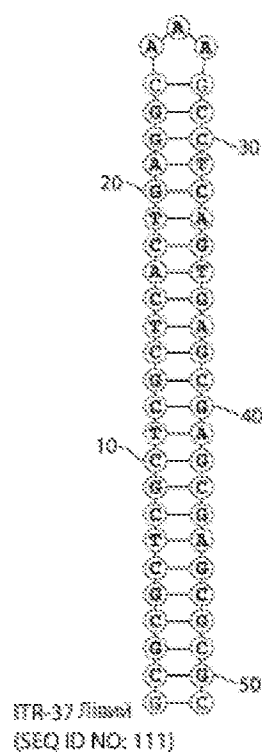
Фиг. 26А-7



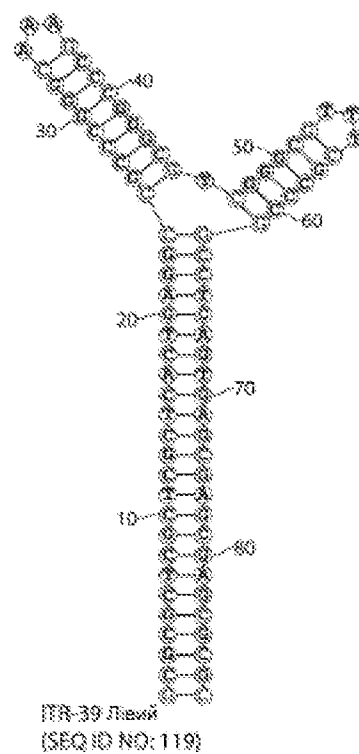
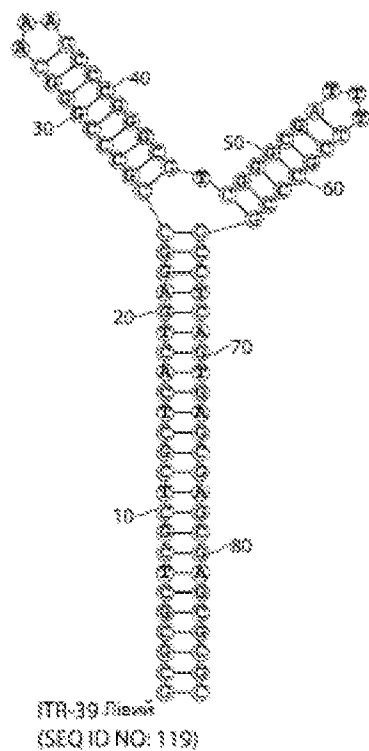
Фиг. 26Б-1



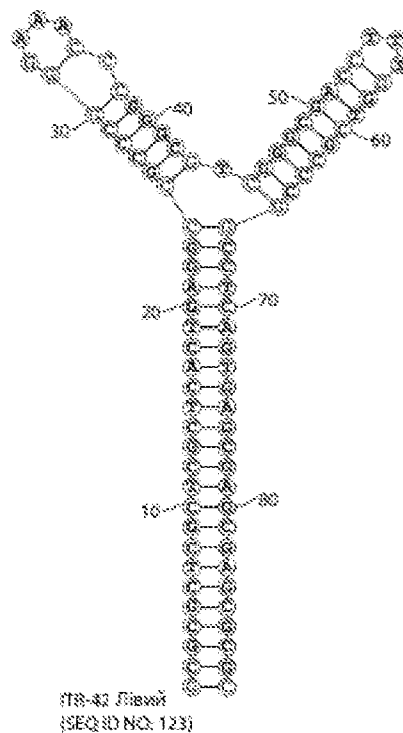
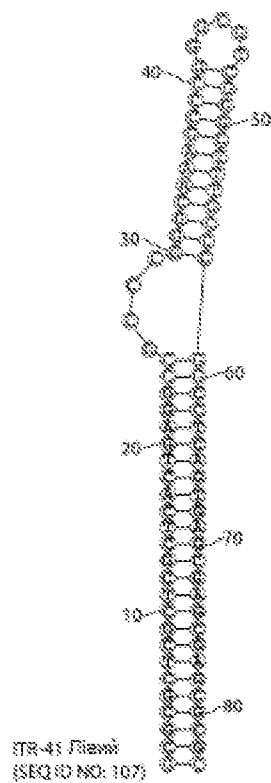
Φir. 26B-2



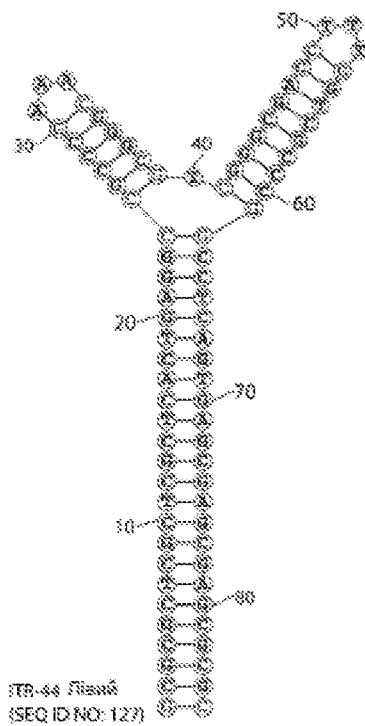
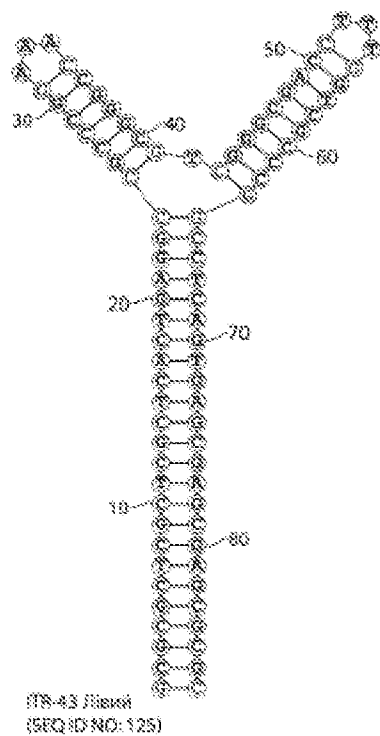
Φir. 26B-3



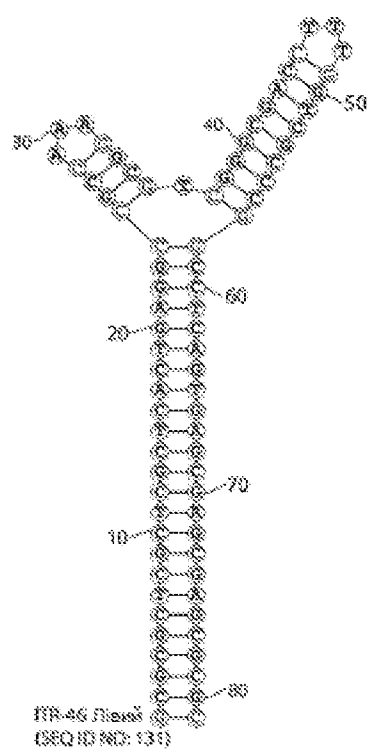
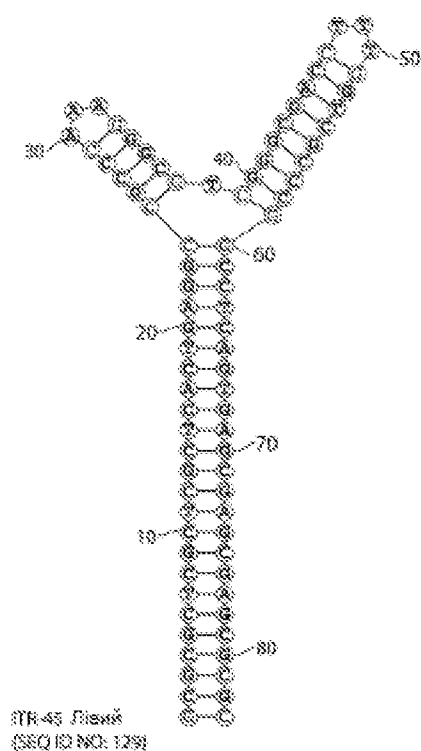
Фиг. 26B-4



Фиг. 26B-5



Фиг. 26B-6



Фиг. 26B-7

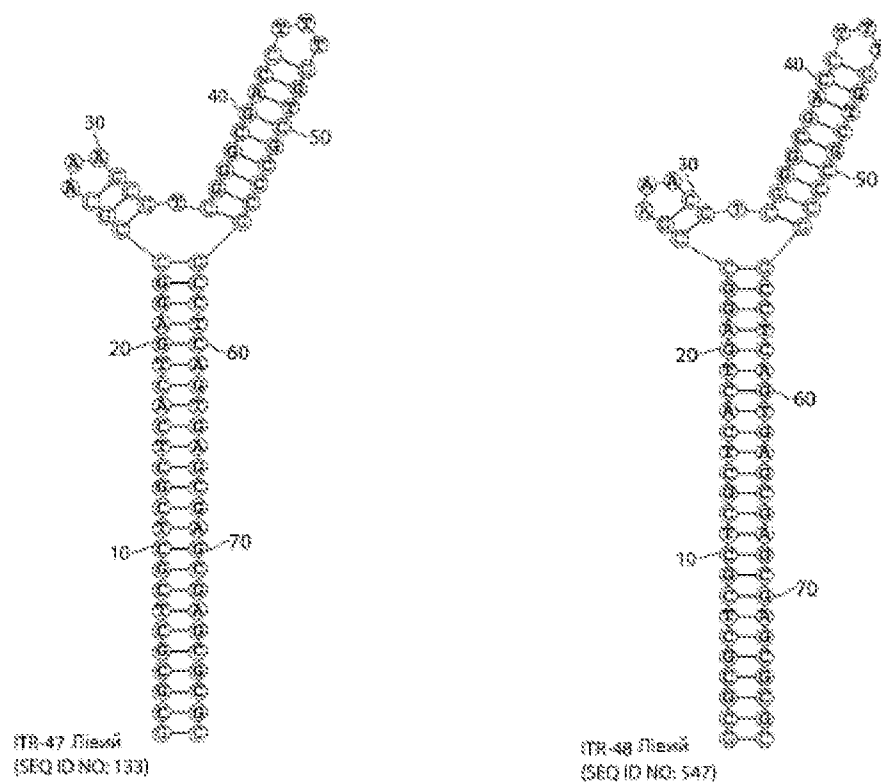


Fig. 26B-8

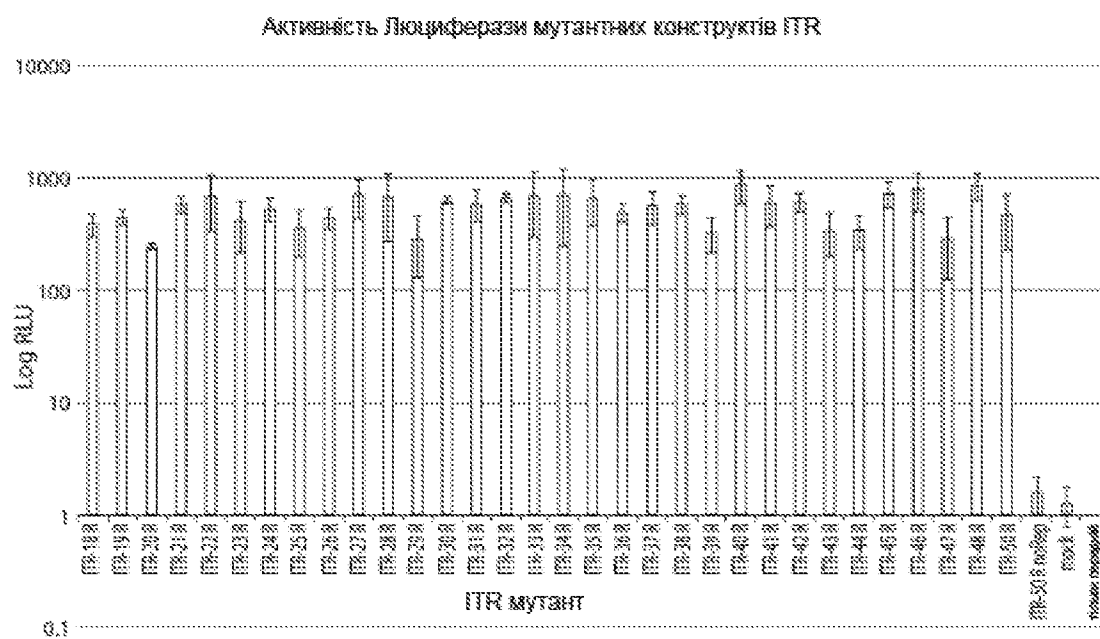
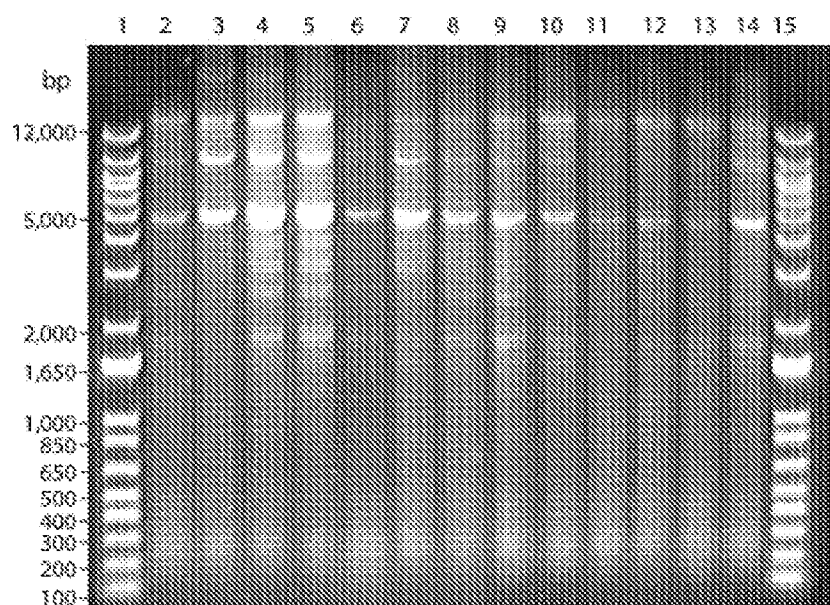
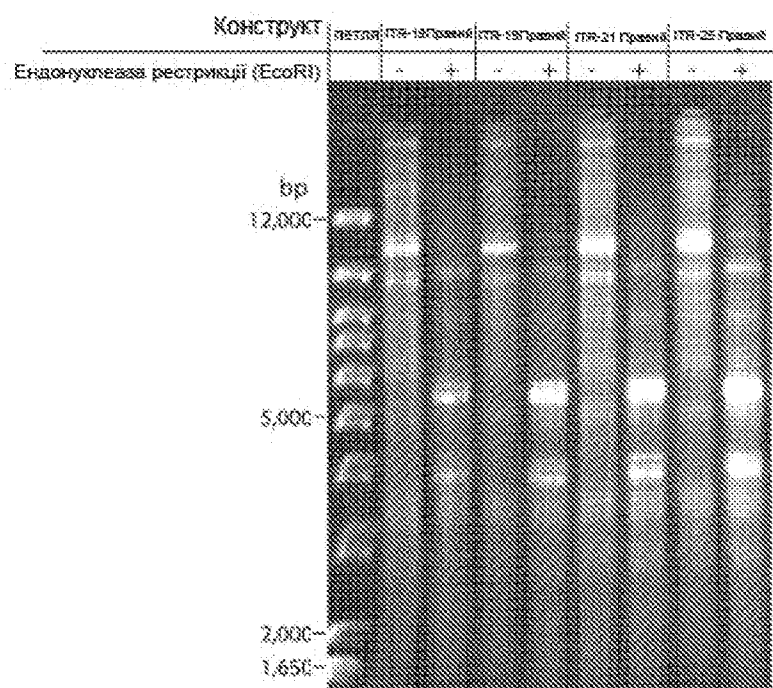


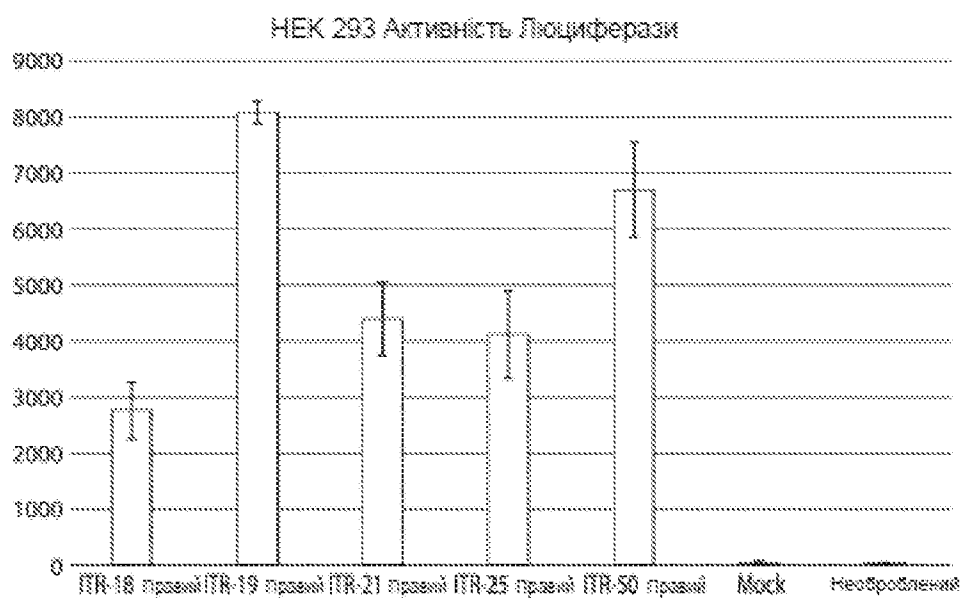
Fig. 27



Фиг. 28



Фиг. 29



Фиг. 30