

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-506266

(P2024-506266A)

(43)公表日 令和6年2月13日(2024.2.13)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード(参考)	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	4 C 0 8 6
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 C 0 8 7
A 6 1 P	7/10 (2006.01)	A 6 1 P	7/10		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全171頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2023-545212(P2023-545212)	(71)出願人	518138077
(86)(22)出願日	令和4年1月27日(2022.1.27)		スパーク セラピューティクス インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和5年9月26日(2023.9.26)		S P A R K T H E R A P E U T I C S , I N C .
(86)国際出願番号	PCT/US2022/014091		アメリカ合衆国, ペンシルベニア州, フィラデルフィア, スイート 1 3 0 0 , マーケット ストリート 3 7 3 7
(87)国際公開番号	WO2022/165027	(74)代理人	110000109
(87)国際公開日	令和4年8月4日(2022.8.4)		弁理士法人特許事務所サイクス
(31)優先権主張番号	63/261,603	(72)発明者	ライリング クリストファー
(32)優先日	令和3年9月24日(2021.9.24)		アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 3 4 1 エクストン ノース ホイットフォード ロード 7 0 2
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	バンコヴィッチ フランシス
(31)優先権主張番号	63/142,121		
(32)優先日	令和3年1月27日(2021.1.27)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31)優先権主張番号	63/201,466		
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 遺伝性血管性浮腫を治療するための組成物および方法

(57)【要約】

C1インヒビターをコードする核酸が記載される。核酸を含有する発現カセット、ベクター、細胞、および細胞株、ならびに遺伝性血管性浮腫等の補体介在性障害を治療するために核酸を使用する方法も記載される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

C1インヒビターをコードする核酸を含むポリヌクレオチドであって、核酸が、C1インヒビターの野生型コード配列と比較してCpGが減少したものであり、かつ/またはコード最適化されている、ポリヌクレオチド。

## 【請求項 2】

前記ポリヌクレオチドが配列番号：238、236または243に対して少なくとも85%同一の核酸配列を含み、かつ前記C1インヒビターが配列番号：181に対して少なくとも93%同一の配列を含む、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 3】

前記ポリヌクレオチドが配列番号：238に対して少なくとも85%同一の核酸配列を含み、かつ前記C1インヒビターが配列番号：181に対して少なくとも95%同一の配列を含む、請求項2に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 4】

前記ポリヌクレオチドが配列番号：238に対して少なくとも95%同一の核酸配列を含み、かつ前記C1インヒビターが配列番号：181に対して少なくとも95%同一の配列を含む、請求項3に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 5】

前記ポリヌクレオチドが配列番号：238に対して少なくとも97%同一の核酸配列を含み、かつ前記C1インヒビターが配列番号：181を含む、請求項4に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 6】

前記ポリヌクレオチドが前記核酸配列の5'末端にシグナルペプチド配列をさらに含み、かつ前記シグナルペプチド配列が配列番号：264の核酸に対して少なくとも95%同一である、請求項2～5のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 7】

核酸が、(1)配列番号：105の配列に対して少なくとも83%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(2)配列番号：106の配列に対して少なくとも83%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(3)配列番号：107の配列に対して少なくとも80%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(4)配列番号：108の配列に対して少なくとも80%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(5)配列番号：109の配列に対して少なくとも83%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(6)配列番号：110の配列に対して少なくとも84%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(7)配列番号：111の配列に対して少なくとも80%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(8)配列番号：112の配列に対して少なくとも83%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(9)配列番号：113の配列に対して少なくとも82%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(10)配列番号：114の配列に対して少なくとも82%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(11)配列番号：115の配列に対して少なくとも82%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(12)配列番号：116の配列に対して少なくとも80%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(13)配列番号：117の配列に対して少なくとも80%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(14)配列番号：118の配列に対して少なくとも83%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(15)配列番号：119の配列に対して少なくとも80%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(16)配列番号：120の配列に対して少なくとも80%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(17)配列番号：121の配列に対して少なくとも80%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(18)配列番号：122の配列に対して少なくとも83%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(19)配列番号：123の配列に対して少なくとも93%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(20)配列番号：124の配列に対して少なくとも92%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(21)配列番号：125の配列に対して少なくとも89%の配列同一性を有するポリヌクレオチ

10

20

30

40

50

ド；(22)配列番号：126の配列に対して少なくとも86%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(23)配列番号：127の配列に対して少なくとも92%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(24)配列番号：128の配列に対して少なくとも89%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(25)配列番号：129の配列に対して少なくとも89%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(26)配列番号：130の配列に対して少なくとも91%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(27)配列番号：131の配列に対して少なくとも92%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(28)配列番号：132の配列に対して少なくとも93%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(29)配列番号：133の配列に対して少なくとも93%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(30)配列番号：134の配列に対して少なくとも87%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(31)配列番号：135の配列に対して少なくとも89%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(32)配列番号：136の配列に対して少なくとも93%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(33)配列番号：137の配列に対して少なくとも93%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(34)配列番号：138の配列に対して少なくとも87%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(35)配列番号：139の配列に対して少なくとも86%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(36)配列番号：140の配列に対して少なくとも86%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(37)配列番号：141の配列と少なくとも86%の配列同一性を有するポリヌクレオチド：からなる群から選択され、任意に、C1インヒビターが、配列番号：181または192のアミノ酸配列を含む、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

10

20

30

40

50

**【請求項8】**

核酸が、24個未満のCpGジヌクレオチドを含み、任意に、0個のCpGジヌクレオチドを含む、請求項1～7に記載のポリヌクレオチド。

**【請求項9】**

核酸が、配列番号：105～142、145～147、156、171および172のいずれかのポリヌクレオチド配列を有する、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

**【請求項10】**

変異体C1インヒビターをコードする核酸を含むポリヌクレオチドであって、核酸が、配列番号：143～144、158、および165～170からなる群から選択され、任意に、変異体C1インヒビターが、配列番号：193～201のいずれかのアミノ酸配列を含む、ポリヌクレオチド。

**【請求項11】**

C1インヒビターをコードする核酸を含むポリヌクレオチドであって、核酸が配列番号：119の配列を含み、かつC1インヒビターが192のアミノ酸配列を含む、ポリヌクレオチド。

**【請求項12】**

C1インヒビターまたは変異体C1インヒビターをコードするポリヌクレオチド配列の5'末端に作動可能に連結されたシグナルペプチド配列をコードする核酸を含む、請求項1～5および7～11のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

**【請求項13】**

シグナルペプチドが、C1インヒビターシグナルペプチド、ヒトキモトリプシノーゲンB2シグナルペプチド、ALBシグナルペプチド、ORM1シグナルペプチド、TFシグナルペプチド、AMBIPシグナルペプチド、LAMP1シグナルペプチド、BTN2A2シグナルペプチド、CD300シグナルペプチド、NOTCH2シグナルペプチド、STRCシグナルペプチド、AHSGシグナルペプチド、SYN1シグナルペプチド、SYN2シグナルペプチド、SYN3シグナルペプチド、およびSYN4シグナルペプチドからなる群から選択される、請求項12に記載のポリヌクレオチド。

**【請求項14】**

シグナルペプチドが、配列番号：84～103の1つのポリヌクレオチド配列を有する

、請求項 13 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 15】

発現制御エレメントに作動可能に連結された、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む発現カセット。

【請求項 16】

C1インヒビターをコードする核酸の3'末端に作動可能に連結されたポリアデニル化配列をさらに含む、請求項 15 に記載の発現カセット。

【請求項 17】

発現制御エレメントまたはポリアデニル化配列が、野生型の発現制御エレメントまたはポリアデニル化配列と比較してCpGが減少したものである、請求項 15 または 16 に記載の発現カセット。

10

【請求項 18】

発現制御エレメントが、ApoE/hAATエンハンサー/プロモーター配列を含む、請求項 15 ~ 18 のいずれか一項に記載の発現カセット。

【請求項 19】

ポリアデニル化配列が、ウシ成長ホルモン (bGH) ポリアデニル化配列を含む、請求項 15 ~ 18 のいずれか一項に記載の発現カセット。

【請求項 20】

ApoE/hAATエンハンサー/プロモーター配列またはbGHポリアデニル化配列が、野生型のApoE/hAATエンハンサー/プロモーター配列またはbGHポリアデニル化配列と比較してCpGが減少したものである、請求項 18 または 19 に記載の発現カセット。

20

【請求項 21】

ApoEエンハンサー配列が、配列番号：225 および74 ~ 76 の1つのポリヌクレオチド配列を含む、請求項 18 ~ 20 のいずれか一項に記載の発現カセット。

【請求項 22】

hAATプロモーター配列が、配列番号：79 または80 のポリヌクレオチド配列を含む、請求項 18 ~ 21 のいずれか一項に記載の発現カセット。

【請求項 23】

bGHポリアデニル化配列が、配列番号：83 のポリヌクレオチド配列を含む、請求項 18 ~ 22 のいずれか一項に記載の発現カセット。

30

【請求項 24】

イントロンをさらに含む、請求項 15 ~ 23 のいずれか一項に記載の発現カセット。

【請求項 25】

前記イントロンが、ヒトヘモグロビン (HBB) 由来イントロンを含む、請求項 24 に記載の発現カセット。

【請求項 26】

ヒトヘモグロビン (HBB) 由来イントロン配列が、配列番号：81 または82 のポリヌクレオチド配列を含む、請求項 25 に記載の発現カセット。

【請求項 27】

1 以上のエンハンサーをさらに含む、請求項 15 ~ 26 のいずれか一項に記載の発現カセット。

40

【請求項 28】

エンハンサーが、ApoE、2xApoE、4xApoE、hAAT、WPRE3、およびWPREからなる群から選択される、請求項 27 に記載の発現カセット。

【請求項 29】

エンハンサー配列がコドン最適化されている、請求項 28 に記載の発現カセット。

【請求項 30】

エンハンサーが、配列番号：225 および74 ~ 78 および173 ~ 178 の1つのポリヌクレオチド配列を含む、請求項 28 または 29 に記載の発現カセット。

【請求項 31】

50

miRNA結合部位、制御されたIre1依存性崩壊(RIDD)配列、急性期応答エレメント(APRE)、5' UTR、および3' UTRからなる群より選択される1以上の応答エレメントをさらに含む、請求項15~28のいずれか一項に記載の発現カセット。

【請求項32】

発現カセットがmiRNA結合部位をさらに含み、任意に、miRNA結合部位が配列番号：179のポリヌクレオチド配列を含む、請求項31に記載の発現カセット。

【請求項33】

発現カセットがRIDD配列をさらに含み、任意に、RIDD配列が、配列番号：185~187の1つのポリヌクレオチド配列を含む、請求項31に記載の発現カセット。

【請求項34】

発現カセットがAPRE配列をさらに含み、任意に、APRE配列が、配列番号：77、78、180、182および183の1つのポリヌクレオチド配列を含む、請求項31に記載の発現カセット。

【請求項35】

発現カセットが3' UTRをさらに含み、任意に、3' UTRが配列番号：184のポリヌクレオチド配列を含む、請求項31に記載の発現カセット。

【請求項36】

請求項1~35のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは発現カセットを含む、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター。

【請求項37】

AAVベクターが、(a) AAVカプシドの1以上、および(b) AAV ITRがポリヌクレオチドまたは発現カセットの5'末端または3'末端に隣接する1以上のAAV逆方向末端反復(ITR)を含む、請求項36に記載のAAVベクター。

【請求項38】

ITRの少なくとも1以上が、減少したCpGを有するように改変されている、請求項37に記載のAAVベクター。

【請求項39】

AAVベクターが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh10、Rh74(配列番号：188)、AAV3B、AAV-2i8、配列番号：226、配列番号：189、配列番号：190、および/もしくは配列番号：191に対して90%以上の配列同一性を有する改変型もしくは変異型AAV VP1、VP2および/もしくはVP3カプシド；またはAAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh10、Rh74(配列番号：188)、AAV3B、AAV-2i8、配列番号：226、配列番号：189、配列番号：190、および/もしくは配列番号：191に対して95%以上の配列同一性を有するカプシド；またはAAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh10、Rh74(配列番号：188)、AAV3B、AAV-2i8、配列番号：226、配列番号：189、配列番号：190、および/もしくは配列番号：191と100%の配列同一性を有するカプシドを含むカプシド血清型を有する、請求項36~38のいずれか一項に記載のAAVベクター。

【請求項40】

ITRが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh10、Rh74、AAV3B、AAV血清型のいずれかの1以上のITR、またはこれらの組み合わせを含む、請求項36~39のいずれか一項に記載のAAVベクター。

【請求項41】

(1) 5' AAV ITRであって、任意にAAV2の5' ITRであり、任意に配列番号：70または72のポリヌクレオチド配列を含む5' ITRである、5' AAV ITR；

(2) 1以上の組織特異的エレメントであって、1以上の組織特異的エレメントがプロモーターであり、任意にプロモーターが配列番号：79または80のポリヌクレオチド配

10

20

30

40

50

列を含む、組織特異的エレメント；

(3) 1以上の効力エレメントであって、1以上の効力エレメントがエンハンサーまたはポリA配列であり、任意に1以上の効力エレメントが、配列番号：225、74～76、83、173～178からなる群から選択されるポリヌクレオチド配列を有する、効力エレメント；

(4) 1以上の応答エレメントであって、1以上の応答エレメントが、miRNA結合部位、制御されたIre1依存性崩壊(RIDD)配列、急性期応答エレメント(APRE)、イントロン、または5' UTRもしくは3' UTR配列であり、任意に1以上の応答エレメントが、配列番号：77～78、81～82、および179～187からなる群から選択されるポリヌクレオチド配列を有する、応答エレメント；

(5) シグナルペプチドをコードする核酸であって、任意に配列番号：203～218からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むシグナルペプチドをコードする核酸であり、任意に配列番号：84～103からなる群から選択されるポリヌクレオチド配列である、核酸；

(6) C1インヒビター、変異体C1インヒビター、およびこれらの融合体または組合せのうちの少なくとも1つをコードする核酸であって、

(a) 任意に配列番号：181または192のアミノ酸配列を有するC1インヒビターであり、任意に配列番号：104～142、145～147、156、および171～172からなる群より選択されるポリヌクレオチド配列であり；

(b) 任意に配列番号：193～201からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する変異体C1インヒビターであり、任意に配列番号：143、144、158、および165～170からなる群から選択されるポリヌクレオチド配列である、核酸；ならびに

(7) 3' AAV ITRであって、任意にAAV2の3' ITRであり、任意に配列番号：71または73のポリヌクレオチド配列を含む3' ITRである、3' AAV ITRを含むAAVベクター。

【請求項42】

配列番号：1～69および227～229からなる群から選択される配列に対して少なくとも99%の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む、請求項36に記載のAAVベクター。

【請求項43】

前記ポリヌクレオチドが、配列番号：226のVP1を含むカプシドによってカプシド化されている、請求項36～42のいずれか一項に記載のAAVベクター。

【請求項44】

前記カプシドが、配列番号：226のVP1、配列番号：189のVP2および配列番号：190のVP3を含む、請求項43に記載のAAVベクター。

【請求項45】

前記ポリヌクレオチドが、配列番号：22に対して少なくとも99%同一である核酸配列を含み、但し、前記核酸配列は配列番号：192の配列をコードする、請求項43または44に記載のAAVベクター。

【請求項46】

前記ポリヌクレオチドが、配列番号：22の核酸配列を含む、請求項43または44に記載のAAVベクター。

【請求項47】

配列番号：22のポリヌクレオチド配列を含む、AAVベクター。

【請求項48】

生物学的に適合性を有する担体または賦形剤中に請求項36～47のいずれか一項に記載の1以上のAAVベクターを含む、医薬組成物。

【請求項49】

空のAAVカプシドをさらに含む、請求項48に記載の医薬組成物。

【請求項50】

10

20

30

40

50

前記空のAAVカプシド対AAVベクターの比が、約100：1～約50：1、約50：1～約25：1、約25：1～約10：1、約10：1～約1：1、約1：1～約1：10、約1：10～約1：25、約1：25～約1：50、または約1：50～約1：100である、請求項49に記載の医薬組成物。

【請求項51】

界面活性剤をさらに含む、請求項48～50のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項52】

C1インヒビターを必要とする対象を治療する方法であって、治療的有効量の請求項1～35のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドもしくは発現カセット、または請求項36～47のいずれか一項に記載のAAVベクター、または請求項48～51のいずれか一項に記載の医薬組成物を対象に投与することを含み、C1インヒビターが対象において発現される、方法。

10

【請求項53】

対象が遺伝性血管性浮腫(HAE)を有する、請求項52に記載の方法。

【請求項54】

ポリヌクレオチド、発現カセット、AAVベクター、または医薬組成物が、静脈内に、動脈内に、腔内に、粘膜内に、またはカテーテルを介して、対象に投与される、請求項42または53に記載の方法。

【請求項55】

前記AAVベクターが、対象の体重1キログラム当たり約 $1 \times 10^8$ ～約 $1 \times 10^{14}$ ベクターゲノム(vg/kg)の範囲で対象に投与される、請求項52～54のいずれか一項に記載の使用。

20

【請求項56】

対象がヒトであり、かつ方法が、C1インヒビターの必要性もしくはHAEの1以上の症状を低減し、減少させ、もしくは阻害し；またはC1インヒビターの必要性もしくはHAEの1以上の症状の進行もしくは悪化を防止もしくは低減し；またはC1インヒビターの必要性もしくはHAEの1以上の症状を安定化させ；またはC1インヒビターの必要性もしくはHAEの1以上の症状を改善する、請求項52～55のいずれか一項に記載の方法。

【請求項57】

請求項1～35のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは発現カセットを含む、細胞。

30

【請求項58】

請求項36～47のいずれか一項に記載のAAVベクターを産生する細胞。

【請求項59】

(a) AAVベクターをパッケージングヘルパー細胞に導入すること；および(b) AAVベクターを産生するための条件下でヘルパー細胞を培養することを含む、請求項36～47のいずれか一項に記載のAAVベクターを産生する方法。

【請求項60】

配列番号：215、216、217、および218のいずれかに対して少なくとも95%、または100%同一の配列を含む、ポリペプチド。

40

【請求項61】

請求項60に記載のポリペプチドをコードする配列を含む核酸。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、遺伝子治療の分野に関する。特に、本発明は、ヒトC1インヒビターの発現のための最適化されたカセット、および補体介在性障害、特に遺伝性血管性浮腫を治療するためにこれを使用する方法に関する。

【0002】

関連出願への相互参照

50

本願は、2021年1月27日に出願された米国仮特許出願第63/142,121号、2021年4月30日に出願された米国仮特許出願第63/201,466号、および2021年9月24日に出願された米国仮特許出願第63/261,603号の優先権を主張する。前述の出願の全内容は、全てのテキスト、表、配列表、および図面を含めて、参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0003】

電子的に提出された配列リストへの参照

本願は、ファイル名「SequenceListing5WO1」かつ2022年1月27日の作成日であり、727kbのサイズを有するASCIIフォーマット配列リストとしてEFS-Webを介して電子的に提出される配列リストを含む。EFS-Webを介して提出される配列表は本明細書の一部であり、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

#### 【背景技術】

#### 【0004】

遺伝性血管性浮腫(HAE)は、C1エステラーゼインヒビター欠損症、C1インヒビター欠損症、HANE、クインケ浮腫、および二次的血管神経浮腫とも呼ばれ、約5万人に1人に発生する稀であるが生命を脅かす可能性のある常染色体優性遺伝疾患である。HAEは、上気道および胃腸管の皮膚または粘膜組織に最も頻繁に影響を及ぼす再発性の腫脹エピソードを特徴とする(Banerji, *Ann Allergy Asthma Immunol*, 111: 329-336 (2013); Aygoren-Pursun et al., *Orphanet J Rare Dis.*, 9: 99 (2014))。

20

#### 【0005】

HAEは、ブラジキニンの過剰産生の結果として血漿が血管を通過して組織に漏れる際に生じる。疾患メカニズムは、活性化第XII因子(F12)によるプレカリクレイン(PKK)の切断、およびさらに多くのF12を活性化する活性血漿カリクレインの放出を含むと考えられる。次いで、血漿カリクレインは、キニノーゲンを切断し、内皮細胞上のB2ブラジキニン受容体に結合するブラジキニンを放出し、内皮の透過性を増加させる。通常、C1エステラーゼインヒビター(SERPING1遺伝子によってコードされる)は、血漿カリクレインおよびF12の活性化を阻害することによってブラジキニン産生を制御する(Busse et al., *N Engl J Med.*, 382(12): 1136-1148 (2020))。

#### 【0006】

HAEには、HAE-C1-INHおよびHAE-nI-C1-INHの2つのタイプがある。HAE-C1-INHは、SERPING1遺伝子(C1インヒビターをコードする)の変異をもたらし、血液中の活性C1インヒビターのレベルを低下させる。HAE-C1-INHには2つのサブタイプが存在し: I型HAEは症例の85%を占め、変異体C1インヒビタータンパク質を血液中に分泌できないことにより引き起こされ、II型HAEは症例の残りの15%を占め、分泌されるが機能不全である変異体C1インヒビターにより引き起こされる。HAE-nI-C1-INHは、2000年に最初に記載され、未だ完全には理解されていない。HAE-nI-C1-INHを有する患者は、凝固第XII因子に変異を有することもあるが、ほとんどの患者は既知の変異を有さず、C1インヒビター遺伝子は正常である。(ウェブサイト: [www.angioedemacenter.com/patient-resources/angioedema-types/](http://www.angioedemacenter.com/patient-resources/angioedema-types/))。

30

#### 【0007】

現在、治療薬は、長期予防、急性発作のための治療、および短期予防(例えば、歯科手術の前)に適応され、かつ、高い有害作用プロファイルを有するダナゾール、血漿由来または組換えC1インヒビター置換タンパク質、ブラジキニンレセプターアンタゴニスト(例えばイカチバント)、カリクレインインヒビター(例えばエカランチド)、新鮮凍結血漿、および精製C1インヒビター等の薬剤を含む。これらの療法は症状を緩和し、QOLを最大化させ得るが、疾患の再発および長期間の継続的投与の必要性は治療に対する主要な障害のままである(Aberer, *Ann Med*, 44: 523-529 (2012); Charignon et al., *Expert Opin Pharmacother*, 13: 2233-2247 (2012); Papadopoulou-Alatakis, *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 10: 20-25 (2010); Parikh et al., *Curr Allergy Asthma Rep*, 11: 300-308 (2011); Tourangeau et al., *Curr*

40

50

Allergy Asthma Rep, 11: 345-351 (2011); Bowen et al., Ann Allergy Asthma Immunol, 100: S30-S40 (2008); Frank, Immunol Allergy Clin North Am, 26: 653-668 (2006); Cicardi et al., J Allergy Clin Immunol, 99: 194-196 (1997); Kreuz et al., Transfusion 49: 1987-1995 (2009); Bork et al., Ann Allergy Asthma Immunol, 100: 153-161 (2008); および Cicardi et al., J Allergy Clin Immunol, 87: 768-773 (1991)。

【0008】

C1インヒビターおよびF12欠損に関連する血管浮腫を治療するための有効かつ長期間持続する治療アプローチが必要とされている。

【発明の概要】

10

【0009】

ヒトC1インヒビターの分泌可能なバージョンの肝臓指向性発現のための最適化カセットが本明細書に開示される。カセットに対するこれらの最適化は、肝臓からのC1インヒビター分泌の増加をもたらし、対象において肝臓遺伝子導入が全身的にC1インヒビター欠損を交差補正するのに十分なC1インヒビターの循環レベルを達成することを可能にする。これらのカセットは、遺伝性血管性浮腫（HAE）ならびにC1インヒビターで治療可能な他の疾患および障害を有する対象の遺伝子療法治療として有用である。

【0010】

1つの一般的な態様では、本発明は、C1インヒビターをコードする核酸を含むポリヌクレオチドに関し、核酸は、(1)配列番号：105の配列に対して少なくとも83%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(2)配列番号：106の配列に対して少なくとも83%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(3)配列番号：107の配列に対して少なくとも80%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(4)配列番号：108の配列に対して少なくとも80%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(5)配列番号：109の配列に対して少なくとも83%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(6)配列番号：110の配列に対して少なくとも84%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(7)配列番号：111の配列に対して少なくとも80%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(8)配列番号：112の配列に対して少なくとも83%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(9)配列番号：113の配列に対して少なくとも82%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(10)配列番号：114の配列に対して少なくとも82%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(11)配列番号：115の配列に対して少なくとも82%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(12)配列番号：116の配列に対して少なくとも80%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(13)配列番号：117の配列に対して少なくとも80%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(14)配列番号：118の配列に対して少なくとも83%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(15)配列番号：119の配列に対して少なくとも80%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(16)配列番号：120の配列に対して少なくとも80%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(17)配列番号：121の配列に対して少なくとも80%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(18)配列番号：122の配列に対して少なくとも83%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(19)配列番号：123の配列に対して少なくとも93%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(20)配列番号：124の配列に対して少なくとも92%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(21)配列番号：125の配列に対して少なくとも89%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(22)配列番号：126の配列に対して少なくとも86%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(23)配列番号：127の配列に対して少なくとも92%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(24)配列番号：128の配列に対して少なくとも89%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(25)配列番号：129の配列に対して少なくとも89%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(26)配列番号：130の配列に対して少なくとも91%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(27)配列番号：131の配列に対して少なくとも92%の配列同一性を有するポリヌ

20

30

40

50

クレオチド；(28)配列番号：132の配列に対して少なくとも93%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(29)配列番号：133の配列に対して少なくとも93%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(30)配列番号：134の配列に対して少なくとも87%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(31)配列番号：135の配列に対して少なくとも89%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(32)配列番号：136の配列に対して少なくとも93%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(33)配列番号：137の配列に対して少なくとも93%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(34)配列番号：138の配列に対して少なくとも87%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(35)配列番号：139の配列に対して少なくとも86%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(36)配列番号：140の配列に対して少なくとも86%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；および(37)配列番号：141の配列に対して少なくとも86%の配列同一性を有するポリヌクレオチドからなる群から選択され、場合により、C1インヒビターは、配列番号：181(成熟C1インヒビター；シグナルペプチドなし)または配列番号：192(新生C1インヒビター；シグナルペプチドを含む)のアミノ酸配列を含む。

10

## 【0011】

ある実施形態では、核酸は、24個未満のCpGジヌクレオチドを含み、場合により、0個のCpGジヌクレオチドを含む。

## 【0012】

ある実施形態では、C1インヒビターをコードする核酸は、配列番号：105~142、145~147、156、171、172、230および231のいずれかに対して少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%または100%の配列を有する。

20

## 【0013】

ある実施形態では、本発明は、変異体C1インヒビターをコードする核酸に関し、変異体C1インヒビターは、切断型C1インヒビター、2以上のC1インヒビターの融合体、またはC1インヒビターとFc領域もしくはドメインとの融合体を含む。

## 【0014】

ある実施形態では、核酸は、配列番号：143~144、158、および165~170のいずれかの配列を有し、場合により、変異体C1インヒビターは、配列番号：193~201のいずれかのアミノ酸配列またはその変異体を含む。

30

## 【0015】

ある実施形態では、ポリヌクレオチドは、C1インヒビターをコードする核酸の5'末端に位置するシグナルペプチド配列を含む。

## 【0016】

ある実施形態では、シグナルペプチド配列は、ヘテロシグナルペプチド配列である。

## 【0017】

ある実施形態では、シグナルペプチド配列は、内因性または天然のC1インヒビターシグナルペプチド配列である。

## 【0018】

ある実施形態では、シグナルペプチドは、C1インヒビターシグナルペプチド、ヒトキモトリプシノーゲンB2シグナルペプチド、ALBシグナルペプチド、ORM1シグナルペプチド、TFシグナルペプチド、AMBIPシグナルペプチド、LAMP1シグナルペプチド、BTN2A2シグナルペプチド、CD300シグナルペプチド、NOTCH2シグナルペプチド、STRCシグナルペプチド、AHSGシグナルペプチド、SYN1シグナルペプチド、SYN2シグナルペプチド、SYN3シグナルペプチド、およびSYN4シグナルペプチド、またはこれらの変異体からなる群から選択される。

40

## 【0019】

ある実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号：84~103のうちの1つのコード配列を有し、場合により、シグナルペプチドは、配列番号：203~218のうちのいずれかのアミノ酸配列またはその変異体を含む。

50

## 【0020】

ある実施形態では、本発明は、配列番号：215～218のいずれかの配列を含むシグナルペプチドに関する。

## 【0021】

ある実施形態では、本発明は、配列番号：100～103のいずれかの配列を含む、シグナルペプチドをコードする核酸に関する。

## 【0022】

ある実施形態では、本発明のシグナルペプチドは、以下の規定のいずれか1つ、2つ、3つ、または4つすべてに従う：(1)正味の正電荷を有する2～5個のアミノ酸のアミノ末端N領域、(2)6～15個のアミノ酸の疎水性のH領域、(3)5～10個のアミノ酸のカルボキシル末端C領域(シグナルペプチドのC末端由来の-3位のアミノ酸は電荷を有しない)、および短い側鎖を含むシグナルペプチドのC末端由来の-1位のアミノ酸、ならびに(4)シグナルペプチドのC末端由来の-10位のロイシン残基。

10

## 【0023】

ある実施形態では、本発明は、発現制御エレメントに作動可能に連結されたC1インヒビターをコードする核酸を含むポリヌクレオチドを含む発現カセットに関する。

## 【0024】

ある実施形態では、発現制御エレメントは肝臓特異的発現制御エレメントである。

## 【0025】

ある実施形態では、発現カセットは、1以上の組織特異的エレメントをさらに含み、組織特異的エレメントはプロモーターであり、このプロモーターは任意にhAATプロモーター配列である。

20

## 【0026】

ある実施形態では、発現カセットは、1以上の効力エレメントをさらに含み、効力エレメントはエンハンサーまたはポリA配列であり、エンハンサーはApoE、2xApoE、4xApoE、hAATエンハンサー、WPRES、WPRES3、および、任意にヒトヘモグロビン(HBB)由来イントロンであるイントロン、ポリA配列は任意にウシ成長ホルモン(bGH)ポリアダニル化(ポリA)配列である。

## 【0027】

ある実施形態では、発現カセットの発現制御エレメントは、ポリヌクレオチドの5'に位置し、場合により、発現制御エレメントは、ApoE/hAATエンハンサー/プロモーター配列を含む。

30

## 【0028】

ある実施形態では、発現カセットは、1以上の応答エレメントをさらに含み、応答エレメントは、miRNA結合部位、mRNAの分解を駆動する制御されたIre1依存性崩壊(RIDD)配列、急性期応答エレメント(APRE)、または別の5'UTRもしくは3'UTR配列であり、miRNA結合部位は任意にmiR-142-3pであり、RIDD配列は、1xRIDD、3xRIDD、およびRIDD1xBiosからなる群から選択され、APREは、SERPING1 5'UTR、APRE 5'UTR、およびSAA2 5'UTRからなる群から選択され、他の5'UTRもしくは3'UTR配列は任意にSAA2 3'UTR配列である。

40

## 【0029】

ある実施形態では、組織特異的エレメント、効力エレメント、および/または応答エレメントは、野生型の組織特異的エレメント、効力エレメント、および/または応答エレメントと比較して、CpGが低減されたものである。

## 【0030】

ある実施形態では、本発明は、ポリヌクレオチドまたは発現カセットを含むアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターに関する。

## 【0031】

ある実施形態では、AAVベクターは、(a)AAVカプシドのうちの1以上、および(b)AAV ITRがポリヌクレオチドまたは発現カセットの5'末端および/または3'末端に

50

隣接する 1 以上の AAV 逆方向末端反復 ( ITR ) を含む。

【 0 0 3 2 】

ある実施形態では、AAV ベクターの ITR の少なくとも 1 以上は、CpG が減少するように改変される。

【 0 0 3 3 】

ある実施形態では、AAV ベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh10、Rh74 ( 配列番号：188 )、AAV3B、AAV-2i8、配列番号：226、配列番号：189、配列番号：190、および / または LK03 ( 配列番号：191 ) に対して 90% 以上、95% 以上、または 100% の配列同一性を有する改変型または変異型 AAV VP1、VP2、および / または VP3 カプシドを含むカプシド血清型を有する

【 0 0 3 4 】

ある実施形態では、AAV ベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh10、Rh74、AAV3B、AAV血清型のいずれかの 1 以上の ITR、またはこれらの組み合わせを含む。

【 0 0 3 5 】

ある実施形態では、本発明は、

( 1 ) 5' AAV ITR であって、場合により AAV2 の 5' ITR であり、場合により配列番号：70 または 72 のポリヌクレオチド配列を含む 5' ITR である、5' AAV ITR；

( 2 ) 1 以上の組織特異的エレメントであって、組織特異的エレメントがプロモーターであり、場合によりプロモーターが配列番号：79 または 80 のポリヌクレオチド配列を含む、組織特異的エレメント；

( 3 ) 1 以上の効力エレメントであって、1 以上の効力エレメントがエンハンサーまたはポリA配列であり、場合により、1 以上の効力エレメントが、配列番号：225、74 ~ 76、81 ~ 83 および 173 ~ 178 からなる群から選択されるポリヌクレオチド配列を有する、効力エレメント；

( 4 ) 1 以上の応答エレメントであって、1 以上の応答エレメントが、miRNA 結合部位、制御された Ire1 依存性崩壊 ( RIDD ) 配列、急性期応答エレメント ( APRE )、または 5' UTR もしくは 3' UTR 配列であり、場合により、1 以上の応答エレメントが、配列番号：77 ~ 78、および 179、180、および 182 ~ 187 からなる群から選択されるポリヌクレオチド配列を有する、応答エレメント；

( 5 ) シグナルペプチドをコードする核酸であって、場合により、配列番号：203 ~ 218 からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードする核酸であり、場合により、配列番号：84 ~ 103 からなる群から選択されるポリヌクレオチド配列である、核酸；

( 6 ) C1 インヒビター、変異体 C1 インヒビター、およびこれらの融合体または組合せのうちの少なくとも 1 つをコードする核酸であって、

a . 場合により、配列番号：181 または 192 のアミノ酸配列を有する C1 インヒビターであり、場合により、配列番号：104 ~ 142、145 ~ 147、156、および 171 ~ 172 からなる群から選択されるポリヌクレオチド配列であり；

b . 場合により、配列番号：193 ~ 201 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する変異体 C1 インヒビターであり、場合により、配列番号：143 ~ 144、158、および 165 ~ 170 からなる群から選択されるポリヌクレオチドであり；ならびに

( 7 ) 3' AAV ITR であって、場合により、AAV2 の 3' ITR であり、場合により、配列番号：71 または 73 のポリヌクレオチド配列を含む 3' ITR である、3' AAV ITR：を含む AAV ベクターに関する。

【 0 0 3 6 】

ある実施形態では、AAV ベクターは、配列番号：1 ~ 69 および 227 ~ 229 のうちの 1 つのポリヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 3 7 】

ある実施形態では、本発明は、ポリヌクレオチドまたは発現カセットを含む非ウイルス

ベクターに関する。

【0038】

ある実施形態では、本発明は、生物学的に適合性を有する担体または賦形剤中に複数のAAVベクターまたは非ウイルスベクターを含む医薬組成物に関する。

【0039】

ある実施形態では、医薬組成物は、空のAAVカプシドをさらに含む。

【0040】

ある実施形態では、医薬組成物は界面活性剤をさらに含む。

【0041】

ある実施形態では、本発明は、C1インヒビターを必要とする対象を治療する方法であって、治療的有効量のポリヌクレオチド、発現カセット、AAVベクター、非ウイルスベクター、または医薬組成物を対象に投与することを含み、C1インヒビターが対象において発現される、方法に関する。

10

【0042】

ある実施形態では、対象はヒトである。

【0043】

ある実施形態では、対象は遺伝性血管性浮腫（HAE）を有する。

【0044】

ある実施形態では、ポリヌクレオチド、発現カセット、AAVベクター、非ウイルスベクター、または医薬組成物は、静脈内に、動脈内に、腔内に、粘膜内に、またはカテーテルを介して、対象に投与される。

20

【0045】

ある実施形態では、AAVベクターは、対象の体重1キログラム当たり約 $1 \times 10^8$  ~ 約 $1 \times 10^{14}$ ベクターゲノム（vg/kg）の範囲で対象に投与される。

【0046】

ある実施形態では、本方法は、C1インヒビターの必要性もしくはHAEの1以上の症状を低減し、減少させもしくは阻害し；またはC1インヒビターの必要性もしくはHAEの1以上の症状の進行もしくは悪化を防止もしくは低減し；またはC1インヒビターの必要性もしくはHAEの1以上の症状を安定化させ；またはC1インヒビターの必要性もしくはHAEの1以上の症状を改善する。

30

【0047】

ある実施形態では、本発明は、本発明のポリヌクレオチドまたは発現カセットを含む細胞に関する。

【0048】

ある実施形態では、本発明は、本発明のAAVベクターを産生する細胞に関する。

【0049】

ある実施形態では、本発明は、(a)本発明のポリヌクレオチドまたは発現カセットを含むAAVベクターゲノムをパッケージングヘルパー細胞に導入すること；および(b)AAVベクターを産生するための条件下でヘルパー細胞を培養することを含む、本発明のAAVベクターを産生する方法に関する。

40

【図面の簡単な説明】

【0050】

前記の概要の項、ならびに以下の本発明の詳細な説明の項は、添付の図面と併せて読むとより良く理解されるだろう。本発明は、図面に示される正確な実施形態に限定されないことを理解されたい。

【図1】図1は、本明細書に記載の例示的な発現ベクターの概要図を示す。

【図2】図2は、ELISAによって測定された、実施例2の低用量（ $1.0 \times 10^{12}$  vg/kg、群7~11）（図2A）および高用量（ $4.0 \times 10^{12}$  vg/kg、群1~5）（図2B）のベクターコホートについてのマウス血漿中の平均±標準偏差のC1-INH抗原レベルを示すグラフを表す；灰色の陰影領域は、全てのPNP測定値（低用量： $170.30 \pm 20.36$  μg/m

50

L；高用量： $181.0 \pm 35.62 \mu\text{g/mL}$ ）の平均  $\pm$  標準偏差を意味する；定量限界の上限および下限を考慮した値は、平均  $\pm$  標準偏差の算出から除外した；SERPING1 = 配列番号：1、Syn1 = 配列番号：13、Syn4 = 配列番号：16、AHSG = 配列番号：12、sp7 = 配列番号：2。

【図3】図3は、平均  $\pm$  標準偏差として提示される、低用量 ( $1.0 \times 10^{12}$  vg/kg、群7~11) (図3A) および高用量 ( $4.0 \times 10^{12}$  vg/kg、群1~5) (図3B) の実施例2のベクターコホートについてのマウス血漿中の定常状態C1-INH抗原レベルを示すグラフである；定常状態は、評価された時点にわたる平均抗原レベルの統計的有意差なしとして定義された (線形回帰分析は示されない)；天然のSERPING1シグナルペプチドに対する統計的比較は、post-hoc Dunnの多重比較検定を伴うクラスカル・ウォリス検定により行った (ns、有意差なし；\*、 $p < 0.05$ ；\*\*、 $p < 0.01$ ；\*\*\*、 $p < 0.001$ ；\*\*\*\*、 $p < 0.0001$ )；SERPING1 = 配列番号：1、Syn1 = 配列番号：13、Syn4 = 番号：16、AHSG = 配列番号：12、sp7 = 配列番号：2。

【図4】図4は、実施例2の高用量コホートからのマウス血漿中のC1-INH活性を示す図であり、具体的には、個々のC1-INH活性値が高用量コホートについて示され、平均  $\pm$  標準偏差として示される値を伴う22、25、および27週目 (それぞれ、丸、三角、および四角) からのデータが含まれる；post-hoc Dunnettの多重比較検定を伴う一元配置分散分析により、ネイティブSERPING1シグナルペプチドに対する統計的比較を行った (\*、\*\*\*、 $p < 0.0001$ )；SERPING1 = 配列番号：1、Syn1 = 配列番号：13、Syn4 = 配列番号：16、AHSG = 配列番号：12、sp7 = 配列番号：2。

【図5】図5は、実施例2の高用量コホートからのマウス血漿中のC1-INH抗原とC1-INH活性との相関を示す図であり、具体的には、各動物のそれぞれのC1-INH抗原レベルに対して、発色アッセイおよびELISAによってそれぞれ測定した22、25、および27週目のデータを用いて、C1-INH活性についての個々の値をC1-INH活性および抗原とともにプロットした；値を対数変換し、回帰分析 ( $R^2 = 0.771$ ) を使用して線形フィットを生成し、両側ピアソン相関は有意性を示した (ピアソン  $r = 0.8778$ ； $p < 0.0001$ )；SERPING1 = 配列番号：1、Syn1 = 配列番号：13、Syn4 = 配列番号：16、AHSG = 配列番号：12、sp7 = 配列番号：2。

【図6】図6は、低用量 (図6A) および高用量 (図6B) コホートにおいて、ベクターゲノムコピー数をマウスFoxp1に対して正規化した、実施例2の終点の肝臓組織からのベクターゲノム濃度を示すグラフであり、値はFoxp1コピー当たりのBGHpAコピーとしてレポートされ、平均  $\pm$  標準偏差として表される；post-hoc Dunnの多重比較検定を伴うクラスカル・ウォリス検定により、天然のSERPING1シグナルペプチドに対する統計的比較を行った (\*\*、 $p < 0.01$ ；\*\*\*、 $p < 0.001$ )；低用量コホート (群7~11) については18週目、かつ高用量コホート (群1~5) については28週目として終点を定義した；SERPING1 = 配列番号：1、Syn1 = 配列番号：13、Syn4 = 配列番号：16、AHSG = 配列番号：12、sp7 = 配列番号：2。

【図7】図7は、各マウスにおける終点でのベクターゲノム濃度 (Foxp1に正規化) に対する終点C1-INH抗原値を伴う、実施例2の終点でのC1-INH抗原とゲノム濃度との相関を示すグラフを示す；低用量コホート (群7~11) については第18週、高用量コホート (群1~5) については第28週として終点を定義した；値は対数変換され、回帰分析 ( $R^2 = 0.866$ ) を使用して線形フィットを生成し、両側ピアソン相関は有意性を示した (ピアソン  $r = 0.9306$ ； $p < 0.0001$ )；SERPING1 = 配列番号：1、Syn1 = 配列番号：13、Syn4 = 配列番号：16、AHSG = 配列番号：12、sp7 = 配列番号：2。

【図8】図8は、低用量 (図8A) および高用量 (図8B) コホートにおける、終点の肝臓ベクターゲノム (VG) 濃度 (Foxp1に対して正規化) に関してプロットした定常状態C1-INH抗原レベルを伴う、実施例2の末端でのベクターゲノム濃度に対する定常状態C1-INH抗原レベルを示すグラフである；定常状態C1-INH抗原は、試験した時点 (統計分析は示されない。低用量コホートおよび高用量コホートについてそれぞれ3~18週目および3~28週目) にわたるレベルにおいて統計的有意差なしと定義された；値は平均

±標準偏差として表される；post-hoc Dunnの多重比較検定を伴うクラスカル・ウォリス検定により、ネイティブSERPING1シグナルペプチドに対する統計的比較を行った（\*、 $p < 0.05$ ）；低用量コホート（群7～11）について18は週目、かつ高用量コホート（群1～5）については28週目として終点を定義した；SERPING1 = 配列番号：1、Syn1 = 配列番号13、Syn4 = 配列番号：16、AHSG = 配列番号：12、sp7 = 配列番号：2。

【図9】図9は、ELISAによって測定された、実施例3の試験A（図9A）および試験B（図9B）についてのマウス血漿中のC1-INH抗原レベルを示すグラフを示す；ベクター投与後7週間（試験A）または6週間（試験B）、群を追跡した；灰色の陰影領域は全てのPNP測定値の平均±標準偏差を示す（試験A、 $179.2 \pm 20.88 \mu\text{g/mL}$ ；試験B、 $165.9 \pm 20.70 \mu\text{g/mL}$ ）；SERPING1 = 配列番号：1、13 = 配列番号：18、14 = 配列番号：19、17 = 配列番号：20、120 = 配列番号：21、121 = 配列番号：22、124 = 配列番号：23；12 = 配列番号：17、H9 = 配列番号：24、H13 = 配列番号：25、BC2 = 配列番号：26。

【図10】図10は、ELISAによって測定された、試験A（図10A）および試験B（図10B）についてのマウス血漿における定常C1-INH抗原レベルを示すグラフである；ベクター投与後7週間（試験A）または6週間（試験B）、群を追跡した；値は平均±標準偏差として表される；post-hoc Dunnettの多重比較検定を伴う一元配置分散分析により、AAVカプシド化された配列番号：1に対する統計的比較を行った（\*、 $p < 0.05$ ；\*\*、 $p < 0.001$ 、\*\*\*、 $p < 0.001$ ）；SERPING1 = 配列番号：1、13 = 配列番号：18、14 = 配列番号：19、17 = 配列番号：20、120 = 配列番号：21、121 = 配列番号：22、124 = 配列番号：23、12 = 配列番号：17、H9 = 配列番号：24、H13 = 配列番号：25、BC2 = 配列番号：26。

【図11】図11は、ELISAによって評価された、7週目のマウスにおける血漿ブラジキニン抗原レベルを示すグラフである；より高いレベルのC1-INH抗原発現と関連する、AAVカプシド化された配列番号：20（群4）および配列番号：22（群6）コドン最適化変異体を投与されたマウスにおいてブラジキニンを評価した；図11Aは、試験Aの賦形剤群、配列番号：20変異体群、および配列番号：22変異体群におけるブラジキニン値を示す；灰色の陰影領域は全てのプールされた正常血漿（PNP）測定値（ $35010.16 \pm 8093.98 \text{ pg/mL}$ ）の平均±標準偏差を示す；値は平均±標準偏差として表される；post-hoc Dunnettの多重比較検定を伴う一元配置分散分析により、配列番号：1に対する統計的比較を行った（\*\*、 $p < 0.01$ ）；図11Bは、それぞれの血漿ブラジキニン抗原レベル（総サンプル $n=9$ ）と比較してプロットされた、AAVカプシド化された配列番号：20および配列番号：22で処置された7週目のマウスにおける個々のC1-INH抗原値を示し、両側ピアソン相関は、配列番号：22群について有意であることを示した（ピアソン  $r = -0.9417$ 、 $p < 0.0168$ 、 $R^2 = 0.8867$ ）；壊死性尾部および頭部後屈が見られた後、試験終了前に賦形剤群の1匹を安楽死させた。外れ値検出のためのROUT法の使用後に、AAVカプシド化された配列番号：20を投与した1匹の動物を分析から除いた；17 = 配列番号：20、121 = 配列番号：22。

【図12】図12は、マウスFoxp1に対して正規化したベクターゲノムコピー数、および平均±標準偏差として表した値とともに、実施例3の試験A（図12A）および試験B（図12B）について終点の肝臓組織におけるベクターゲノム濃度を示すグラフを示す；試験終了は、試験Aおよび試験Bについて、それぞれ第7週および第6週として定義される；post-hoc Dunnの多重比較検定を伴うクラスカル・ウォリス検定により、ネイティブSERPING1導入遺伝子と比較した統計的比較を行った（ns、 $p > 0.05$ ）；SERPING1 = 配列番号：1、13 = 配列番号：18、14 = 配列番号：19、17 = 配列番号：20、120 = 配列番号：21、121 = 配列番号：22、124 = 配列番号：23、12 = 配列番号：17、H9 = 配列番号：24、H13 = 配列番号：25、BC2 = 配列番号：26。

【図13】図13は、個々のマウスにおける終点でのベクターゲノム濃度とC1-INH抗原との相関を示す図である；相関は、最も高いC1-INH発現を有する試験Aからのコドン最

適化変異体において行われた；数値は対数変換され、線形フィットは回帰分析 ( $R^2 = 0.7243$ ) を使用して生成された；両側ピアソン相関は有意性を示した (ピアソン  $r = 0.8510$ 、 $p < 0.0001$ )；SERPING1 = 配列番号：1、17 = 配列番号：20、121 = 配列番号：22、124 = 配列番号：23。

【図14】図14は、実施例3の試験Aの終点(7週目)でのベクターゲノム濃度(Foxp1に対して正規化された)と比較した定常状態C1-INH抗原レベルを示すグラフである；定常状態C1-INH抗原は、試験された時点(統計分析は示されない、3~7週目)にわたるレベルにおいて統計的有意差なしと定義された；値は平均±標準偏差として表される；post-hoc Dunnの多重比較検定を伴うクラスカル・ウォリス検定により、ネイティブSERPING1シグナルペプチドと比較した統計的比較を行った(\*、 $p < 0.05$ )；SERPING1 = 配列番号：1、13 = 配列番号：18、14 = 配列番号：19、17 = 配列番号：20、120 = 配列番号：21、121 = 配列番号：22、124 = 配列番号：23。

【図15】図15は、実施例4の試験についてのマウス血漿中のC1-INH抗原レベルを示すグラフを示す；具体的には、ELISAによって測定された全ての群について、時間(図15A)および8週目(図15B)の関数としてC1-INH抗原レベルをプロットする；アッセイ間変動性をモニターするためのコントロールとして、プールされた正常ヒト血漿(PNP)を含めた；灰色の陰影領域は、PNPの全ての測定の平均±標準偏差( $175.4 \pm 41.3 \mu\text{g/mL}$ )を表す；値は平均±標準偏差として表される；検出限界未満の値は、平均±標準偏差の算出から除外した；研究の過程にわたって、1匹の雄および3匹の雌(全て低用量)が、検出可能なC1-INH抗原を示さなかった；17 = 配列番号：20。

【図16】図16は、実施例4の研究についてのマウス血漿中のC1-INH抗原とC1-INH活性との相関を示すグラフであり、具体的には、5週目および8週目のデータを用いて、各動物のそれぞれのC1-INH抗原レベルに対する、C1-INH活性についての個々の値をプロットした；値を対数変換し、回帰分析を用いて線形フィットを生成した；ビジュアル化のために、定量レベル未満(BQL)の値は除外し、定量レベル以上(AQL)の値を含む；17 = 配列番号：20。

【図17】図17は、実施例4の試験についての終点の肝臓組織からのベクターゲノム濃度を示すグラフであり、具体的には、AAVカプシド化された配列番号：20の3用量のうち1つの投与後にマウスFoxp1に対して正規化されたベクターゲノムコピー数を示す；値は平均±標準偏差として表される；17 = 配列番号：20。

【図18】図18は、終点の肝臓組織からの正規化SERPING1 mRNA発現を表すグラフを示す、具体的には、AAVカプシド化された配列番号：20の3用量の1つを投与されたマウスにおける、マウスPpieに正規化されたSERPING1のmRNA発現レベルを示す；終点は8週目として定義される；値は平均±標準偏差として表される；17 = 配列番号：20。

【図19】図19は、実施例4の試験についての、ベクター用量、正規化ベクターゲノム濃度、正規化mRNA発現レベル、および末端C1-INH抗原レベルの比較を表すグラフを示し、具体的には、様々な用量のAAVカプシド化された配列番号：20投与された雄性(図19A)および雌性(図19B)のSerp1<sup>-/-</sup>マウスについての値をプロットする；終点を8週目と定義した；VGコピー数をマウスFoxp1に対して正規化した；SERPING1 mRNA発現レベルをマウスPpieに対して正規化した；ELISAによってC1-INH抗原レベルを測定した；個々の値を対数変換し、非線形4PLシグモイド曲線にフィットさせた；17 = 配列番号：20。

【図20】図20は、B6.SJLマウスバックグラウンドにおけるSerp1欠損を特徴付けるデータを示す。図20Aは、肢容積の差を示す。図20Bは、血漿C1-INHの差を示す。図20Cは、ブラジキニンの差を示す。図20Dは、補体C4a(C4a)の差を示す。図20Eは、組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)の差を示す。

【図21】図21は、HAEモデルマウスを用いて、121(配列番号：22)が用量依存性のhC1-INH抗原レベルを血漿中で持続可能であることを示す。B6/SJL<sup>Serp1+/+</sup>(図21A)、B6/SJL<sup>Serp1+/-</sup>(図21B)、およびB6/SJL<sup>Serp1-/-</sup>(図2

1 C) の雄性マウスにおける血漿hC1-INHレベルを、 $1.0 \times 10^{12} \sim 3.16 \times 10^{12}$  vg/kgの範囲のAAVカプシド化されたI21の3用量の1つを注射した後に1/4対数増加量において測定した。

【図22】図22は、C1-INH発現およびI21(配列番号: 22)の薬力学を示す。図22Aは、異なるSerping1遺伝子型におけるhC1-INH発現を比較するデータを提供する。図22Bは、hC1-INH用量反応を示す。図22Cは、ブラジキニン用量反応を示す。図22Dは、tPA活性用量反応を示す。

【図23】図23は、HAEモデルマウスの血漿中のI21(配列番号: 22)用量依存的な持続性hC1-INH抗原レベルを示す。 $9.5 \times 10^{11} \sim 3.0 \times 10^{13}$  vg/kgの範囲の5用量の1つのI21をB6/SJL<sup>Serping1<sup>-/-</sup></sup>雄性マウスに注射した。図23Aは、ELISAによって測定された血漿C1-INHレベルを時間の関数として示す。値はIU/mLの単位であり、平均±標準偏差として示される。図23Bは、B6/SJL<sup>Serping1<sup>-/-</sup></sup>雄性マウスにおける定常状態C1-INH抗原レベルをベクター用量の関数として示す。全ての値を対数変換し、回帰分析( $R^2 = 0.88$ )を使用して線形フィットを生成した。

【図24】図24は、HAE疾患モデルマウスを用いて、I21(配列番号: 22)が介在するブラジキニンの減少を示す。図24Aは、異なる用量コホートにおける個々の血漿ブラジキニンレベルおよび平均±標準偏差の血漿ブラジキニンレベルを示す。post-hoc Dunnettの多重比較検定を伴う一元配置分散分析により、賦形剤と比較した統計的比較を行った(\*、 $p < 0.01$ ; \*\*、 $p < 0.001$ )。図24Bは、血漿C1-INHレベルを示す。

【図25】図25は、HAEマウスモデルにおけるI21(配列番号: 22)が介在するC1-INH回復C4レベルを示す。試験終了時に、自動毛細血管ベースの免疫測定システム(Wes<sup>TM</sup>、ProteinSimple)により血漿C4を分析した。図25Aは、各用量コホートにおける個々のおよび平均±標準偏差の相対的なC4発現を示す。図25Bは、31週目での各動物のそれぞれのC1-INH抗原レベルに対してプロットされた個々の相対的血漿C4値を示す。全ての値を対数変換し、回帰分析( $R^2 = 0.87$ )を使用して線形フィットを生成した。図25Cは、C4のレベルを血漿C1-INHの関数として示す。BQLは、定量レベル未満を指す。AQLは、定量レベル以上を指す。

【図26】図26は、毒性を評価するために、AAVカプシド化されたI21(配列番号: 22)を投与されたマウスにおいて産生されたC1-INHレベルを示す。 $2.5 \times 10^{12}$  vg/kg、 $5.0 \times 10^{12}$  vg/kg、または $1.0 \times 10^{13}$ のAAVカプシド化されたI21を雄性マウスに投与した(図26A)。 $1.0 \times 10^{13}$  vg/kg、 $5.0 \times 10^{13}$  vg/kg、または $9.9 \times 10^{13}$ のAAVカプシド化されたI21を雌マウスに投与した(図26B)。

【図27】図27は、雄性カニクイザル(図27A)および雌性カニクイザル(図27B)におけるI21(配列番号: 22)投与試験を示し、正常C1-INH活性のパーセントは、AAVカプシド化されたI21投与後の異なる時点で決定された。 $1.0 \times 10^{13}$  vg/kg(低)、 $3.2 \times 10^{13}$  vg/kg(中)または $1.0 \times 10^{14}$  vg/kg(高)のAAVカプシド化されたI21をカニクイザルに投与した。

【図28】図28は、異なる用量のAAVカプシド化されたI21で産生されたhC1-INH抗原レベル(図28A)およびピークパーセント正常C1-INH活性(図28B)を示す。 $1.0 \times 10^{13}$  vg/kg(低)、 $3.2 \times 10^{13}$  vg/kg(中)または $1.0 \times 10^{14}$  vg/kg(高)のAAVカプシド化されたI21を雌性および雄性のカニクイザルに投与した。

【図29】図29は、トランスフェクトされたHuh7細胞の上清中のhC1-INH抗原レベルを示す。Huh7細胞を異なるSERPING1発現プラスミドでin vitroでトランスフェクトし、hC1-INH抗原レベルを測定した。結果は、生物学的複製n=3の平均である。エラーバーは標準偏差を示す。

【図30】図30は、miR-142-3p標的を発現プラスミドに加えることの効果を示す。配列番号: 28(pSwap-SERPING1\_I21)もしくは配列番号: 55(mir 142-3p)の核酸、またはpCAG#GFPを含むプラスミドでin vitroでHuh7細胞をトランスフェクトし、hC1-INH抗原をアッセイした。結果は、生物学的複製n=3の平均である。エラーバーは標準偏差を示す。

10

20

30

40

50

**【発明の詳細な説明】****【0051】**

様々な刊行物、論文および特許は、背景技術および本明細書全体を通して引用または記載され、これらの参照の各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に含まれる文献、行為、材料、装置、論文等の記述は、本発明の文脈を提供するためのものである。そのような記述は、これらの事項のいずれかまたは全てが、開示またはクレームされる発明に関する先行技術の一部を形成することを認めるものではない。

**【0052】**

特に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者に一般に理解されるものと同じ意味を有する。そうでない場合には、本明細書に引用される特定の用語は、本明細書に記載される意味を有する。

**【0053】**

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈が明らかに別段の指示をしないう限り、複数の参照を含むことに留意されたい。

**【0054】**

本明細書および以下の特許請求の範囲を通して、文脈が特に必要としない限り、「含む (comprise)」という単語、ならびに「含む (comprises)」および「含む (comprising)」等の変形例は、記載された整数もしくはステップまたは整数もしくはステップのグループを含むが、任意の他の整数もしくはステップまたは整数もしくはステップのグループを除外しないことを意味すると理解される。本明細書で使用される場合、用語「含む (comprising)」は、用語「含む (containing)」もしくは「含む (including)」で、または場合により、用語「有する (having)」で置換され得る。

**【0055】**

本明細書で使用される場合、「からなる (consisting of)」は、特許請求の範囲の要素に特定されていない任意の要素、ステップ、または成分を除外し、そのような要素、ステップ、または成分は、クレームされた発明に関連する。本明細書で使用される場合、「から本質的になる (consisting essentially of)」は、特許請求の範囲の基本的かつ新規な特徴に実質的に影響を及ぼさない材料またはステップを排除しない。上記した「含む (containing)」、「含む (including)」、および「有する (having)」の用語のいずれも、本発明の態様または実施形態の文脈において本明細書で使用される場合は常に、開示の範囲を変更するために、「からなる (consisting of)」または「から本質的になる (consisting essentially of)」という用語に置き換えることができる。

**【0056】**

本明細書で使用されるように、複数の列挙された要素の間の接続語「および/または」は、個々の選択肢および組み合わせられた選択肢の両方を包含するものとして理解される。例えば、2つの要素が「および/または」によって結合される場合、第1の選択肢は、第2の要素を伴わない第1の要素の適用可能性を指す。第2の選択肢は、第1の要素を含まない第2の要素の適用可能性を指す。第3の選択肢は、第1および第2の要素を一緒に適用可能であることを指す。これらの選択肢のうちのいずれか1つは、その意味の範囲内にあると理解され、したがって、本明細書で使用される「および/または」という語の要件を満たす。2つ以上の選択肢の同時適用可能性もまた、その意味の範囲内にあると理解され、したがって、用語「および/または」の要件を満たす。

**【0057】**

本明細書に開示される特徴の全ては、任意の組み合わせで組み合わせることができる。本明細書に開示される各特徴は、同じ、同等、または同様の目的を果たす代替的な特徴によって置き換えることができる。したがって、特に明記しない限り、開示される特徴は、同等または類似の特徴の属の一例である。

**【0058】**

本明細書で使用される「約」という語は、基礎となるパラメータの10%以内の値(す

10

20

30

40

50

なわち、 $\pm 10\%$ )を指す。例えば、「約1:10」は、1.1:10.1または0.9:9.9を意味し、約5時間は、4.5時間または5.5時間を意味する、等である。値の文字列の先頭の「約」という語は、値の各々を10%まで変更する。

【0059】

全ての数値または数値範囲は、文脈上明らかに沿わないことが示されない限り、そのような範囲内の整数および範囲内の整数または値の分数を含む。したがって、例示すると、95%以上の減少という場合、95%、96%、97%、98%、99%、100%等、ならびに95.1%、95.2%、95.3%、95.4%、95.5%等、96.1%、96.2%、96.3%、96.4%、96.5%等を含む。したがって、また例示すると、「1~4」等の数値範囲という場合、2、3、ならびに1.1、1.2、1.3、1.4等を含む。例えば、「1~4週間」は、7日間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間、14日間、15日間、16日間、17日間、18日間、19日間、20日間、21日間、22日間、23日間、24日間、25日間、26日間、27日間、または28日間を含む。

10

【0060】

さらに、「0.01~10」等の数値範囲という場合、0.011、0.012、0.013等、ならびに9.5、9.6、9.7、9.8、9.9等を含む。例えば、対象の体重当たり「約0.01~約10 mg/kg」の投与量は、0.011 mg/kg、0.012 mg/kg、0.013 mg/kg、0.014 mg/kg、0.015 mg/kg等、ならびに9.5 mg/kg、9.6 mg/kg、9.7 mg/kg、9.8 mg/kg、9.9 mg/kg等を含む。

【0061】

より大きい (more) (より大きい (greater)) またはより小さい整数への言及は、それぞれ、言及する数値より大きいまたは小さい任意の数を含む。したがって、例えば、2より大きいという場合、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15等を含む。例えば、非ウイルスベクターおよび/または免疫細胞モジュレーターの「2回以上」の投与は、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回、11回、12回、13回、14回、15回、またはそれ以上の回数を含む。

20

【0062】

さらに、「1~90」等の数値範囲への言及は、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5等、ならびに81、82、83、84、85等を含む。例えば、「約1分~約90日の間」は、1.1分、1.2分、1.3分、1.4分、1.5分等、ならびに1日、2日、3日、4日、5日、・・・、81日、82日、83日、84日、85日等を含む。

30

【0063】

本出願の読者を助ける試みにおいて、記述は、種々の段落またはセクションに分離されているか、または本発明の種々の実施形態を対象とする。これらの分離は、段落またはセクションまたは実施形態の実質を別の段落またはセクションまたは実施形態の実質から切り離すものと見なされるべきではない。反対に、説明が広範な用途を有し、企図され得る様々なセクション、段落、およびセンテンスのすべての組合せを包含することを当業者は理解するだろう。任意の実施形態の記述は例示的なものにすぎず、特許請求の範囲を含む本開示の範囲がこれらの実施例に限定されることを示唆することを意図するものではない。

40

【0064】

本明細書では、C1インヒビターをコードする修飾核酸、C1インヒビターをコードする修飾核酸を含む発現カセット、C1インヒビターをコードする修飾核酸を含むウイルスベクター、およびC1インヒビターをコードする修飾核酸を含む非ウイルスベクターが提供される。本発明はまた、C1インヒビターをコードする修飾核酸を含む組換えAAV粒子、C1インヒビターをコードする修飾核酸を含む非ウイルス粒子、C1インヒビターをコードする修飾核酸を含む医薬組成物、および遺伝性血管性浮腫 (HAE) を治療する方法を提供する。

【0065】

核酸

50

用語「核酸」および「ポリヌクレオチド」は、デオキシリボ核酸（DNA）およびリボ核酸（RNA）を含む、核酸、オリゴヌクレオチドの全ての形態を指すために本明細書において互換的に使用される。核酸には、ゲノムDNA、cDNA、アンチセンスDNA/RNA、プラスミドDNA、直鎖DNA、（ポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド）、染色体DNA、スプライスもしくは非スプライスマRNA、rRNA、tRNAインヒビターDNAもしくはRNA（RNAi、例えば、低分子もしくは低分子ヘアピン（sh）RNA、マイクロRNA（miRNA）、低分子または低分子干渉（si）RNA、トランススプライシングRNA、またはアンチセンスRNA）、ロックド核酸類似体（LNA）、オリゴヌクレオチドDNA（ODN）一本鎖および二本鎖、免疫刺激配列（ISS）、リボスイッチおよびリボザイムが含まれる。

10

**【0066】**

核酸には、天然に存在する、合成の、および意図的に修飾または改変されたポリヌクレオチドが含まれる。核酸は、一本鎖、二本鎖、または三本鎖、直鎖または環状であり得、任意の長さであり得る。核酸について述べる際に、特定のポリヌクレオチドの配列または構造は、5'から3'方向に配列を提供する慣例に従って本明細書に記載され得る。

**【0067】**

ある実施形態によれば、ポリヌクレオチドは、一本鎖DNA（ssDNA）または二本鎖DNA（dsDNA）分子である。ある実施形態によれば、ポリヌクレオチドは、治療的使用のためのもの、例えば、治療的導入遺伝子をコードするssDNAまたはdsDNAである。ある実施形態によれば、dsDNA分子は、ミニサークル、ナノプラスミド、開放直鎖二本鎖DNAまたは閉鎖末端直鎖二本鎖DNA（CELiD/ceDNA/doggybone DNA）である。ある実施形態によれば、ssDNA分子は、閉鎖環状DNAまたは開鎖直鎖DNAである。

20

**【0068】**

「導入遺伝子」は、本明細書において、細胞もしくは生物に導入される核酸、または導入された核酸を好都合に指すために使用される。導入遺伝子は、C1インヒビターをコードする修飾核酸、またはタンパク質もしくはペプチドもしくは核酸（例えば、miRNA等）をコードするヘテロ核酸等のヘテロポリヌクレオチド配列等の任意の核酸を含む。導入遺伝子およびヘテロ核酸/ポリヌクレオチド配列という語は、本明細書において互換的に使用される。

**【0069】**

本明細書で使用される場合、用語「C1インヒビター」または「C1エステラーゼインヒビター」または「C1-INH」または「C1EI」または「SERPING1」は、全て互換的に使用され、SERPING1またはC1インヒビターの任意の核酸またはタンパク質を指す。ある実施形態では、C1インヒビターをコードする核酸は、ヒトC1インヒビタータンパク質をコードする。イントロンおよびエクソンを含むSERPING1の完全なDNA配列は、GenBankアクセッション番号NG\_009625.1で入手可能である。ヒトC1インヒビターは500個のアミノ酸からなり、GenBankアクセッション番号NP\_000053.2で入手可能である。C1インヒビターの例としては、天然に存在する任意のC1インヒビター、およびその変異体が挙げられる。本明細書で使用される場合、「C1インヒビターをコードする核酸」は、野生型C1インヒビタータンパク質の機能または活性の少なくとも一部を有するタンパク質をコードする組換え核酸分子を指す。このような核酸の例としては、C1インヒビターをコードする修飾核酸が挙げられる。

30

40

**【0070】**

本明細書で使用される場合、「変異体タンパク質」という語は、野生型のものと比較してアミノ酸配列の1以上の変異を含む任意のタンパク質を指す。「変異体タンパク質」という語は、例えば、アミノ酸挿入、付加、置換および欠失を含む。「変異体」という語は、例えば、融合タンパク質も包含する。

**【0071】**

ある実施形態によれば、変異体C1インヒビターは、天然タンパク質の機能を示す。ある実施形態では、変異体C1インヒビターは、天然タンパク質の機能の少なくとも50%、

50

場合により少なくとも55%、場合により少なくとも60%、場合により少なくとも65%、場合により少なくとも70%、場合により少なくとも75%、場合により少なくとも80%、場合により少なくとも85%、場合により少なくとも90%、場合により少なくとも95%を示す。変異体C1インヒビタータンパク質の機能的活性の測定は、例えば、補体成分C1のエステラーゼ活性の阻害を評価することにより行うことができる。本開示を考慮して、当業者に公知の任意の適切な方法を本発明において使用することができる。変異体C1インヒビタータンパク質の機能活性を決定するために使用することができる方法の例としては、例えば、Drouet et al., Clin Chim Acta, 1988, 174(2):121-130に記載されているもの等の分光光度定量、メイヨー・クリニック (website: www.mayocliniclabs.com/test-catalog/Performance/81493) に記載されているもの等の酵素イムノアッセイ、Munkvad et al., Clin Chem., 1990, 36(5):737-41に記載されているもの等の発色定量、その全体が参照により本明細書に組み入れられる各参照、および本実施例に記載されるもの等の市販で入手可能な方法が挙げられる。

10

**【0072】**

本明細書で使用される場合、用語「融合タンパク質」または「キメラタンパク質」は、2つ以上の元々別々のタンパク質またはその部分の連結によって作製されるタンパク質を指す。ある実施形態では、リンカーまたはスペーサーが各タンパク質の間に存在する。

**【0073】**

本明細書で使用される場合、用語「改変する」およびその文法的変形例は、核酸またはタンパク質がリファレンス配列または親配列から逸脱することを意味する。C1インヒビターをコードする改変型核酸は、リファレンス核酸（例えば野生型）または親核酸と比較して変化している。したがって、改変型核酸は、リファレンス核酸または親核酸と実質的に同じ、より大きい、もしくはより小さい活性または機能を有し得るが、リファレンス核酸または親核酸と少なくとも部分的な活性、機能、および/または配列同一性を保持する。改変型核酸は、改変型または変異体C1インヒビターをコードするように遺伝的に改変され得る。

20

**【0074】**

「C1インヒビターをコードする改変型核酸」は、C1インヒビターをコードする親の非改変型核酸と比較してC1インヒビター核酸が改変を有することを意味する。改変の特定の例は、ヌクレオチド置換である。ヌクレオチド置換は、同じアミノ酸をコードするサイレント変異、または異なるアミノ酸をコードするミスセンス変異であり得る。ミスセンス変異は、保存的または非保存的変異であり得る。改変の他の例としては、例えば、短縮および挿入が挙げられる。改変型核酸はまた、野生型タンパク質またはコドン最適化されていない核酸と同じタンパク質をコードするコドン最適化核酸を含み得る。コドン最適化は、例えば、CpGの除去を含む、より広い意味で使用され得る。本明細書における「改変」という用語は、C1インヒビターをコードする核酸に対して作製されるリファレンスの各例において現れる必要はない。

30

**【0075】**

ある実施形態では、C1インヒビターをコードする改変型核酸について、C1インヒビタータンパク質は、野生型C1インヒビターの機能または活性の少なくとも一部を保持する。

40

**【0076】**

本明細書に記載されるように、C1インヒビターをコードする改変型核酸は、リファレンスまたは親核酸と比較して異なる特性または特徴を示し得る。例えば、改変型核酸は、本明細書に記載されるC1インヒビターをコードするリファレンス核酸に対して100%の同一性を有する配列、ならびにC1インヒビターをコードするリファレンス核酸に対して100%未満の同一性を有する配列を含む。

**【0077】**

用語「同一性」、「相同性」、およびそれらの文法的変形例は、2つ以上の参照される実体が「整列された」配列である場合に同じであることを意味する。したがって、例として、2つの核酸が同一である場合、それらは、少なくとも参照される領域または部分内で

50

、同一の配列を有する。同一性は、配列の定義された領域（領域またはドメイン）にわたり得る。

【0078】

同一性の「エリア」または「領域」は、同じである2つ以上の参照される実体の一部を指す。したがって、2つのタンパク質または核酸配列が1つ以上の配列エリアまたは領域にわたって同一である場合、それらはその領域内で同一性を共有する。「整列された」配列は、リファレンス配列と比較して、欠失または付加された塩基またはアミノ酸（ギャップ）の補正をしばしば含む、複数のタンパク質（アミノ酸）または核酸配列を指す。

【0079】

同一性は、配列の全長または一部に及び得る。ある実施形態では、同一性パーセントを共有する配列の長さは、2個、3個、4個、5個またはそれ以上の連続するアミノ酸または核酸、例えば、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個等の連続するアミノ酸または核酸である。ある実施形態では、同一性を共有する配列の長さは、21個以上の連続するアミノ酸または核酸、例えば、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、31個、32個、33個、34個、35個、36個、37個、38個、39個、40個等の連続するアミノ酸または核酸である。ある実施形態では、同一性を共有する配列の長さは、41個以上の連続するアミノ酸または核酸、例えば、42個、43個、44個、45個、46個、47個、48個、49個、50個等の連続するアミノ酸または核酸である。ある実施形態では、同一性を共有する配列の長さは、50個以上の連続するアミノ酸または核酸、例えば、50～55個、55～60個、60～65個、65～70個、70～75個、75～80個、80～85個、85～90個、90～95個、95～100個、100～150個、150～200個、200～250個、250～300個、300～500個、500～1,000個等の連続するアミノ酸または核酸である。

【0080】

本明細書に記載されるように、C1インヒビターをコードする改変型核酸は、C1インヒビターをコードするリファレンス核酸に対して100%の同一性または100%未満の同一性を有し得る。

【0081】

ある実施形態によれば、C1インヒビターをコードする核酸は、以下からなる群から選択される：

(1) 配列番号：105の配列に対して83%以上の配列同一性、84%以上の配列同一性、85%以上の配列同一性、86%以上の配列同一性、87%以上の配列同一性、88%以上の配列同一性、89%以上の配列同一性、90%以上の配列同一性、91%以上の配列同一性、92%以上の配列同一性、93%以上の配列同一性、94%以上の配列同一性、95%以上の配列同一性、96%以上の配列同一性、97%以上の配列同一性、98%以上の配列同一性、99%以上の配列同一性、99.5%以上の配列同一性等の、配列番号：105の配列に対して少なくとも83%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(2) 配列番号：106の配列に対して83%以上の配列同一性、84%以上の配列同一性、85%以上の配列同一性、86%以上の配列同一性、87%以上の配列同一性、88%以上の配列同一性、89%以上の配列同一性、90%以上の配列同一性、91%以上の配列同一性、92%以上の配列同一性、93%以上の配列同一性、94%以上の配列同一性、95%以上の配列同一性、96%以上の配列同一性、97%以上の配列同一性、98%以上の配列同一性、99%以上の配列同一性、99.5%以上の配列同一性等の、配列番号：106の配列に対して少なくとも83%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；(3) 配列番号：107の配列に対して80%以上の配列同一性、81%以上の配列同一性、82%以上の配列同一性、83%以上の配列同一性、84%以上の配列同一性、85%以上の配列同一性、86%以上の配列同一性、87%以上の配列同一性、88%以上の配列同一性、89%以上の配列同一性、90%以上の配列同一性、91%以上の配列同一性、92%以上の配列同一性、93%以上の配列同一性、94%以上の配列同一性、95%以上の配列同一性、96%以上の配列同一性、97%以上の配列同一性、98%以上の配列同一性、99%以上の配列同一性、99.5%以上の配列









## 【0082】

ある実施形態によれば、本発明の核酸は、配列番号：181または192のアミノ酸配列を有するC1インヒビターをコードする。

## 【0083】

ある実施形態によれば、ポリヌクレオチドは、変異体C1インヒビターをコードする核酸を含む。変異体C1インヒビターの例としては、切断型C1インヒビター、2つ以上のC1インヒビターの融合体、またはFc領域もしくはドメイン等の安定化部分とC1インヒビターとの融合体が挙げられるが、限定されない。

## 【0084】

本明細書で使用される場合、「Fc領域」または「Fcドメイン」という語は、免疫グロブリン重鎖定常領域のカルボキシル末端部分、またはその類似体もしくは部分を意味する。すなわち、例えば、ヒンジ領域、CH2ドメイン、およびCH3ドメインの少なくとも一部を含み得る、Igの免疫グロブリンFc領域、好ましくはIgGである。Fc領域は、天然配列Fc領域または変異体Fc領域であり得る。天然配列Fc領域は、天然に見出されるFc領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含む。当業者によって理解される変異体Fc領域は、少なくとも1つのアミノ酸修飾によって天然配列Fc領域のものとは異なるアミノ酸配列を含む。ある実施形態によれば、Fc領域は、Dall'Acqua et al., J Biol Chem., 281(33): 23514-24 (2006)、Ishino et al., J Biol Chem., 288(23): 16529-37 (2013)、Ying et al., J Biol Chem., 287(23): 19399-19408 (2012)、またはZalevsky et al., Nat Biotechnol., 28(2): 157-159 (2010)に記載されるものの一つであり、それらは参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

## 【0085】

ある実施形態によれば、本発明のFc領域は、配列番号：219～224のいずれかのアミノ酸配列を有する。ある実施形態によれば、本発明のFc領域をコードする核酸は、配列番号：159～164のいずれかの配列を有する。

## 【0086】

ある実施形態では、変異体C1インヒビターをコードする核酸は、配列番号：143～144、158、および165～170のいずれかの配列を有する。

## 【0087】

ある実施形態によれば、本発明の核酸は、配列番号：193～201のいずれかのアミノ酸配列を有する変異体C1インヒビターをコードする。

30

## 【0088】

ある実施形態によれば、ポリヌクレオチドは、2つ以上のC1インヒビタータンパク質の融合体をコードする核酸を含む。ある実施形態では、第1のC1インヒビタータンパク質またはその変異体は、豚テシオウイルス (porcine teschovirus) -1 2A (P2A) のペプチド配列等のオートプロテアーゼペプチドを介して第2のC1インヒビタータンパク質またはその変異体に融合される。ある実施形態では、核酸は配列番号：158の配列を有する。ある実施形態によれば、ポリヌクレオチドは、配列番号：195のアミノ酸配列を有する第1および第2のC1インヒビタータンパク質の融合体をコードする核酸を含む。

## 【0089】

リファレンス核酸または親核酸と比較して異なる特徴または特性を示すC1インヒビターをコードする修飾核酸は、ヌクレオチドの置換を含む。例えば、C1インヒビターをコードする改変型核酸は、CpG減少核酸と称される、C1インヒビターをコードするリファレンス核酸と比較してCpGジヌクレオチドの数が減少した核酸を含む。

40

## 【0090】

本明細書で使用される場合、「CpG減少」または「CpG枯渇」という文言は、1以上のCpGジヌクレオチドが核酸配列から除去されるように、合成的に、または核酸配列の変異により生成される核酸配列を指す。ある実施形態では、すべてのCpGモチーフは除去され、本明細書で改変型CpG非含有配列と称されるものが提供される。CpGモチーフは、コード配列 (例えば導入遺伝子) だけでなく、例えば、5'非翻訳領域 (UTR) およ

50

び3' UTR、プロモーター、エンハンサー、シグナルペプチド、ポリA、ITR、イントロン、およびポリヌクレオチド分子中に存在する任意の他の配列を含む非コード配列においても、好適に減少または除去される。

【0091】

ある実施形態によれば、C1インヒビターをコードする核酸は、24未満のCpGジヌクレオチドを含み、例えば、24個、23個、22個、21個、20個、19個、18個、17個、16個、15個、14個、13個、12個、11個、10個、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個、2個、1個、または0個のCpGジヌクレオチドを含む。

【0092】

「から本質的になる」という文言は、特定のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を指す場合、所与の配列番号の特性を有する配列を意味する。例えば、アミノ酸配列に関して使用される場合、この文言は、配列自体、および配列の基本的かつ新規な特徴に影響を及ぼさない分子改変を含む。

10

【0093】

本発明のC1インヒビターをコードする改変型核酸を含む核酸、発現ベクター、AAVベクターゲノム、非ウイルスベクター、プラスミドは、組換えDNA技術手法を用いて調製され得る。ヌクレオチド配列情報の利用可能性は、種々の手段による本発明の単離された核酸分子の調製を可能にする。C1インヒビターをコードする核酸は、細胞発現またはin vitro翻訳および化学合成技術を紹介して、様々な標準的なクローニング、組換えDNA技術を用いて作製され得る。ポリヌクレオチドの純度は、配列決定、ゲル電気泳動等によって決定され得る。例えば、核酸は、ハイブリダイゼーションまたはコンピューターベースのデータベーススクリーニング技術を用いて単離され得る。このような技術としては、次のものが挙げられるが、これらに限定されない；(1) 相同ヌクレオチド配列を検出するためのプローブによるゲノムDNAまたはcDNAライブラリーのハイブリダイゼーション；(2) 共有された構造的特徴を有するポリペプチドを検出するための抗体スクリーニング、例えば、発現ライブラリーを用いた抗体スクリーニング；(3) 目的の核酸配列にアニーリングすることができるプライマーを使用するゲノムDNAまたはcDNA上のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)；(4) 関連配列についての配列データベースのコンピュータ検索；および(5) 示差核酸ライブラリーのディファレンシャルスクリーニング。

20

【0094】

核酸は、任意の好都合なクローニングベクターにおいてDNAとして維持され得る。ある実施形態では、クローンは、好適な大腸菌宿主細胞中で増殖される、pBluescript(Stratagene, La Jolla, CA)等のプラスミドクローニング/発現ベクター中に維持される。あるいは、核酸は、哺乳動物細胞における発現に適したベクター中に、例えば、AAVベクター中に維持され得る。翻訳後修飾がタンパク質機能に影響を及ぼす場合、核酸分子は哺乳動物細胞において発現され得る。

30

【0095】

発現カセット

本発明はまた、発現制御エレメントに作動可能に連結された、本明細書に記載のC1インヒビターをコードする核酸を含むポリヌクレオチドを含む発現カセットを提供する。

40

【0096】

ある実施形態では、発現カセットはC1インヒビターをコードする核酸を含むポリヌクレオチドを含み、核酸は：

(1) 配列番号：105の配列に対して少なくとも83%の配列同一性(例えば、83~100%の同一性)を有するポリヌクレオチド；(2) 配列番号：106の配列に対して少なくとも83%の配列同一性(例えば、83~100%の同一性)を有するポリヌクレオチド；(3) 配列番号：107の配列に対して少なくとも80%の配列同一性(例えば、80~100%の同一性)を有するポリヌクレオチド；(4) 配列番号：108の配列に対して少なくとも80%の配列同一性(例えば、80~100%の同一性)を有するポリヌクレオチド；(5) 配列番号：109の配列に対して少なくとも83%の配列同一性(例えば、83

50



## 【0097】

ある実施形態では、C1インヒビターは、配列番号：181または192のアミノ酸配列を含む。

## 【0098】

ある実施形態によれば、発現カセットは、変異体C1インヒビターをコードする核酸を含むポリヌクレオチドを含み、変異体C1インヒビターは、切断型C1インヒビター、2つ以上のC1インヒビターの融合体、またはC1インヒビターとFc領域もしくはドメインとの融合体を含む。ある実施形態によれば、核酸は、配列番号：143～144、158、および165～170のいずれかの配列を有する。

## 【0099】

ある実施形態によれば、本発明の核酸は、配列番号：193～201のいずれかのアミノ酸配列を有する変異体C1インヒビターをコードする。

## 【0100】

ある実施形態では、発現カセットは、本発明のポリヌクレオチド分子によってコードされるポリペプチドの分泌を可能にする適切な分泌シグナル配列またはシグナルペプチドのコード配列を含む。本明細書で使用される場合、用語「分泌シグナル配列」または「シグナルペプチド」またはその変形例は、作動可能に連結されたポリペプチドの細胞からの分泌を駆動するように機能し得るアミノ酸配列を指すことが意図される。ある実施形態では、分泌シグナル配列またはシグナルペプチドは、天然または天然発生のシグナルペプチドを有する天然ポリペプチドで見られる分泌レベルと比較して、作動可能に連結されたポリペプチドの細胞からの分泌を増強するように機能し得る。シグナルペプチドは、タンパク質のN末端に位置する短いペプチド（典型的には25～30アミノ酸長）であり、タンパク質分泌のための情報を保有する。シグナルペプチドは、小胞体分泌経路に、または小胞体分泌経路を介してタンパク質を誘導する。「増強された」分泌とは、細胞から分泌される、細胞によって合成されるポリペプチドの相対的割合が増加することを意味し、分泌されるタンパク質の絶対量もまた増加することは必須ではない。ある実施形態では、ポリペプチドの本質的に全て（すなわち、少なくとも95%、97%、98%、99%またはそれ以上）が分泌される。しかし、シグナルペプチドを有しない天然のポリペプチドと比較して分泌レベルが増強される限りにおいては、ポリペプチドの本質的に全てまたは大部分は、分泌される必要はない。一般に、分泌シグナル配列は小胞体内で切断され、ある実施形態では、分泌シグナル配列は分泌前に切断される。しかし、細胞からのポリペプチドの分泌が増強され、かつポリペプチドが機能的である限りにおいては、分泌シグナル配列は切断される必要はない。したがって、ある実施形態では、分泌シグナル配列は、部分的にまたは完全に保持される。分泌シグナル配列は、分泌されるポリペプチドの分泌シグナルから（すなわち前駆体から）全体的もしくは部分的に誘導され得、かつ/または全体的もしくは部分的に合成され得る。分泌シグナル配列の長さは重要ではなく、一般に、公知の分泌シグナル配列は、約10～15アミノ酸長から50～60アミノ酸長である。さらに、得られる分泌シグナル配列が、作動可能に連結されたポリペプチドの分泌を増強するように機能する限りにおいては、分泌されるポリペプチド由来の公知の分泌シグナルは、（例えば、アミノ酸の置換、欠失、切断または挿入によって）改変または修飾され得る。本発明の分泌シグナル配列は、天然に存在する分泌シグナル配列またはその改変体を含み得るか、本質的にこれからなり得るか、またはこれからなり得る。細胞からの分泌を指示する多数の分泌タンパク質および配列は、当技術分野で公知であり、Owji et al., Eur. J. Cell Biol. 97:422-441 (2018)に記載されるものを含む。本発明の分泌シグナル配列は、さらに、全体的または部分的に合成または人工的であり得る。合成または人工の分泌シグナルペプチドは、当技術分野で公知である。例えば、Barash et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 294:835-42 (2002)を参照。

## 【0101】

本開示を考慮して、当業者に公知の任意の好適なシグナルペプチドを本発明において使用することができる。シグナルペプチドの例としては、シグナルペプチドデータベース（

10

20

30

40

50

www.signalpeptide.de/) から見出されるものが挙げられるが、これらに限定されない。本発明に好適なシグナルペプチドの例としては、野生型C1インヒビターペプチド、ヒトキモトリプシノゲンB2シグナルペプチド(「Sp7」; NCBIリファレンス配列NP\_01020371の18アミノ酸シグナルペプチド)、アルブミン(ALB)シグナルペプチド、オロソムコイド1(ORM1)シグナルペプチド、トランスフェリン(TF)シグナルペプチド、1-マイクログロブリン/ピクニン前駆体(AMBP)シグナルペプチド、リソソーム関連膜糖タンパク質1(LAMP1)シグナルペプチド、ブチロフィリンサブファミリー2メンバーA2(BTN2A2)シグナルペプチド、CD300シグナルペプチド、Notch2シグナルペプチド、ステレオシリン(STRC)シグナルペプチド、2-HS-糖タンパク質(AHSG)シグナルペプチド、SYN1シグナルペプチド(配列番号: 215)、SYN2シグナルペプチド(配列番号: 216)、SYN3シグナルペプチド(配列番号: 217)、SYN4シグナルペプチド(配列番号: 218)、secrecon(Barash et al., Biochem Biophys Res Commun., 294: 835-842 (2002)に記載される人工シグナル配列)、マウスIgKVIII、ヒトIgKVIII、CD33、tPA、a-1アンチトリプシンシグナルペプチド、天然分泌型アルカリホスファターゼ(SEAP)が挙げられるが、これらに限定されない。上記のシグナルペプチドの変異体を含む、小胞体分泌経路を介してタンパク質を誘導する任意の従来のシグナル配列は、本発明において使用することができる。

10

**【0102】**

ある実施形態では、本発明は、以下の規定のいずれか1つ、2つ、3つ、または4つ全てに従うシグナルペプチドに関する：(1)正味の正電荷を有する2~5個のアミノ酸のアミノ末端N領域、(2)6~15アミノ酸の疎水性H領域、(3)シグナルペプチドのC末端から-3位の電荷を有しないアミノ酸を伴う、カルボキシル末端C領域の5~10アミノ酸、および短い側鎖を含むシグナルペプチドのC末端から-1位のアミノ酸、ならびに(4)シグナルペプチドのC末端から-10位のロイシン残基。

20

**【0103】**

ある実施形態では、本発明は、配列番号: 215に対して少なくとも90%、少なくとも95%、または100%の配列同一性を有する配列を含むシグナルペプチドに関する。ある実施形態では、本発明は、配列番号: 216に対して少なくとも90%、少なくとも95%または100%の配列同一性を有する配列を含むシグナルペプチドに関する。ある実施形態では、本発明は、配列番号: 217に対して少なくとも90%、少なくとも95%または100%の配列同一性を有する配列を含むシグナルペプチドに関する。ある実施形態では、本発明は、配列番号: 218に対して少なくとも90%、少なくとも95%または100%の配列同一性を有する配列を含むシグナルペプチドに関する。

30

**【0104】**

ある実施形態では、本発明は、シグナルペプチドをコードする核酸であって、配列番号: 100に対して少なくとも90%、少なくとも95%または100%の配列同一性を有する配列を含む核酸に関する。ある実施形態では、本発明は、シグナルペプチドをコードする核酸であって、配列番号: 101に対して少なくとも90%、少なくとも95%または100%の配列同一性を有する配列を含む核酸に関する。ある実施形態では、本発明は、シグナルペプチドをコードする核酸であって、配列番号: 102に対して少なくとも90%、少なくとも95%または100%の配列同一性を有する配列を含む核酸に関する。ある実施形態では、本発明は、シグナルペプチドをコードする核酸であって、配列番号: 103に対して少なくとも90%、少なくとも95%または100%の配列同一性を有する配列を含む核酸に関する。さらなる実施形態では、コードされるシグナルペプチドは、配列番号: 215~218のいずれかに対して少なくとも95%または100%の配列同一性を有する。

40

**【0105】**

ある実施形態では、本発明のシグナルペプチドは、当技術分野で公知の任意の治療用導入遺伝子から発現される任意の治療用タンパク質の分泌を引き起こすためかまたは駆動するために有用である。ある実施形態では、本発明のシグナルペプチドは、当技術分野で公知の任意の治療用導入遺伝子から発現される任意の治療用タンパク質の肝臓からの分泌を

50

引き起こすためかまたは駆動するために有用である。

【0106】

ある実施形態では、配列番号：215～218のうちの1つの配列を含むシグナルペプチドは、当技術分野で公知の任意の治療用導入遺伝子から発現される任意の治療用タンパク質の分泌を引き起こすまたは駆動するために有用である。ある実施形態では、配列番号：215～218のうちの1つの配列を含むシグナルペプチドは、当技術分野で公知の任意の治療用導入遺伝子から発現される任意の治療用タンパク質の分泌を引き起こすまたは駆動するために有用である。

【0107】

ある実施形態は、配列番号：215、216、217、および218のいずれかに対して少なくとも95%、または100%同一の配列を含むポリペプチド；ならびに配列番号：215、216、217、および218のいずれかに対して少なくとも95%、または100%同一の配列を含むポリペプチドをコードする配列を含む核酸に関する。

【0108】

治療的導入遺伝子の例としては、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、2020年11月19日に出版されたPCT/US2020/061356に開示されたもの等の多発性硬化症の治療のためのミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)、プロテオリピドタンパク質1(PLP1)、またはミエリン塩基性タンパク質(MBP)；その全体が参照により本明細書に組み込まれるWO2019/222411に開示されているもの等の、ポンペの治療病または別のグリコーゲン貯蔵疾患のためのGAA(酸性グルコシダーゼ)；ウィルソン病の治療のためのATP7B(銅輸送ATPase2)；ファブリー病の治療のためのGLA(ガラクトシダーゼA)；シトルリン血症1型の治療のためのASS1(アルギノコハク酸シンターゼ)；ゴーシェ病1型の治療のためのグルコセレブロシダーゼ；テイ・サックス疾患の治療のためのヘキサミンダーゼA；C1インヒビター欠損I型およびII型としても知られる遺伝性血管性浮腫(HAE)の治療のためのSERPING1(C1プロテアーゼインヒビターまたはC1エステラーゼインヒビター)；糖原病I型(GSDI)の治療のためのグルコース-6-ホスファターゼ；インスリン、グルカゴン、成長ホルモン(GH)、副甲状腺ホルモン(PTH)、成長ホルモン放出因子(GRF)、卵巣刺激ホルモン(FSH)、黄体形成ホルモン(LH)、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)、血管内皮成長因子(VEGF)、アンジオポエチン、アンジオスタチン、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、エリスロポエチン(EPO)、結合組織成長因子(CTGF)、塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)、酸性線維芽細胞成長因子(aFGF)、上皮成長因子(EGF)、トランスフォーミング増殖因子(TGF)、血小板由来成長因子(PDF)、インスリン成長因子IまたはII(IGF-IまたはIGF-II)、TGF、アクチビン、インヒビン、骨形成タンパク質(BMP)、神経成長因子(NGF)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、ニューロトロフィンNT-3またはNT4/5、毛様体神経栄養因子(CNTF)、グリア細胞株由来神経栄養因子(GDNF)、ニューロニン、アグリニン、ネトリン-1またはネトリン-2、肝細胞増殖因子(HGF)、エフリン、ノギン、ソニックヘッジホッグまたはチロシンヒドロキシラーゼ；トロンボポエチン(TPO)、インターロイキン(IL-1～IL-36等)、単球走化性タンパク質、白血病阻止因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、Fasリガンド、腫瘍壊死因子または、インターフェロン、または、幹細胞因子、flt3リガンド、IgG、IgM、IgA、IgDまたはIgE、キメラ免疫グロブリン、ヒト化抗体、一本鎖抗体、T細胞受容体、キメラT細胞受容体、クラスIまたはクラスII MHC分子；CFTR(嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子タンパク質)、血液凝固(第XIII因子、第VIII因子、第X因子、第VII因子VIIa、プロテインC等)、血液凝固因子(第XIII因子、第IX因子(FIX)、第VIII因子(FVIII)、第X因子、第VII因子、第VIIa因子、プロテインC)、血液凝固因子の機能の獲得、抗体、網膜色素上皮特異的65kDaタンパク質(RPE65)、エリスロポエチン、LDL受容体、リポタンパク質リパーゼ、オルニチントランスカルバミラーゼ、グロビン、グロビン、スペクトリン、アンチトリプシン、アデノシンデアミナーゼ(ADA)、金属トランスポーター(ATP7AまたはATP7)、ス

ルファミダーゼ、リソソーム蓄積症関連酵素 (ARSA)、ヒポキサンチングアニンホスホ  
リボシルトランスフェラーゼ、 $\alpha$ -25グルコセレブロシダーゼ、スフィンゴミエリナーゼ  
、リソソームヘキソサミニダーゼ、分枝鎖ケト酸デヒドロゲナーゼ、ホルモン、成長因子  
、インスリン様成長因子1または2、血小板由来成長因子、上皮成長因子、神経栄養因子-  
3および-4、脳由来神経栄養因子、トランスフォーミング増殖因子 および、サイトカ  
イン、インターフェロン、インターフェロン、インターフェロン、インターロイキン  
-2、インターロイキン-4、インターロイキン-12、顆粒球 - マクロファージコロニー  
刺激因子、リンホトキシン、自殺遺伝子産物、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ、  
シトシンデアミナーゼ、ジフテリア毒素、シトクロムP450、デオキシシチジンキナーゼ  
、薬剤耐性タンパク質、腫瘍抑制タンパク質 (例えば、p53、Rb、Wt-1、NF1、フォ  
ン・ヒッペルリンドウ (VHL)、大腸腺腫様ポリポーシス (APC))、免疫調節特性を  
有するペプチド、寛容原性もしくは免疫原性ペプチドまたはトレグトップタンパク質また  
はhCDR1、グルコキナーゼ、グアニル酸シクラーゼ2D (LCA-GUCY2D)、Rabエスコ  
ートタンパク質1 (コロイデレミア)、LCA 5 (LCA-レベルシリン)、オルニチンケト  
酸アミノトランスフェラーゼ (脳回転状萎縮)、レチノスカイシン1 (X連鎖網膜分離症  
)、USH1C (アッシャー症候群 1C)、X染色体劣性網膜色素変性GTPase (XLRP)、  
MERTK (AR形態のRP:網膜色素変性症)、DFNB1 (コネキシン26難聴)、ACHM 2  
、3および4 (色覚異常)、PKD-1またはPKD-2 (多発性嚢胞腎)、TPP1、CLN2、ス  
ルファターゼ、N-アセチルグルコサミン-1-リン酸トランスフェラーゼ、カテプシンA、  
GM2-AP、NPC1、VPC2、スフィンゴ脂質活性化タンパク質；貧血の治療のためのエリ  
スロポエチン (EPO)；様々な免疫障害、ウイルス感染および癌の治療のためのインタ  
ーフェロン、インターフェロン、およびインターフェロン；様々な炎症性疾患  
または免疫不全の治療のためのIL-1~IL-36のいずれかを含むインターロイキン (IL)  
および対応する受容体；免疫障害の治療のためのケモカイン (C-X-Cモチーフ)リガン  
ド5 (CXCL5)を含むケモカイン；クローン病等の免疫障害の治療のための顆粒球 - コ  
ロニー刺激因子 (G-CSF)；種々のヒト炎症性疾患の治療のための顆粒球 - マクロファ  
ージコロニー刺激因子 (GM-CSF)；種々のヒト炎症性疾患の治療のためのマクロファ  
ージ - コロニー刺激因子 (M-CSF)；上皮組織損傷の治療のためのケラチノサイト増殖  
因子 (KGF)；再発性流産、HIV関連合併症、およびインスリン抵抗性の治療のための  
単球走化性タンパク質-1 (MCP-1)等のケモカイン；様々な免疫障害の治療のための腫  
瘍壊死因子 (TNF)および受容体；肺気腫または慢性閉塞性肺疾患 (COPD)の治療のた  
めの  $\alpha$ -1-アンチトリプシン；ムコ多糖症I (MPS I)の治療のための  $\alpha$ -L-イズロニダー  
ゼ；オルニチントランスカルバモイラーゼ (OTC) 欠乏症の治療のためのOTC；フェニ  
ルケトン尿症 (PKU)の治療のためのフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) また  
はフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL)；リポタンパク質リパーゼ欠損症の治  
療のためのリポタンパク質リパーゼ；アポリポタンパク質 (Apo) A-I欠損症の治療のた  
めのアポリポタンパク質；家族性高コレステロール血症 (FH)の治療のための低密度リ  
ポタンパク質受容体 (LDL-R)；低アルブミン血症の治療のためのアルブミン；レシチ  
ンコレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT)；カルバモイルシンセターゼI；  
アルギニノコハク酸シンセターゼ；アルギニノコハク酸リアーゼ；アルギナーゼ、フマリ  
ルアセト酢酸ヒドロラーゼ、ボルホビリノーゲンデアミナーゼ；ホモシスチン尿症の治療  
のためのシスタチオニン シンターゼ；分岐鎖ケト酸デカルボキシラーゼ；イソバレリル  
CoAデヒドロゲナーゼ；プロピオニルCoAカルボキシラーゼ；メチルマロニルCoAムタ  
ーゼ；グルタリルCoAデヒドロゲナーゼ；インスリン；ピルビン酸カルボキシラーゼ；  
肝ホスホリラーゼ；ホスホリラーゼキナーゼ；グリシンデカルボキシラーゼ；Hタンパク  
質；Tタンパク質；嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子 (CFTR)；スタルガルト病  
の治療のためのATP結合カセット、サブファミリーA (ABC1)、メンバー4 (ABCA4)  
；ジストロフィン；遺伝子編集ヌクレアーゼ、例えばジンクフィンガーヌクレアーゼ (Z  
FN)、転写活性因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、機能的II型CRISPR-Cas  
9が挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

## 【0109】

ある実施形態では、シグナルペプチドは、内因性または天然のC1インヒビターシグナルペプチドまたはその変異体である。

## 【0110】

ある実施形態では、シグナルペプチドは、ヘテロシグナルペプチドまたはその変異体である。

## 【0111】

ある実施形態では、発現カセットは、C1インヒビターをコードする核酸の5'末端に位置するシグナルペプチド配列をコードする核酸を含む。ある実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号：84～103のいずれかの配列を有する。ある実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号：203～224のいずれかのアミノ酸配列を有する。

10

## 【0112】

ある実施形態では、発現制御エレメントは、C1インヒビターをコードする核酸の5'に位置する。

## 【0113】

「発現カセット」という語は、本明細書で使用される場合、本発明のポリヌクレオチド分子の発現に十分な核酸エレメントを含む核酸コンストラクトを指す。典型的には、発現カセットは、プロモーター配列に作動可能に連結された本発明のポリヌクレオチド分子を含む。

## 【0114】

「発現制御エレメント」は、作動可能に連結された核酸の発現に影響を及ぼす核酸配列を指す。本明細書に記載の発現制御エレメントには、プロモーターおよびエンハンサーが含まれる。AAVベクターおよび非ウイルスベクターを含むベクター配列は、1以上の「発現制御エレメント」を含み得る。典型的には、このようなエレメントは、適切なヘテロポリヌクレオチド転写および適切な翻訳を促進するために含まれる（例えば、プロモーター、エンハンサー、イントロンのスプライシングシグナル、mRNAのインフレーム翻訳を可能にする遺伝子の正確なリーディングフレームの維持、および終止コドン等）。このようなエレメントは、典型的には、シスで作用し、「シス作用」エレメントと称されるが、トランスで作用することもできる。

20

## 【0115】

発現制御は、転写、翻訳、スプライシング、メッセージ安定性等のレベルで影響され得る。典型的には、転写を調節する発現制御エレメントは、転写された核酸の5'末端（すなわち「上流」）付近に並置される。発現制御エレメントはまた、転写された配列の3'末端（すなわち「下流」）または転写物内（例えばイントロン内）に位置し得る。発現制御エレメントは、転写された配列に隣接して、または転写された配列から離れた距離（例えば、ポリヌクレオチドから1～10、10～25、25～50、50～100、100～500、またはそれ以上のヌクレオチド）に、かなりの距離であっても、位置し得る。それにもかかわらず、AAVベクターの長さの制限のために、AAVベクター中の発現制御エレメントは、典型的には、ヘテロ核酸の転写開始部位から1～1000ヌクレオチド以内である。

30

## 【0116】

機能的には、作動可能に連結された核酸の発現は、エレメント（例えばプロモーター）によって少なくとも部分的に制御可能であり、その結果、エレメントは、核酸の転写、および必要に応じて、転写物の翻訳を調節する。発現制御エレメントの具体例としては、通常、転写された核酸配列の5'に位置するプロモーターが挙げられる。プロモーターは、典型的には、プロモーターが存在しない場合に発現される量と比較して、作動可能に連結された核酸から発現される量を増加させる。

40

## 【0117】

「作動可能に連結された」という語は、核酸配列の発現に必須の調節配列が、核酸配列の発現に影響を及ぼすように、配列に対して適切な位置に配置されることを意味する。この同じ定義は、発現ベクター、例えば、組換えAAV（rAAV）ベクターまたは非ウイルス

50

ベクターにおける核酸配列および転写制御エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー、および終結エレメント）の配置に適用されることがある。コード配列は、センスまたはアンチセンス配向で調節配列に作動可能に連結され得る。ある実施形態では、プロモーターはヘテロプロモーターである。

【0118】

「ヘテロプロモーター」という語は、本明細書で使用される場合、天然の所与のコード配列に作動可能に連結されていることが見出されないプロモーターを指す。ある実施形態では、発現カセットは、さらなるエレメント、例えば、イントロン、エンハンサー、ポリアデニル化部位、ウッドチャック応答要素（WRE）、および/またはコード配列の発現レベルに影響を及ぼすことが知られる他のエレメントを含み得る。

10

【0119】

本明細書で使用される場合、「プロモーター」という語は、コード配列または機能的RNAの発現を制御することができるヌクレオチド配列を指す。一般に、本発明の核酸分子は、プロモーター配列の3'に位置する。ある実施形態では、プロモーター配列は、近位およびより遠位の上流エレメントからなり、エンハンサーエレメントを含み得る。

【0120】

本明細書で使用される「エンハンサー」は、ヘテロ核酸に隣接して位置する配列を指し得る。エンハンサーエレメントは、典型的には、プロモーターエレメントの上流に位置するが、機能することもあり、配列の下流または配列内に位置し得る。したがって、エンハンサーエレメントは、ヘテロ核酸配列の上流もしくは下流の10~50塩基対、50~100塩基対、100~200塩基対、もしくは200~300塩基対、またはそれ以上の塩基対に位置し得る。エンハンサーエレメントは、典型的には、プロモーターエレメントによって提供される発現を上回る、作動可能に連結された核酸の発現を増加させる。

20

【0121】

発現コンストラクトは、特定の細胞または組織型における発現を駆動する働きをする制御エレメントを含み得る。発現制御エレメント（例えばプロモーター）は、本明細書において「組織特異的発現制御エレメント/プロモーター」と称される、特定の組織または細胞型において活性であるものを含む。組織特異的発現制御エレメントは、典型的には、特定の細胞または組織型（例えば肝臓）において活性である。発現制御エレメントは、典型的には、特定の細胞、組織、または器官に特有の転写活性化タンパク質、または転写の他の調節因子によって認識されるため、特定の細胞、組織、または器官において活性である。そのような調節エレメントは、当業者に公知である（例えば、Sambrook et al. (1989)およびAusubel et al. (1992)を参照）。

30

【0122】

発現コンストラクトにおける組織特異的制御エレメントの組み込みは、タンパク質またはインヒビターRNAをコードするヘテロ核酸の発現のための少なくとも部分的な組織指向性を提供する。肝臓において活性であるプロモーターの例としては、トランスサイレチン（TTR）遺伝子プロモーター；ヒト 1-アンチトリプシン（hAAT）プロモーター；リボタンパク質A-Iプロモーター；アルブミン、Miyatake, et al., J. Virol., 71:5124-32 (1997)；B型肝炎ウイルスコアプロモーター、Sandig, et al., Gene Ther. 3: 1002-9 (1996)；alpha-fetoprotein (AFP), Arbutnot, et al., Hum. Gene Ther., 7:1503-14 (1996)；ヒト第IX因子プロモーター；チロキシン結合グロブリン（TBG）プロモーター；TTR最小エンハンサー/プロモーター、アンチトリプシンプロモーター、LSP (845 nt)（イントロンレスscAAVを必要とする）；LSP1プロモーター等が挙げられる。

40

【0123】

発現制御エレメントはまた、多くの異なる細胞型においてポリヌクレオチドの発現を駆動し得る、遍在性または無差別のプロモーター/エンハンサーを含む。そのようなエレメントとしては、サイトメガロウイルス（CMV）前初期プロモーター/エンハンサー配列、ラウス肉腫ウイルス（RSV）プロモーター/エンハンサー配列、および様々な哺乳動物細

50

胞型において活性な他のウイルスプロモーター/エンハンサー、または天然には存在しない合成エレメント（例えば、Boshart et al., Cell, 41:521-530 (1985)を参照）、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、細胞質 アクチンプロモーターならびにホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK）プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0124】

発現制御エレメントはまた、調節可能な様式で発現を付与し得、すなわち、シグナルまたは刺激は、作動可能に連結されたヘテロポリヌクレオチドの発現を増加または減少させる。シグナルまたは刺激に応答して、作動可能に連結されたポリヌクレオチドの発現を増加させる調節可能なエレメントは、「誘導性エレメント」（すなわち、シグナルによって誘導される）とも称される。特定の例としては、ホルモン（例えばステロイド）誘導性プロモーターが挙げられるが、これに限定されない。典型的には、そのようなエレメントによって付与される増加または減少の量は、存在するシグナルまたは刺激の量に比例し、シグナルまたは刺激の量が多い程、発現の増加または減少が大きくなる。特定の非限定的な例としては、亜鉛誘導性ヒツジメタロチオン（MT）プロモーター；ステロイドホルモン誘導性マウス乳癌ウイルス（MMTV）プロモーター；T7ポリメラーゼプロモーター系（WO 98/10088）；テトラサイクリン抑制系（Gossen, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551(1992)）；テトラサイクリン誘導系（Gossen, et al., Science, 268: 1766-1769(1995)；Harvey, et al., Curr. Opin. Chem. Biol. : 512-518 (1998)を参照。）；RU486誘導系（Wang, et al., Nat. Biotech. 15:239-243(1997)およびWang, et al., Gene Ther. 4:432-441 (1997)；およびラパマイシン誘導系（Magari, et al., J. Clin. Invest. 100:2865-2872(1997)；Rivera, et al., Nat. Medicine. 2:1028-1032 (1996)）が挙げられる。この文脈において有用であり得る他の調節可能な制御エレメントは、特定の生理学的状態、例えば、温度、急性期、発達によって調節されるものである。

#### 【0125】

プロモーターの他の例としては、ホスホグリセリン酸キナーゼ（PKG）プロモーター、サイトメガロウイルスエンハンサー、CAG（CMVエンハンサー、ニワトリ アクチンプロモーター（CBA）およびウサギ グロビンイントロンの複合体）および他の構成的プロモーター、ニューロン特異的エノラーゼ（NSE）プロモーター、SV40初期プロモーター、マウス乳癌ウイルスLTRプロモーター；アデノウイルス主要後期プロモーター（Ad MLP）、単純ヘルペスウイルス（HSV）プロモーター、脾フォーカス形成ウイルス（SFV）プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）プロモーター、ラットインスリンプロモーター、チロキシン結合グロブリン（TBG）プロモーターおよび他の肝臓特異的プロモーター、デスミンプロモーターおよび類似の筋特異的プロモーター、EF1- プロモーター、合成プロモーター、ハイブリッドプロモーター、多組織特異性を有するプロモーター等が挙げられるが、これらに限定されず、これらは全て当業者に周知であり、容易に入手可能である。他のプロモーターは、ヒト起源のものであっても、マウスを含む他の種由来のものであってもよい。

#### 【0126】

発現制御エレメントには、ヘテロポリヌクレオチドの天然エレメントも含まれる。ヘテロポリヌクレオチドの発現が天然発現を模倣すべきであることが望まれる場合、天然制御エレメント（例えばプロモーター）を使用することができる。ヘテロポリヌクレオチドの発現が時間的もしくは発達の、または組織特異的な様式で、または特異的な転写刺激に応答して調節される場合に、天然エレメントを使用することができる。イントロン、ポリアデニル化部位またはコザックコンセンサス配列などの他の天然発現制御エレメントも使用することができる。

#### 【0127】

核酸と作動可能に結合している発現制御エレメントの例において、この関係は、制御エレメントが核酸の発現を調節するようなものである。より具体的には、例えば、作動可能

10

20

30

40

50

に結合された2つのDNA配列は、2つのDNA配列が、DNA配列のうちの少なくとも1つが、他の配列に生理学的作用を及ぼすことができるような関係で配列されている（シスマたはトランス）ことを意味する。

【0128】

したがって、ベクターについてのさらなるエレメントとしては、発現制御（例えば、プロモーター/エンハンサー）エレメント、転写終結シグナルもしくは終止コドン、AAV ITR配列の1以上のコピー等の、配列に隣接する5'もしくは3'非翻訳領域（例えば、ポリアデニル化（ポリA）配列）、またはイントロンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0129】

さらなるエレメントとしては、例えば、フィラーまたはスタッファーポリヌクレオチド配列が挙げられ、例えば、パッケージングを改善し、混入核酸の存在を低減する。AAVベクターは、典型的には、一般に約4 kb～約5.2 kb、またはそれよりわずかに大きいサイズ範囲を有するDNAのインサートを受容する。したがって、より短い配列については、AAVベクターをウイルス粒子にパッケージングするのに許容されるウイルスゲノム配列の通常サイズの近くに、またはそのサイズにて長さを調節するために、スタッファーまたはフィラーを含める。ある実施形態では、フィラー/スタッファー核酸配列は、核酸の非翻訳（非タンパク質コード）セグメントである。4.7 kb未満の核酸配列については、フィラーまたはスタッファーポリヌクレオチド配列は、配列と組み合わせられた（例えば、ベクターに挿入された）場合に、約3.0～5.5 kb、または約4.0～5.0 kb、または約4.3～4.8 kbの全長を有する長さを有する。

【0130】

ある実施形態では、発現カセットは、1以上の組織特異的エレメントをさらに含む。本明細書で使用される場合、「組織特異的エレメント」は、導入遺伝子の組織特異的発現を指令する任意のポリヌクレオチド配列を指す。ある実施形態では、組織特異的エレメントはプロモーターである。ある実施形態では、プロモーター配列は、野生型プロモーター配列と比較してCpGが減少したものである。ある実施形態では、プロモーターはhAATプロモーターである。ある実施形態では、hAATプロモーター配列は、配列番号：79または80のポリヌクレオチド配列を有する。

【0131】

ある実施形態では、発現カセットは、1以上の効力エレメントをさらに含む。本明細書で使用される場合、「効力エレメント」は、mRNA分子の安定性を増強する任意のポリヌクレオチド配列を指す。ある実施形態では、効力エレメントは、エンハンサーまたはポリアデニル化（ポリA）配列である。ある実施形態では、エンハンサーまたはポリA配列は、野生型エンハンサーまたはポリA配列と比較してCpGが低減されたものである。1以上の効力エレメントは、発現カセット内の任意の場所に配置され得る。ある実施形態では、効力エレメントは、例えば、Van Linthout et al., Hum Gene Ther. 2002 May 1;13(7):829-40、Donello et al., J Virol. 1998;72(6):5085-5092、Zufferey et al., J Virol. 1999;73(4):2886-2892、またはChoi et al., Mol Brain 7, 17 (2014)に記載されるもの等のエンハンサーであり、それらの全体は参照により本明細書に組み込まれる。ある実施形態では、効力エレメントは、ApoE、2xApoE、4xApoE、hAATエンハンサー、WPRE、WPRE3からなる群から選択されるエンハンサーであり、イントロンは、場合により、例えば、Ronzitti et al., Mol Ther Methods Clin Dev. 2016;3:160に記載されるもの等のヒトヘモグロビン（HBB）由来イントロンであり、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。ある実施形態では、エンハンサーは、配列番号：225、74～76、81～82、および173～178からなる群から選択されるポリヌクレオチド配列を有する。ある実施形態では、効力エレメントは、任意に、ウシ成長ホルモン（bGH）ポリアデニル化（polyA）配列であるポリA配列である。ある実施形態では、ポリA配列は、配列番号：83のポリヌクレオチドを有する。

【0132】

10

20

30

40

50

ある実施形態では、発現制御エレメントは、C1インヒビターをコードする核酸の5'に位置するApoE/hAATエンハンサー/プロモーター配列を含む。ある実施形態では、ApoE/hAATエンハンサー/プロモーター配列は、野生型ApoE/hAATエンハンサー/プロモーター配列と比較してCpGが減少したものである。ある実施形態では、ApoEエンハンサー配列は、配列番号：225および74～76のいずれかの配列を有する。ある実施形態では、hAATプロモーター配列は、配列番号：79または80の配列を有する。

#### 【0133】

ある実施形態では、発現カセットは、1以上の応答エレメントをさらに含む。本明細書で使用される場合、「応答エレメント」は、プロモーターに近接してまたはプロモーター内に配置される場合、転写活性を調節することができる核酸配列を指す。ある実施形態では、応答エレメントは、miRNA結合部位、制御されたIre1依存性崩壊(RIDD)配列、急性期応答エレメント(APRE)、または5' UTRもしくは3' UTR配列である。ある実施形態では、miRNA結合部位、調節Ire1依存性崩壊(RIDD)配列、急性期応答エレメント(APRE)、または5' UTRもしくは3' UTR配列は、野生型のmiRNA結合部位、調節Ire1依存性崩壊(RIDD)配列、急性期応答エレメント(APRE)、または5' UTRもしくは3' UTR配列と比較して、CpGが減少したものである。ある実施形態では、応答エレメントは、miRNA結合部位であり、場合により、Brown et al., Nat Med 12, 585-591 (2006)に記載されるもの等のmiR-142-3p配列である。ある実施形態では、miR-142-3p配列は、配列番号：179のポリヌクレオチド配列を有する。ある実施形態では、応答エレメントは、制御されたIre1依存性崩壊(RIDD)配列である。ある実施形態では、応答エレメントは、例えば、Oikawa et al., Nucleic Acids Res. 2010 Oct;38(18):6265-73またはMoore and Hollien, Molecular Biology of the Cell 2015 26:16, 2873-2884に記載されるもの等のRIDD配列であり、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。ある実施形態では、応答エレメントは、1xRIDD、3xRIDD、およびRIDD1xBiosからなる群から選択されるRIDD配列である。ある実施形態では、RIDD配列は、配列番号：185～187からなる群から選択されるポリヌクレオチド配列を有する。ある実施形態では、応答エレメントは、急性期応答エレメント(APRE)である。ある実施形態では、応答エレメントは、例えば、Longley et al., J Immunol. 1999 Oct 15;163(8):4537-45、Podvinec et al., PNAS, 2004;101(24):9127-9132、Prada et al., Immunobiology. 1998 Aug;199(2):377-88、Rygg et al., Scand J Immunol. 2001 Jun;53(6):588-95、またはSerrano-Mendioroz et al., Hum Gene Ther. 2018;29(4):480-491に記載されるもの等のAPRE配列であり、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。ある実施形態では、応答エレメントは、SAA2 APRE、2x ADRES、SERPING1 5' UTR、APRE 5' UTR、およびSAA2 5' UTRからなる群から選択されるAPREである。ある実施形態では、APREは、配列番号：77～78、180、および182～183からなる群から選択されるポリヌクレオチド配列を有する。ある実施形態では、応答エレメントは、5' UTRまたは3' UTR配列であり、場合により、例えば、Longley et al., J Immunol. 1999 Oct 15;163(8):4537-45に記載されるもの等のSAA2 3' UTR配列である。ある実施形態では、SAA2 3' UTR配列は、配列番号：184のポリヌクレオチド配列を有する。

#### 【0134】

ある実施形態では、1以上の組織特異的エレメント、1以上の効力エレメント、および/または1以上の応答エレメントは、核酸の5'に位置する。ある実施形態では、1以上の組織特異的エレメント、1以上の効力エレメント、および/または1以上の応答エレメントは、核酸の3'に位置する。

#### 【0135】

ある実施形態では、発現カセットは、配列番号：1～69および227～229のいずれかの配列を有する。ある実施形態では、発現カセットは、配列番号：1～69および227～229のいずれかに対して、少なくとも75%の配列同一性、少なくとも80%の配列同一性、少なくとも85%の配列同一性、少なくとも90%の配列同一性、少なくとも9

5%の配列同一性、少なくとも96%の配列同一性、少なくとも97%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性、少なくとも99%の配列同一性、少なくとも99.5%の配列同一性、または100%の配列同一性の配列を有する。

【0136】

遺伝子導入システム

ウイルスベクター

【0137】

本発明は、本明細書に記載のC1インヒビターをコードする核酸を含むポリヌクレオチドを含むアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター等のウイルスベクターをさらに提供する。

【0138】

本明細書で使用される「ベクター」または「遺伝子導入ベクター」という語は、目的の遺伝子を含む核酸分子を指す。ベクターの例としては、ウイルス粒子、またはレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、およびレンチウイルス粒子もしくはウイルス様粒子(VLP)等のウイルス粒子に類似するが非感染性であるウイルス様粒子(VLP)によって送達されるウイルスベクター；ならびにマイクロインジェクション、エレクトロポレーション、リポソーム、大きな天然ポリマー、大きな合成ポリマー、および天然および合成の成分の両方から構成されるポリマー等の非ウイルス遺伝子導入システムによって送達される非ウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。

【0139】

ベクター核酸配列は、一般に、細胞中での増殖のための少なくとも1つの複製起点を含み、かつ任意に、ヘテロポリヌクレオチド配列、発現制御エレメント(例えば、プロモーター、エンハンサー)、イントロン、逆方向末端反復(ITR)、選択マーカー(例えば抗生物質耐性)、ポリアデニル化シグナル等のさらなるエレメントを含む。

【0140】

本明細書中で使用される場合、「遺伝子導入システム」という語は、核酸配列を含む組成物を細胞または組織に送達する任意の手段を指す。例えば、遺伝子導入システムは、所望の細胞または組織へのウイルスベクターの送達を容易にするためのウイルス遺伝子導入システム、例えば、インタクトウイルス、改変型ウイルスおよびVLPであり得る。遺伝子導入システムはまた、ウイルスコートタンパク質を含まない、またはウイルス粒子もしくはVLPを形成しない非ウイルス送達システム、例えば、リポソーム系のシステム、ポリマー系のシステム、タンパク質系のシステム、金属粒子系のシステム、ペプチドケージシステム等であり得る。

【0141】

ウイルスベクターは、ウイルスゲノムを含む1以上の核酸エレメントに由来するか、またはこれに基づく。特定のウイルスベクターとしては、レンチウイルスおよびアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターが挙げられるが、これらに限定されない。

【0142】

組換えAAV(rAAV)ベクター等のベクターの修飾因子としての「組換え」という語、ならびに組換えポリヌクレオチドおよびポリペプチド等の配列の修飾因子は、組成物が一般に自然界には存在しない様式で操作される(すなわち改変される)ことを意味する。「組換え」という語は、本明細書では、AAVベクター、ならびにポリヌクレオチド等の配列に関して必ずしも使用されないが、そのような省略にもかかわらず、ポリヌクレオチドを含む組換え形態は明示的に含まれる。

【0143】

「組換えAAVベクター」または「rAAV」は、分子法を用いてAAVゲノムから野生型ゲノムを除去し、ヘテロ核酸と称される非天然核酸配列で置換することにより、AAVの野生型ゲノムに由来する。典型的には、AAVについては、AAVゲノム的一方または両方の逆方向末端反復(ITR)配列は、AAVベクター中に保持される。rAAVは、AAVゲノムの全部または一部がAAVゲノム核酸に関して非天然配列で置き換えられているため、AAVゲノムと区別される。したがって、非天然配列の組み込みは、AAVベクターを「組換

10

20

30

40

50

え」ベクターと定義し、これは「rAAVベクター」と呼ぶことができる。

【0144】

rAAV配列は、細胞のその後のex vivo、in vitroまたはin vivoでの感染（形質導入）のためにパッケージングすることができ、本明細書では「粒子」という。組換えAAVベクター配列がAAV粒子中にカプシド化またはパッケージングされる場合、その粒子は「rAAVベクター」または「rAAV粒子」とも称され得る。このようなrAAV粒子は、ベクターゲノムをカプシド化またはパッケージングするタンパク質を含み、AAVの場合、それらはカプシドタンパク質と称される。

【0145】

ベクター「ゲノム」は、ウイルス（例えば、rAAV）粒子を形成するために最終的にパッケージングまたはカプシド化される組換えプラスミド配列の部分を目指す。組換えプラスミドが組換えベクターを構築または製造するために使用される場合、ベクターゲノムは、組換えプラスミドのベクターゲノム配列に対応しない「プラスミド」の部分を含まない。組換えプラスミドのこの非ベクターゲノム部分は、「プラスミド骨格」と称され得、プラスミドのクローニングおよび増幅、増殖および組換えウイルス産生に必要であるが、それ自体はウイルス（例えばAAV）粒子にパッケージングまたはカプシド化されないプロセスに重要である。したがって、ベクター「ゲノム」は、ウイルス（例えばAAV）によってパッケージングまたはカプシド化されたポリヌクレオチドを目指す。

10

【0146】

組換えAAV粒子を産生するための宿主細胞としては、微生物、酵母細胞、昆虫細胞、およびヘテロrAAVベクターのレシピエントとして使用され得るか、または使用されている哺乳動物細胞が挙げられるが、これらに限定されない。安定なヒト細胞株由来の細胞、HEK293（例えば、アクセッション番号ATCC CRL1573の下でアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションを通して容易に入手可能）が使用され得る。ある実施形態では、アデノウイルス5型DNA断片で形質転換され、アデノウイルスE1aおよびE1b遺伝子を発現する改変ヒト胎児腎臓細胞株（例えばHEK293）を使用して、組換えAAV粒子を生成する。改変されたHEK293細胞株は、容易にトランスフェクトされ、rAAV粒子を産生するための特に好都合なプラットフォームを提供する。組換えAAV産生に適切な他の宿主細胞株は、国際出願PCT/2017/024951に記載されており、その開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

20

30

【0147】

ある実施形態では、AAV発現ベクターのトランスフェクションの前に、または同時に、AAVヘルパーコンストラクトで宿主細胞をトランスフェクトすることによって、AAVヘルパー機能が宿主細胞に導入される。AAVヘルパー機能を有する宿主細胞は、「ヘルパー細胞」または「パッケージングヘルパー細胞」と称され得る。したがって、AAVヘルパーコンストラクトは、生産的AAV形質導入に必要な欠損AAV機能を補完するために、AAV repおよび/またはcap遺伝子の少なくとも一過性の発現を提供するために使用されることがある。AAVヘルパーコンストラクトは、しばしばAAV ITRを欠き、それ自体を複製することもパッケージングすることもできない。これらのコンストラクトは、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、ウイルス、またはビリオンの形態であり得る。RepおよびCap発現産物の両方をコードする、一般的に使用されるプラスミドpAAV/AdおよびpIM29+45等の多くのAAVヘルパーコンストラクトが記載されている。Repおよび/またはCap発現産物をコードする多くの他のベクターが知られている。

40

【0148】

哺乳動物細胞を形質導入することができるrAAV粒子を作製する方法は、当技術分野で公知である。例えば、rAAV粒子は、米国特許第9,408,904号；ならびに国際出願PCT/US2017/025396号およびPCT/US2016/064414号に記載されるように製造することができ、それらの開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0149】

本発明は、C1インヒビターをコードする核酸を含む細胞、C1インヒビターをコードす

50

る核酸を含むポリヌクレオチドを含む発現カセットを含む細胞、C1インヒビターをコードする核酸を含むAAVベクター等のウイルスベクターを含む細胞、およびC1インヒビターをコードする核酸を含むポリヌクレオチドを含む非ウイルスベクターを含む細胞を提供する。ある実施形態では、細胞はウイルスベクターを産生する。ある実施形態では、細胞は本明細書に記載のAAVベクターを産生する。

【0150】

本明細書に記載のAAVベクター等のウイルスベクターを産生する方法も提供される。ある実施形態では、AAVベクターを産生する方法は、本明細書に記載のC1インヒビターをコードする核酸を含むポリヌクレオチドを含むAAVベクターゲノムまたは本明細書に記載のC1インヒビターをコードする核酸を含むポリヌクレオチドを含む発現カセットをパッケージングヘルパー細胞に導入すること；およびAAVベクターを産生するための条件下でヘルパー細胞を培養することを含む。ある実施形態では、AAVベクターを産生する方法は、本明細書に記載のC1インヒビターをコードする核酸を含むポリヌクレオチドまたは本明細書に記載のC1インヒビターをコードする核酸を含むポリヌクレオチドを含む発現カセットを含むポリヌクレオチドをパッケージングヘルパー細胞に導入すること；およびAAVベクターを産生する条件下でヘルパー細胞を培養することを含む。

10

【0151】

ある実施形態では、細胞は哺乳動物細胞である。

【0152】

ある実施形態では、ベクター産生のための細胞は、AAVヘルパー機能等の、ベクターをウイルス粒子にパッケージングするヘルパー機能を提供する。ある実施形態では、ヘルパー機能は、AAVベクターパッケージングのためのRepおよび/またはCapタンパク質である。ある実施形態では、ベクター産生のための細胞は、Repおよび/またはCapタンパク質配列をコードするポリヌクレオチドで安定にまたは一時的にトランスフェクトされ得る。ある実施形態では、ベクター産生のための細胞は、Rep78および/またはRep68タンパク質を提供する。このような細胞において、細胞は、配列をコードするRep78および/またはRep68タンパク質ポリヌクレオチドで安定にまたは一過的にトランスフェクトされ得る。

20

【0153】

ある実施形態では、ベクター産生のための細胞は、ヒト胚性腎細胞である。ある実施形態では、ベクター産生のための細胞は、HEK-293細胞である。

30

【0154】

用語「形質導入する」およびその文法的変形例は、細胞または宿主生物にrAAVベクター等の分子を導入することを指す。ヘテロ核酸/導入遺伝子は、レシピエント細胞のゲノム核酸に組み込まれても組み込まれなくてもよい。導入されたヘテロ核酸はまた、染色体外で、または一時的にのみ、レシピエント細胞または宿主生物中に存在し得る。

【0155】

「形質導入細胞」は、導入遺伝子が導入された細胞である。したがって、「形質導入された」細胞（例えば、細胞または組織または臓器細胞等の哺乳動物における）は、例えば、核酸（例えば導入遺伝子）の細胞への組み込み後の細胞における遺伝的变化を意味する。したがって、「形質導入された」細胞は、外因性核酸が導入された細胞、またはその子孫である。細胞は増殖され、導入されたタンパク質を発現させ得る。遺伝子治療の使用および方法のために、形質導入された細胞は、対象中に存在し得る。

40

【0156】

「単離された」という語は、組成物の修飾因子として使用される場合、組成物がヒトの手によって作製されるか、またはそれらの天然に存在するin vivo環境から完全にもしくは少なくとも部分的に分離されることを意味する。一般に、単離された組成物は、それらが天然で通常会合する1つ以上の材料、例えば、1つ以上のタンパク質、核酸、脂質、炭水化物、細胞膜を実質的に含まない。

【0157】

50

「単離された」という語は、ヒトの手によって産生される組み合わせ、例えば、AAVベクターゲノムおよび医薬製剤をパッケージングまたはカプシド化するrAAV配列、またはrAAV粒子を除外しない。「単離された」という語はまた、ハイブリッド/キメラ、多量体/オリゴマー、修飾（例えば、リン酸化、グリコシル化、脂質化）もしくは誘導体化された形態、またはヒトの手によって産生される宿主細胞において発現される形態等の、組成物の代替の物理的形態を排除しない。

【0158】

「実質的に純粋な」という語は、の目的の化合物（例えば、核酸、オリゴヌクレオチド、タンパク質等）を少なくとも50～60重量%で含む調製物を指す。調製物は、目的の化合物を少なくとも75重量%、または少なくとも85重量%、または約90～99重量%で含

10

【0159】

組換えAAVベクター、ならびにその方法および使用は、任意のウイルス株または血清型を含む。非限定的な例として、組換えAAVベクターは、例えば、LK03、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh10、Rh74、AAV3BまたはAAV-2i8等の任意のAAVゲノムに基づき得る。このようなベクターは、同じ株もしくは血清型（またはサブグループもしくは変異体）に基づくか、または互いに異なってもよい。非限定的な例として、特定の血清型ゲノムに基づく組換えAAVベクターは、ベクターをパッケージングするカプシドタンパク質の血清型と同一であり得る。さらに、組換えAAVベクターゲノムは、ベクターをパッケージングするAAVカプシドタンパク質の血清型とは異なるAAV血清型ゲノムに基づき得る。例えば、AAVベクターゲノムは、AAV2に基づき得、一方、3つのカプシドタンパク質のうち少なくとも1つは、LK03、AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh10、Rh74、AAV3BもしくはAAV-2i8、またはこれらの変異体であり得る。

20

【0160】

ある実施形態では、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターとしては、LK03、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh10、Rh74、AAV3BおよびAAV-2i8、ならびに、例えば、WO 2013/158879号（RHM4-1、RHM15-1、RHM15-2、RHM15-3/RHM15-5、RHM15-4およびRHM15-6を開示する；国際出願PCT/US2013/037170）、WO 2015/013313号（国際出願PCT/US2014/047670号）、US2013/0059732号（LK01、LK02、LK03等を開示する米国特許第9,169,299号）、および国際公開第2016/210170号に記載されるようなそれらの変異体（例えば、アミノ酸の挿入、付加、置換および削除等のカプシド変異体）が挙げられ、これらの開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0161】

本明細書で使用される場合、「血清型」という語は、他のAAV血清型と血清学的に異なるカプシドを有するAAVを指すために使用される区別である。血清学的特徴は、別のAAVと比較した場合の、1つのAAVに対する抗体間の交差反応性の欠如に基づいて決定される。このような交差反応性の違いは、通常、カプシドタンパク質配列/抗原決定基の違いによる（例えば、AAV血清型のVP1、VP2、および/またはVP3配列の違いによる）。カプシド変異体を含むAAV変異体は、参照AAVまたは他のAAV血清型と血清学的に区別されない可能性があるにもかかわらず、参照または他のAAV血清型と比較して、少なくとも1つのヌクレオチドまたはアミノ酸残基が異なる。

40

【0162】

従来定義では、血清型は、目的のウイルスが中和活性について特徴付けられ、存在するすべての血清型に特異的な血清に対して試験され、目的のウイルスを中和する抗体は見出されていないことを意味する。より多くの天然に存在するウイルス単離物が発見され、

50

かつ/またはカプシド変異体が生成されるにつれて、現存する血清型のいずれかとの血清学的差異が存在する場合もあり、もしくは存在しない場合もあり得る。したがって、新しいウイルス（例えばAAV）が血清学的差異を有しない場合、この新しいウイルス（例えばAAV）は、対応する血清型のサブグループまたは変異体であろう。多くの場合、中和活性についての血清学的試験は、カプシド配列改変を有する変異ウイルスが血清型の従来の定義に従って別の血清型のものであるかどうかを決定するために、未だ実施されていない。したがって、便宜上、かつ重複を避けるために、用語「血清型」は、広義には、血清学的に異なるウイルス（例えばAAV）、ならびに所与の血清型のサブグループまたは変異体内にあり得る血清学的に区別されないウイルス（例えばAAV）の両方を指す。

【0163】

本明細書に記載されるように、AAVカプシドタンパク質は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh10、Rh74（配列番号：188）、AAV3B、LK03（配列番号：191）、AAV-2i8、配列番号：226、配列番号：189、および/または配列番号：190等のリファレンスもしくは親AAV血清型に対して100%未満の配列同一性を示し得るが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh10、Rh74（配列番号：188）、AAV3B、LK03（配列番号：191）、AAV-2i8、配列番号：226、配列番号：189、および/または配列番号：190等の公知のAAV遺伝子またはタンパク質とは同一ではないか、もしくは区別される。ある実施形態では、改変型/変異型AAVカプシドタンパク質は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh10、Rh74（配列番号：188）、AAV3B、LK03（配列番号：191）、AAV-2i8、配列番号：226、配列番号：189、および/または配列番号：190等のリファレンスもしくは親AAVカプシドタンパク質に対して少なくとも80%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%等、99.9%までの同一の配列を含むか、またはそれからなる。

【0164】

ある実施形態では、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター等のウイルスベクターは、発現制御エレメントに作動可能に連結された本明細書に記載のC1インヒビターをコードする核酸を含むポリヌクレオチドのいずれかを含む。

【0165】

ある実施形態では、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター等のウイルスベクターは、本明細書に記載のC1インヒビターをコードする核酸を含むポリヌクレオチドを含む発現カセットのいずれかを含む。

【0166】

ある実施形態では、AAVベクターは、AAVカプシドのうちの1以上と、AAV ITRがポリヌクレオチドまたは発現カセットの5'末端または3'末端に隣接する1以上のAAV逆方向末端反復（ITR）とを含む。

【0167】

ある実施形態では、AAVベクターは、1以上のITRの5'または3'に位置するイントロンをさらに含む。

【0168】

ある実施形態では、少なくとも1つ以上のITRまたはイントロンを含むAAVベクターは、減少したCpGを有するように改変された1つ以上のITRまたはイントロンを有する。

【0169】

ある実施形態では、本発明は、

(1) 5' AAV ITRであって、場合によりAAV2の5' ITRであり、場合により配列番号：70または72のポリヌクレオチド配列を含む5' ITRである、5' AAV ITR；

(2) 1以上のエンハンサーであって、場合により、配列番号：225、74～78お

10

20

30

40

50

よび173～178からなる群から選択されるポリヌクレオチド配列を有する1以上のエンハンサーである、エンハンサー；

(3) 1以上の5' UTRであって、場合により、配列番号：180および183からなる群から選択されるポリヌクレオチド配列を有する1以上の5' UTRである、5' UTR；

(4) 場合により、イントロン、場合により、配列番号：81または82のポリヌクレオチド配列を有するイントロン；

(5) シグナルペプチドをコードする核酸であって、場合により、配列番号：203～218からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードする核酸、場合により、配列番号：84～103からなる群から選択されるポリヌクレオチド配列を含むシグナルペプチドをコードする核酸である、核酸；

(6) C1インヒビター、変異体C1インヒビター、およびこれらの融合体または組合せのうちの少なくとも1つをコードする核酸であって、

a. 場合により、配列番号：181または192のアミノ酸配列を有するC1インヒビターであり、場合により、配列番号：104～142、145～147、156、および171～172からなる群から選択されるポリヌクレオチド配列であり；

b. 場合により、配列番号：193～201からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する変異体C1インヒビターであり、場合により、配列番号：143～144、158、および165～170からなる群から選択されるポリヌクレオチドである、核酸；

(7) 1以上の3' UTRであって、場合により、配列番号：83または184のポリヌクレオチド配列を有する1以上の3' UTRである、3' UTR；

(8) 場合により、miRNA結合部位、場合により、配列番号：179のポリヌクレオチド配列を有するmiRNA結合部位；

(9) 場合により、制御されたIre1依存性崩壊(RIDD)配列であって、場合により、配列番号：185～187からなる群から選択されるポリヌクレオチド配列を有するRIDDである、RIDD；ならびに

(10) 3' AAV ITRであって、場合により、AAV2の3' ITRであり、場合により、配列番号：71または73のポリヌクレオチド配列を含む3' ITRである、3' AAV ITRを含むAAVベクターに関する。

#### 【0170】

ある実施形態では、AAVベクターは、C1インヒビターをコードする核酸を含むポリヌクレオチドを含み、核酸は、C1インヒビターの野生型コード配列と比較してCpGが減少したものであり、ポリヌクレオチドは、配列番号：226のVP1を含むカプシドによってカプシド化されている。ある実施形態では、カプシドは、配列番号：226のVP1、配列番号：189のVP2、および配列番号：190のVP3を含む。ある実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号：22に対して少なくとも99%同一である核酸配列を含むが、但し、核酸配列は配列番号：192をコードする。ある実施形態では、核酸配列は配列番号：22を含む。ある実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号：22に対して少なくとも99%または100%同一である核酸配列を含み、カプシドは配列番号：226のVP1を含む。ある実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号：22に対して少なくとも99%または100%同一である核酸配列を含み、カプシドは配列番号：226のVP1、配列番号：189のVP2、および配列番号：190のVP3を含む。

#### 【0171】

ある実施形態では、本発明のAAVベクターは、例えば、脂質ナノ粒子(LNP)に封入されたものを含む、非ウイルス送達システムを介して送達される。

#### 【0172】

##### 非ウイルス方法

ある実施形態では、本発明のポリヌクレオチドおよび発現カセットは、非ウイルス送達システムと共に送達または投与される。非ウイルス送達システムには、例えば、非ウイルスベクター、または細胞外小胞等の化学的方法、ならびに遺伝子銃、エレクトロポレーション、粒子衝撃、超音波利用、および磁気切断等の物理的方法が含まれる。

10

20

30

40

50

## 【0173】

本発明のC1インヒビター配列を発現することができる組換え細胞は、送達または投与のために使用され得る。

## 【0174】

ミニサークルおよびトランスポゾン等の裸のDNAは、投与または送達またはレンチウイルスベクターに使用され得る。さらに、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、TALEN、およびCRISPR等の遺伝子編集技術も、本発明のコード配列を送達するために使用され得る。

## 【0175】

ある実施形態では、本発明のポリヌクレオチドおよび発現カセットは、閉鎖末端直鎖二本鎖DNAの裸のDNA、ミニサークル、トランスポゾンとして送達される。 10

## 【0176】

ある実施形態では、本発明のポリヌクレオチドおよび発現カセットは、リポソーム、ナノ粒子、脂質ナノ粒子、ポリマー、微粒子、マイクロカプセル、ミセル、または細胞外小胞とさらに封入または複合体化されたAAVベクター粒子または他のウイルス粒子中で送達または投与される。

## 【0177】

ある実施形態では、本発明のポリヌクレオチドおよび発現カセットは、非ウイルスベクターと共に送達または投与される。

## 【0178】

本明細書で使用される場合、「非ウイルスベクター」は、ウイルス粒子またはウイルス様粒子(VLP)によって送達されないベクターを指す。ある実施形態によれば、非ウイルスベクターは、カプシドによって送達されないベクターである。ベクターは、非ウイルス送達粒子またはナノ粒子に封入、混合、または他の方法で会合され得る。 20

## 【0179】

本開示を考慮して、当業者に公知の任意の好適な非ウイルス送達系を本発明において使用することができる。非ウイルス送達粒子またはナノ粒子は、例えば、脂質系ナノ粒子、ポリマー系ナノ粒子、タンパク質系ナノ粒子、微粒子、マイクロカプセル、金属粒子系ナノ粒子、ペプチドケージナノ粒子等であり得る。

## 【0180】

本発明の非ウイルス送達粒子またはナノ粒子は、当技術分野で公知の任意の方法によって構築され得、治療的導入遺伝子を含む核酸分子を含む本発明の非ウイルスベクターは、当技術分野で公知の任意の方法によって構築され得る。 30

## 【0181】

## 脂質系送達システム

脂質系送達システムは、当技術分野において周知であり、本開示を考慮して、当業者に公知の任意の好適な脂質系送達システムを本発明において使用することができる。脂質系送達システムの例としては、例えば、リポソーム、脂質ナノ粒子、ミセル、または細胞外小胞が挙げられる。

## 【0182】

「脂質ナノ粒子」または「LNP」は、ナノスケール、すなわち、約10~約1000 nm、または約50~約500 nm、または約75~約127 nmのサイズを有する、AAVおよび非ウイルスベクターの送達に有用な脂質系小胞を指す。理論に束縛されるものではないが、LNPは、免疫系からの部分的または完全な遮蔽を有するポリヌクレオチド、発現カセット、AAVベクター、または非ウイルスベクターを提供すると考えられる。遮蔽は、組織または細胞へのポリヌクレオチド、発現カセット、AAVベクター、または非ウイルスベクターの送達を可能にし、一方、*in vivo*でポリヌクレオチド、発現カセット、AAVベクター、または非ウイルスベクターに対する実質的な免疫応答を誘導することを回避する。遮蔽はまた、*in vivo*で(例えば、ヒト等の対象において)、ポリヌクレオチド、発現ベクター、AAVベクター、または非ウイルスベクターに対する実質的な免疫応答を誘導 40

10

20

30

40

50

することなく、反復投与を可能にし得る。遮蔽はまた、in vivoで、ポリヌクレオチド、発現カセット、AAVベクター、または非ウイルスベクター送達効率を改善し、または増加させ得る。

【0183】

AAVの等電点(pI)は、約6~約6.5のpH範囲にある。したがって、AAV表面は、わずかな負電荷を有する。したがって、例えば、LNPがアミノ脂質等のカチオン性脂質を含むことが有益であり得る。例示的なアミノ脂質は、米国特許第9,352,042号、第9,220,683号、第9,186,325号、第9,139,554号、第9,126,966号、第9,018,187号、第8,999,351号、第8,722,082号、第8,642,076号、第8,569,256号、第8,466,122号、第7,745,651号および米国特許公報第2016/0213785号、第2016/0199485号、第2015/0265708号、第2014/0288146号、第2013/0123338号、第2013/0116307号、第2013/0064894号、第2012/0172411号、および第2010/0117125号に記載されており、それらの開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0184】

「カチオン性脂質」および「アミノ脂質」という語は、本明細書において互換的に使用され、1、2、3、またはそれ以上の脂肪酸または脂肪アルキル鎖およびpH滴定可能なアミノ基(例えば、アルキルアミノ基またはジアルキルアミノ基)を有する脂質およびその塩を含む。カチオン性脂質は、典型的には、カチオン性脂質のpKa未満のpHでプロトン化(すなわち、正に帯電)され、そのpKaを超えるpHで実質的に中性である。カチオン性脂質は、滴定可能なカチオン性脂質であり得る。ある実施形態では、カチオン性脂質は、プロトン化可能な第三級アミノ基(例えば、pH滴定可能な);各アルキル鎖が独立して、0~3個(例えば、0個、1個、2個、または3個)の二重結合を有するC18アルキル鎖;および頭部基とアルキル鎖との間のエーテル、エステル、またはケタール結合を含む。

20

【0185】

カチオン性脂質としては、1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン(DLinDMA)、1,2-ジリノレニルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン(g-DLenDMA)、1,2-ジ-y-リノレニルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン(g-DLenDMA)、2,2-ジリノレイル-4-(2-ジメチルアミノエチル)-[1,3]-ジオキソラン(DLin-K-C2-DMA、DLin-C2K-DMA、XTC2、およびC2Kとしても知られる)、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノメチル-[1,3]-ジオキソラン(DLin-K-DMA)、ジリノレイルメチル-3-ジメチルアミノプロピオネート(M-C2-DMA、MC2としても知られる)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル4-(ジメチルアミノ)ブタノエート(DLin-M-C3-DMA、MC3としても知られる)、これらの塩、およびこれらの混合物が挙げられるが、限定されない。他のカチオン性脂質としてはまた、1,2-ジステアリルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン(DSDMA)、1,2-ジオレイルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン(DODMA)、2,2-ジリノレイル-4-(3-ジメチルアミノプロピル)-[1,3]-ジオキソラン(DLin-K-C3-DMA)、2,2-ジリノレイル-4-(3-ジメチルアミノブチル)-[1,3]-ジオキソラン(DLin-K-C4-DMA)、DLin-C2K-DMA、y-DLen-C2K-DMA、および(DLin-MP-DMA)(1-B11としても知られる)が挙げられるが、限定されない。

30

40

【0186】

さらに別のカチオン性脂質としては、2,2-ジリノレイル-5-ジメチルアミノメチル-[1,3]-ジオキサソラン(DLin-K6-DMA)、2,2-ジリノレイル-4-N-メチルペピアジノ-[1,3]-ジオキソラン(DLin-K-MPZ)、1,2-ジリノレイルカルバモイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン(DLin-C-DAP)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-(ジメチルアミノ)アセトキシプロパン(DLin-DAC)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-モルフォリノプロパン(DLin-MA)、1,2-ジリノレイル-3-ジメチルアミノプロパン(DLinDAP)、1,2-ジリノレイルチオ-3-ジメチルアミノプロパン(DLin-S-DMA)、1-リノレイル-2-リノレイルオ

50

キシ-3-ジメチルアミノプロパン (DLin-2-DMAP)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-トリメチルアミノプロパンクロリド塩 (DLin-TMA.Cl)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-(N-メチルピペラジノ)プロパン (DLin-MPZ)、3-(N,N-ジリノレイルアミノ)-1,2-プロパンジオール (DLinAP)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-(2-N,N-ジメチルアミノ)エトキシプロパン (DLin-EG-DMA)、N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド (DODAC)、N-(1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA)、N,N-ジステアрил-N,N-ジメチルアンモニウムブロミド (DDAB)、N-(1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTAP)、3-(N(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル)コレステロール (DC-Chol)、N-(1,2-ジミリスチルオキシプロパ-3-イル)-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド (DMRIE)、2,3-ジオレイルオキシ-N-[2(スペルミン-カルボキシアミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパンアミニウムトリフルオロアセテート (DOSPA)、2,3-ジオレイルオキシ-N-プロパンアミド-1-プロパンアミドグリシルスペルミン (DOGS)、3-ジメチルアミノ-2-(コレスト-5-エン-4-オキシ)-1-(シス,9,12-オクタデカジエノキシ)プロパン (CLinDMA)、2-[5'-(コレスト-5-エン-3-オキシ)-3'-オキサペントキシ]-3-ジメチル-1-(シス,シス-9',1-2'-オクタデカジエノキシ)プロパン (CpLinDMA)、N,N-ジメチル-3,4-ジオレイルオキシベンジルアミン (DMOBA)、1,2-N,N'-ジオレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン (DOcarbDAP)、1,2-N'-ジリノレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン (DLincarbDAP)、デキサメタゾン-スペルミン (DS) および二置換スペルミン (D2S) またはこれらの混合物が挙げられるが、限定されない。

10

20

## 【0187】

LIPOFECTIN (登録商標) (GIBCO/BRLから入手可能なDOTMAおよびDOPEを含む)、およびLIPOFECT AMINE (登録商標) (GIBCO/BRLから入手可能なDOSPAおよびDOPEを含む)等のカチオン性脂質の多数の市販の調製物を使用することができる。

## 【0188】

ある実施形態では、カチオン性脂質は、LNPの約10重量%~脂質ナノ粒子の約85重量%、またはLNPの約50重量%~LNPの約75重量%の量で存在し得る。

## 【0189】

ステロールは、LNPに流動性を与え得る。本明細書で使用される場合、「ステロール」は、植物起源(フィトステロール)または動物起源(ズーステロール)の任意の天然に存在するステロール、ならびに非天然に存在する合成ステロールを指し、これらは全て、ステロイドA環の3位のヒドロキシル基の存在を特徴とする。ステロールは、リボソーム、脂質小胞または脂質粒子調製物の分野で従来使用されている任意のステロール、最も一般的にはコレステロールであり得る。フィトステロールには、カンベステロール、シトステロール、およびスチグマステロールが含まれ得る。ステロールはまた、米国特許出願公開第2011/0177156号に記載されるもの等のステロール修飾脂質を含み、その開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。ある実施形態では、ステロールは、LNPの約5重量%~脂質ナノ粒子の約50重量%、またはLNPの約10重量%~LNPの約25重量%の量で存在し得る。

30

40

## 【0190】

LNPは、中性脂質を含み得る。中性脂質は、生理学的pHで非荷電または中性双性イオン形態のいずれかで存在する任意の脂質種を含み得る。そのような脂質としては、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、セラミド、スフィンゴミエリン、ジヒドロスフィンゴミエリン、セファリン、およびセレブロシドが挙げられるが、限定されない。中性脂質の選択は、一般的に、とりわけ、粒径および必要な安定性を考慮することによって導かれる。ある実施形態では、中性脂質成分は、2つのアシル基を有する脂質(例えば、ジアシルホスファチジルコリンおよびジアシルホスファチジルエタノールアミン)であり得る。

50

## 【0191】

様々な鎖長および飽和度の様々なアシル鎖基を有する脂質が利用可能であるか、または周知の技術によって単離もしくは合成され得る。ある実施形態では、C14～C22の範囲の炭素鎖長を有する飽和脂肪酸を含有する脂質が使用され得る。ある実施形態では、C14～C22の範囲の炭素鎖長を有するモノまたはジ不飽和脂肪酸を有する脂質が使用される。さらに、飽和および不飽和脂肪酸鎖の混合物を有する脂質が使用され得る。例示的な中性脂質としては、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルエタノールアミン(DOPE)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(POPC)、または任意の関連ホスファチジルコリンが挙げられるが、限定されない。中性脂質はまた、スフィンゴミエリン、ジヒドロスフィンゴミエリン、またはセリンおよびイノシトール等の他の頭部基を有するリン脂質から構成され得る。

10

## 【0192】

ある実施形態では、中性脂質は、脂質ナノ粒子の約0.1重量%～LNPの約75重量%、またはLNPの約5重量%～LNPの約15重量%の量で存在し得る。

## 【0193】

LNP封入核酸、発現カセット、AAVベクター、および非ウイルスベクターは、医薬組成物、例えば、薬学的に許容される担体または賦形剤に組み込まれ得る。このような医薬組成物は、とりわけ、LNP封入酸、発現カセット、AAVベクター、および非ウイルスベクターの、*in vivo*または*ex vivo*での対象への投与および送達に有用である。

20

## 【0194】

LNPの調製物は、さらなる成分と組み合わせられ得る。非限定的な例としては、ポリエチレングリコール(PEG)およびステロールが挙げられる。

## 【0195】

「PEG」という語は、2つの末端ヒドロキシル基を有するエチレンPEG繰り返し単位の直鎖状水溶性ポリマーであるポリエチレングリコールを指す。PEGはその分子量によって分類され、例えば、PEG 2,000は約2,000ダルトンの平均分子量を有し、PEG 5,000は約5,000ダルトンの平均分子量を有する。PEGはSigma Chemical Co. および他の会社から市販されており、例えば、以下の官能基PEGが含まれる：モノメトキシポリエチレングリコール(MePEG-OH)、モノメトキシポリエチレングリコールコハク酸エステル(MePEG-S)、モノメトキシポリエチレングリコールコハク酸スクシンイミジル(MePEG-S-NHS)、モノメトキシポリエチレングリコールアミン(MePEG-NH<sub>2</sub>)、モノメトキシポリエチレングリコールトレシレート(MePEG-TRES)、およびモノメトキシポリエチレングリコールイミダゾリルカルボニル(MePEG-IM)。

30

## 【0196】

ある実施形態では、PEGは、約550～約1万ダルトンの平均分子量を有するポリエチレングリコールであり得、アルキル、アルコキシ、アシルまたはアリールによって任意に置換されている。ある実施形態では、PEGは、末端ヒドロキシル位置にてメチルで置換され得る。ある実施形態では、PEGは、約750～約5,000ダルトン、または約1,000～約5,000ダルトン、または約1,500～約3,000ダルトン、または約2,000ダルトン、または約750ダルトンの平均分子量を有し得る。PEGは、アルキル、アルコキシ基、アシルまたはアリールで置換され得る。ある実施形態では、末端ヒドロキシル基は、メトキシ基またはメチル基で置換され得る。

40

## 【0197】

PEG修飾脂質は、米国特許第8,936,942号および第7,803,397号に記載されるPEG-ジアルキルオキシプロピルコンジュゲート(PEG-DAA)を含み、これらの開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。有用なPEG修飾脂質(または脂質ポリオキシエチレンコンジュゲート)は、PEG部分を脂質小胞の表面に固定するための様々な「アンカー」脂質部分を有し得る。好適なPEG修飾脂質の例としては、PEG修飾されたホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジン酸、PEG-セラミドコンジュゲ

50

ート（例えば、PEG - CerC14またはPEG - CerC20）（これらは米国特許第5,820,873号に記載されており、その開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる）、PEG修飾ジアルキルアミンおよびPEG修飾1,2-ジアシルオキシプロパン-3-アミンが挙げられる。ある実施形態では、PEG修飾脂質は、PEG修飾されたジアシルグリセロールおよびジアルキルグリセロールであり得る。ある実施形態では、PEGは、LNPの約0.5重量% ~ LNPの約20重量%、またはLNPの約5重量% ~ LNPの約15重量%の量であり得る。

#### 【0198】

さらに、LNPは、PEG修飾LNPおよびステロール修飾LNPであり得る。LNPは、さらなる成分と組み合わせられて、同じまたは別個のLNPであり得る。言い換えると、同じLNPはPEG修飾またはステロール修飾されたものであり得、あるいは、第1のLNPをPEG修飾し、第2のLNPをステロール修飾し得る。場合により、第1および第2の修飾LNPは組み合わせられ得る。

10

#### 【0199】

ある実施形態では、封入前のLNPは、約10 nm ~ 500 nm、または約50 nm ~ 約200 nm、または75 nm ~ 約125 nmの範囲のサイズを有し得る。ある実施形態では、LNP封入核酸、発現ベクター、AAVベクター、または非ウイルスベクターは、約10 nm ~ 500 nmの範囲のサイズを有し得る。

#### 【0200】

##### ポリマー系システム

ポリマー系送達システムは、当技術分野において周知であり、本開示を考慮して、当業者に公知の任意の好適なポリマー系送達システムまたはポリマーナノ粒子を本発明において使用することができる。DNAは、ポリマーナノ粒子のポリマーマトリックス中に捕捉され得るか、またはナノ粒子の表面上に吸着もしくはコンジュゲートされ得る。遺伝子送達のために一般に使用されるポリマーの例としては、例えば、ポリ（乳酸-co-グリコール酸）（PLGA）、ポリ乳酸（PLA）、ポリ（エチレンイミン）（PEI）、キトサン、デンドリマー、ポリ無水物、ポリカプロラクトン、およびポリメタクリレートが挙げられる。

20

#### 【0201】

ポリマー系非ウイルスベクターは、約1 nm ~ 約1000 nm、場合により約10 nm ~ 約500 nm、場合により約50 nm ~ 約200 nm、場合により約100 nm ~ 約150 nm、場合により約150 nm以下の範囲の様々なサイズを有し得る。

30

#### 【0202】

##### タンパク質系システム

タンパク質系送達システムは当技術分野において周知であり、本開示を考慮して、当業者に公知の任意の好適なタンパク質系送達システムまたは細胞透過性ペプチド（CPP）を本発明において使用することができる。

#### 【0203】

CPPは、治療用分子を送達するための潜在的に細胞内透過が可能である短いペプチド（6 ~ 30アミノ酸残基）である。CPPの大部分は、主にアルギニンおよびリシン残基からなり、それらをカチオン性および親水性にするが、CPPはまた、両親媒性、アニオン性、または疎水性であり得る。CPPは、天然の生体分子（例えば、Tat、HIV-1タンパク質）に由来するか、または合成法（例えば、ポリ-L-リジン、ポリアルギニン）によって得ることができる（Singh et al., Drug Deliv. 2018;25(1):1996-2006）。CPPの例としては、例えば、カチオン性CPP（高度に正に荷電した）（例えば、Tatペプチド、ペネトラチン、プロタミン、ポリ-L-リシン、ポリアルギニン等）；両親媒性CPP（様々な供給源から構築されたキメラまたは融合ペプチドは正および負に荷電したアミノ酸配列の両方を含む）（例えば、トランスポートタン、VT5、バクテネシン-7（Bac7）、プロリンリッチペプチド（PPR）、SAP（VRLPP）3、TP10、pep-1、MPG等）；膜親和性CPP（疎水性および両親媒性の両方を同時に示し、大きな芳香族残基および小さな残基の両方を含む）（例えば、gH625、SPION-PEG-CPP NP等）；ならびに疎水性

40

50

CPP（非極性モチーフまたは残基のみを含む）（例えば、SG3、PFVYLI、pep-7、線維芽細胞増殖因子（FGF）等）が挙げられる。

【0204】

タンパク質系非ウイルスベクターは、約1 nm～約1000 nm、場合により約10 nm～約500 nm、場合により約50 nm～約200 nm、場合により約100 nm～約150 nm、場合により約150 nm以下の範囲の様々なサイズを有し得る。

【0205】

ペプチドケージシステム

ペプチドケージ系送達システムは当技術分野で周知であり、本開示を考慮して、当業者に公知の任意の好適なペプチドケージベースの送達システムを本発明で使用する事ができる。一般に、拘束された内部環境を形成するケージ様構造に組み立てることができる任意のタンパク質性材料を使用することができる。いくつかの異なる種類のタンパク質「シェル」を組み立て、異なる種類の材料が装填され得る。例えば、非ウイルス性材料を封入するウイルス性コートタンパク質（例えば、ササゲクロロティックモトルウイルス（Cowpea Chlorotic Mottle Virus）（CCMV）タンパク質コート由来）のシェルを含むタンパク質ケージ、ならびに非ウイルス性タンパク質から形成されるタンパク質ケージが記載されている（例えば、米国特許第6,180,389号および第6,984,386号、米国特許出願第20040028694号、ならびに米国特許出願第20090035389号を参照、これらの開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。ペプチドケージは、タンパク質ケージを形成するように自己集合するタンパク質性シェル（例えば、溶媒に自然に接近可能であるか、または溶媒濃度、pH、平衡比を変更することによってそのようにし得る内部空洞を有する構造）を含み得る。

10

20

【0206】

非ウイルスタンパク質に由来するタンパク質ケージの例としては、例えば、真核生物種および原核生物種の両方に由来するフェリチンおよびアポフェリチン、例えば、12および24サブユニットフェリチン；ならびに熱ショックタンパク質（HSP）、例えば、内部コア空間を形成する24サブユニット熱ショックタンパク質のクラス、メタノカルドコックス・ヤナスキイ（*Methanococcus jannaschii*）の小HSP、大腸菌のドデカメリックDps HSP、MrgAタンパク質から形成されるタンパク質ケージ等が挙げられる。当業者によって理解されるように、タンパク質ケージのモノマーは、天然に存在するか、または作製され得るアミノ酸置換、挿入および欠失（例えば断片）を含む変異型であり得る。

30

【0207】

タンパク質ケージは、約1 nm～約1000 nm、場合により約10 nm～約500 nm、場合により約50 nm～約200 nm、場合により約100 nm～約150 nm、場合により約150 nm以下の範囲の異なるコアサイズを有し得る。

【0208】

医薬組成物

本発明は、C1インヒビターをコードする核酸を含むポリヌクレオチドのいずれかを含む医薬組成物、C1インヒビターをコードする核酸を含むポリヌクレオチドを含む発現カセット、C1インヒビターをコードする核酸を含むポリヌクレオチドを含むAAVベクター等のウイルスベクター、または本明細書に記載のC1インヒビターをコードする核酸を含むポリヌクレオチドを含む非ウイルスベクターをさらに提供する。

40

【0209】

rAAVベクターおよび非ウイルスベクターは、生物学的に適合性を有する担体中への注入を介して、例えば静脈内注射を介して、患者に投与され得る。rAAVベクターおよび非ウイルスベクターは、単独で、または他の分子と組み合わせて投与され得る。したがって、rAAVベクターおよび非ウイルスベクターならびに他の組成物、薬剤、薬物、生物製剤（タンパク質）が医薬組成物に組み込まれ得る。このような医薬組成物は、とりわけ、*in vivo*または*ex vivo*での対象への投与および送達に有用である。

50

## 【0210】

ある実施形態では、医薬組成物はまた、薬学的に許容される担体または賦形剤を含有する。そのような賦形剤には、それ自体は組成物を受容する個体に有害な免疫反応を誘導せず、過度の毒性なしに投与され得る任意の医薬剤が含まれる。

## 【0211】

本明細書で使用される場合、用語「薬学的に許容される」および「生理学的に許容される」は、生物学的に許容される製剤、気体、液体、もしくは固体、またはこれらの混合物を意味し、これは、1つ以上の投与経路、*in vivo*送達、または接触に適している。「薬学的に許容される」または「生理学的に許容される」組成物は、生物学的にまたは他の点で望ましくないものではない材料であり、例えば、この材料は、実質的に望ましくない生物学的効果を引き起こすことなく対象に投与され得る。したがって、そのような医薬組成物は、例えば、ポリヌクレオチド、ベクター、ウイルス粒子またはタンパク質を対象に投与するのに使用され得る。

10

## 【0212】

薬学的に許容される賦形剤としては、水、生理食塩水、グリセロール、糖およびエタノール等の液体が挙げられるが、これらに限定されない。薬学的に許容される塩には、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩等の鉱酸塩；および酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩等の有機酸の塩も含まれ得る。賦形剤には、アルブミン等のタンパク質も含まれる。

## 【0213】

さらに、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝物質等の補助物質が、そのようなビヒクル中に存在し得る。

20

## 【0214】

医薬組成物は、塩として提供され得、塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸等を含むがこれらに限定されない多くの酸で形成され得る。塩は、水溶液または他のプロトン性溶媒中で、対応する遊離塩基形態よりも可溶性である傾向がある。他の場合には、調製物は、以下のいずれかまたはすべてを含有し得る凍結乾燥粉末であり得る：4.5~5.5のpH範囲で、使用前に緩衝液と組み合わせられる、1~50 mMヒスチジン、0.1~2%スクロース、および2~7%マンニトール。

## 【0215】

医薬組成物は、溶媒（水性または非水性）、溶液（水性または非水性）、エマルジョン（例えば、水中油型または油中水型）、懸濁液、シロップ、エリキシル、分散および懸濁媒体、コーティング、等張化剤および吸収促進剤または遅延剤を含み、医薬投与または*in vivo*接触または送達に適合する。水性および非水性溶媒、溶液および懸濁液は、懸濁化剤および増粘剤を含み得る。そのような薬学的に許容される担体には、錠剤（被覆または非被覆）、カプセル剤（硬または軟質）、マイクロビーズ、粉末、顆粒および結晶が含まれる。補助的な活性化合物（例えば、防腐剤、抗細菌剤、抗ウイルス剤および抗真菌剤）もまた、組成物に組み込まれ得る。

30

## 【0216】

医薬組成物は、本明細書に記載されているか、または当業者に知られているように、特定の投与経路または送達経路に適合するように製剤化され得る。したがって、医薬組成物は、様々な経路による投与に適した担体、希釈剤、または賦形剤を含む。

40

## 【0217】

非経口投与に適した組成物は、活性化合物の水性および非水性溶液、懸濁液またはエマルジョンを含み、これらの調製物は、典型的には無菌であり、意図されるレシピエントの血液と等張であり得る。非限定的な例としては、水、緩衝食塩水、ハanks液、リングル液、デキストロース、フルクトース、エタノール、動物性油、植物油または合成油が挙げられる。水性注射懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストラン等の、懸濁液の粘度を増加させる物質を含有し得る。

## 【0218】

50

さらに、活性化合物の懸濁液は、適切な油注射懸濁液として調製され得る。好適な親油性溶媒またはビヒクルには、ゴマ油等の脂肪油、またはオレイン酸エチルまたはトリグリセリド等の合成脂肪酸エステル、またはリポソームが包含される。場合により、懸濁液は、高濃度溶液の調製を可能にするために、化合物の溶解度を増加させる適切な安定剤または薬剤を含有し得る。

【0219】

共溶媒およびアジュバントが製剤に添加され得る。共溶媒の非限定的な例としては、ヒドロキシル基または他の極性基、例えば、イソプロピルアルコール等のアルコール；プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、グリコールエーテル等のグリコール；グリセロール；ポリオキシエチレンアルコールおよびポリオキシエチレン脂肪酸エステルが挙げられる。アジュバントとしては、例えば、大豆レシチンおよびオレイン酸等の界面活性剤；トリオレイン酸ソルピタン等のソルピタンエステル；ならびにポリビニルピロリドンが挙げられる。

10

【0220】

ある実施形態では、本明細書に記載のAAVベクターのいずれかを含む医薬組成物は、空のAAVカプシドをさらに含む。ある実施形態では、AAVベクターおよび空のAAVカプシドを含む医薬組成物において、空のAAVカプシド対AAVベクターの比は、約100:1~50:1、約50:1~25:1、約25:1~10:1、約10:1~1:1、約1:1~1:10、約1:10~1:25、約1:25~1:50、または約1:50~1:100の範囲内またはその中間である。ある実施形態では、AAVベクターおよび空のAAVカプシドを含む医薬組成物において、空のAAVカプシド対AAVベクターの比は、約2:1、約3:1、約4:1、約5:1、約6:1、約7:1、約8:1、約9:1、または約10:1である。

20

【0221】

ある実施形態では、医薬組成物は界面活性剤を含む。

【0222】

医薬組成物が調製された後、それらを適切な容器に入れ、治療のためにラベルすることができる。そのようなラベルは、投与の量、頻度、および方法を含み得る。

【0223】

本発明の組成物、方法および使用に適した送達システムは、当技術分野において公知である（例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2003) 20th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA; Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA; The Merck Index (1996) 12th ed., Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ; Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms (1993), Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa.; Ansel and Stoklosa, Pharmaceutical Calculations (2001) 11th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD; およびPoznansky et al., Drug Delivery Systems (1980), R. L. Juliano, ed., Oxford, N.Y., pp. 253-315を参照）。

30

【0224】

「有効量」または「十分量」は、単回または複数回の用量で、単独で、または1つ以上の他の組成物（薬物等の治療剤または免疫抑制剤）、治療、プロトコール、または治療剤と組み合わせて、任意の期間（長期または短期）の検出可能な応答、任意の測定可能なまたは検出可能な程度の対象における予測されるまたは所望の結果、または任意の期間（例えば、数分間、数時間、数日、数ヶ月、数年、または治療される）の対象に対する利益を提供する量を指す。

40

【0225】

医薬組成等の組成物は、コードされたタンパク質の産生を可能にするように、対象に送達され得る。ある実施形態では、医薬組成物は、レシピエントが対象において治療的有效量のタンパク質を産生することを可能にするのに十分な遺伝物質を含む。

【0226】

50

「治療的有効量」とは、対象において所望の生物学的または医学的応答を誘発する活性成分または成分の量を指す。治療的有効量は、記載された目的に関連して、経験的に、かつ日常的な方法で決定され得る。例えば、最適な投薬量範囲を同定するのを助けるために、*in vitro*アッセイが必要に応じて使用され得る。特定の有効量の選択は、治療または予防される疾患、関与する症状、患者の体重、患者の免疫状態、および当業者に公知の他の因子を含むいくつかの因子の考慮に基づいて、当業者によって（例えば、臨床試験を介して）、決定され得る。製剤に使用される正確な用量はまた、投与経路、および疾患の重症度に依存し、医師の判断および各患者の状況に従って決定されるべきである。有効用量は、*in vitro*または動物モデル試験系から得られる用量反応曲線から推定され得る。

【0227】

10

組成物は、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、および水を含むが、これらに限定されない、任意の無菌の生体適合性医薬担体中で製剤化かつ/または投与され得る。組成物は、単独で、または止血に影響を及ぼす他の薬剤（例えば補助因子）と組み合わせて、患者に製剤化かつ/または投与され得る。

【0228】

治療方法

C1-INH補充療法を用いたHAE治療は、生存率を増加させ、イベント頻度および重症度を低減させ、HAE疾患患者の現在の標準治療である。しかしながら、現在の治療モダリティは、ブレイクスルー攻撃の潜在、安全性/認容性、高額患者負担、および制限されたコンプライアンスの潜在等、いくつかの欠点を有する。HAE遺伝子導入処置は、好ましくはC1-INH補充療法に対するこれらの欠点の1つ以上を克服する。例えば、本明細書に記載されるHAE遺伝子導入処置においては、必要とされる頻度の投薬はより少ないことが予想され、好ましくは単回投薬で十分である。

20

【0229】

本発明はさらに、C1インヒビターを必要とする対象を治療する方法であって、治療的有効量の本発明のポリヌクレオチド、発現カセット、AAVベクター、非ウイルスベクター、または医薬組成物を対象に投与することを含み、C1インヒビターが対象において発現される方法を提供する。

【0230】

本発明の方法および使用は、分裂細胞および/または非分裂細胞を含む、宿主細胞にポリヌクレオチド（導入遺伝子）を送達（形質導入）することを含む。本発明のポリヌクレオチド、発現カセット、rAAVベクター、非ウイルスベクター、方法、使用、および医薬製剤は、治療方法として、ヘテロ核酸によってコードされる配列を、これを必要とする対象に送達する、投与する、または提供する方法においてさらに有用である。このようにして、核酸を含むポリヌクレオチドが転写され、タンパク質が対象において*in vivo*で産生される。対象はタンパク質の欠損を有するため、または対象におけるタンパク質の産生は治療または他の方法としていくらかの治療効果を付与し得るため、対象はタンパク質から利益を得るか、またはタンパク質を必要とし得る。

30

【0231】

本発明は、ヒトおよび獣含む動物の医学的用途において有用である。したがって、適切な対象には、ヒト等の哺乳動物、ならびに非ヒト哺乳動物が含まれる。「対象」という語は、動物、典型的には、ヒト、非ヒト霊長類（類人猿、テナガザル、ゴリラ、チンパンジー、オランウータン、マカク）、飼育動物（イヌおよびネコ）、家畜（ニワトリおよびアヒル等の家禽、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ）、および実験動物（マウス、ラット、ウサギ、モルモット）等の哺乳動物を指す。ヒト対象には、胎児、新生児、乳児、若年および成人対象が含まれる。対象には、動物疾患モデル、例えば、HAE等のタンパク質/酵素欠損のマウスおよび他の動物モデル、ならびに当業者に公知の他のものが含まれる。

40

【0232】

本発明による治療に適した対象には、不十分な量のC1インヒビターを有するか、もしくは産生するリスクがある対象、または異常な、部分機能的な、もしくは非機能的なC1

50

インヒビターを産生する対象が含まれる。対象をC1インヒビター活性について試験し、そのような対象が本発明の方法による治療に適切であるかどうかを決定することができる。本発明による治療に適した対象には、C1インヒビターから利益を受ける対象も含まれる。C1インヒビターから利益を得ることができるそのような対象には、補体介在性障害を有する対象が含まれる。治療された対象は、治療後周期的に、例えば、1～4週間ごと、1～6ヶ月ごと、6～12ヶ月ごと、または1年、2年、3年、4年、5年ごと、またはそれ以上の年ごとにモニターされ得る。

【0233】

対象は、免疫応答について、例えば、AAVに対する抗体について試験され得る。したがって、候補対象は、本発明の方法による治療の前にスクリーニングされ得る。対象はまた、処理後にAAVに対する抗体について試験され得、任意に、処理後のある期間にわたってモニターされ得る。既存のAAV抗体または発生中のAAV抗体を有する対象は、免疫抑制剤で、または本明細書に記載の他のレジメンで治療され得る。

【0234】

本発明による治療に適した対象には、AAVに対する抗体を有するか、または産生するリスクがある対象も含まれる。いくつかの技術を使用して、rAAVベクターはそのような対象に投与または送達され得る。例えば、AAV空カプシド（すなわち、C1インヒビターをコードする改変型核酸を欠くAAV粒子）を送達して、対象におけるAAV抗体に結合させ、それにより、ヘテロ核酸を含むrAAVベクターが対象の細胞に形質導入することを可能にし得る。「AAV空カプシド」、「AAV空カプシド粒子」、「空カプシドAAV」、「空カプシドAAV粒子」という語は、本明細書において互換的に使用される。

【0235】

本発明の改変型核酸、発現カセット、rAAVベクター、および非ウイルスベクターは、C1インヒビター欠損症の治療に使用され得る。したがって、ある実施形態では、C1インヒビターをコードする改変型核酸、C1インヒビターをコードする改変型核酸を含む発現カセット、rAAVベクター、および本発明の非ウイルスベクターは、治療剤および/または予防剤として使用され得る。

【0236】

ある実施形態では、本発明のC1インヒビターをコードする修飾核酸、C1インヒビターをコードする修飾核酸を含む発現カセット、rAAVベクター、および非ウイルスベクターは、HAEの治療に使用され得る。C1インヒビターをコードする修飾核酸、C1インヒビターをコードする修飾核酸を含む発現カセット、rAAVベクター、および本発明の非ウイルスベクターのHAEを有する患者への投与は、C1インヒビタータンパク質の発現をもたらす。

【0237】

ある実施形態では、本発明による方法は、C1インヒビターを必要としない対象において見出されるC1インヒビタータンパク質の正常発現の少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、または少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも100%であるレベルのC1インヒビターの発現または活性をもたらし得る。

【0238】

C1インヒビターをコードする改変型核酸、C1インヒビターをコードする改変型核酸を含む発現カセット、rAAVベクター、および本発明の非ウイルスベクターを含む発現カセットを投与された対象、動物、または患者は、C1インヒビターをコードする改変型核酸、C1インヒビターをコードする改変型核酸を含む発現カセット、rAAVベクター、および本発明の非ウイルスベクターの治療剤および/または予防剤としての効力を実証、測定、かつ/または評価するための様々な試験、アッセイ、および機能評価によって評価され得る。そのような試験およびアッセイとしては、血液もしくは血漿等の生物学的試料中の

C1インヒビター活性の測定（標準C1インヒビター活性アッセイの使用による等）および/またはC1インヒビター量の測定（抗C1インヒビター抗体によるウェスタンブロットによる等）；血漿中の総C1インヒビタータンパク質および活性によって評価されるピークおよび定常状態ベクター由来C1インヒビター酵素レベルの分析；AAVカプシドに対する免疫応答についての試験；ならびにC1インヒビター導入遺伝子タンパク質産物に対する免疫応答についての試験が挙げられるが、これらに限定されない。

【0239】

さらに、本発明のC1インヒビターをコードする改変型核酸、C1インヒビターをコードする改変型核酸を含む発現カセット、rAAVベクター、および非ウイルスベクターは、補体介在性障害の治療に使用され得る。ある実施形態によれば、C1インヒビターをコードする改変型核酸、C1インヒビターをコードする改変型核酸を含む発現カセット、rAAVベクター、および本発明の非ウイルスベクターは、C1インヒビターを必要とする患者の治療に使用され得る。ある実施形態によれば、本発明のC1インヒビターをコードする改変型核酸、C1インヒビターをコードする改変型核酸を含む発現カセット、rAAVベクター、および非ウイルスベクターは、遺伝性血管性浮腫（HAE）の治療に使用され得る。

10

【0240】

本明細書で使用される場合、用語「遺伝性血管性浮腫」または「HAE」は、予測不能かつ再発性の炎症の発作を特徴とする血液障害を指す。HAEは典型的にはC1-INH欠損に関連し、これは、活性が損なわれているかまたは低下しているC1-INHまたは低レベルのC1-INHの結果であり得る。症状としては顔、四肢、生殖器、胃腸管、および上気道等の身体の任意の部分に生じ得る腫脹が挙げられるが、これに限定されない。本明細書で使用される場合、HAEは、I型、II型、またはIII型であり得る。

20

【0241】

本明細書に記載されるように、rAAVは細胞に透過し、核酸/遺伝物質を細胞に導入し得るため、遺伝子治療ベクターとして有用である。AAVはヒトにおける病原性疾患と関連しないため、rAAVベクターは、実質的なAAV病因または疾患を引き起こすことなく、ヒト患者にヘテロポリヌクレオチド配列（例えば、治療用タンパク質および薬剤）を送達することができる。

【0242】

rAAVベクターは、分裂細胞および非分裂細胞に対する親和性を含む、そのような用途に望ましい多くの特徴を有する。これらのベクターを用いた初期の臨床経験もまた、持続的な毒性を示さず、免疫応答は典型的には、最小限であるかまたは検出不可能である。AAVは、*in vivo*で、受容体介在エンドサイトーシスまたはトランスサイトーシスによって、多種多様な細胞型に感染することが知られている。これらのベクター系は、網膜上皮、肝臓、骨格筋、気道、脳、関節および造血幹細胞等の多くの組織を標的とするヒトにおいて試験されている。

30

【0243】

例えば、C1インヒビターの複数のコピーを提供し得る、つまりより多量のC1インヒビタータンパク質を提供し得るrAAVベクターを導入することが望ましい場合がある。改善されたrAAVベクターおよびこれらのベクターを産生するための方法は、Wright J.F. (Hum. Gene Ther., 20:698-706, 2009)を含む多くの参考文献、特許、および特許出願に詳細に記載されている。

40

【0244】

用量は様々であり得、治療の対象とされる疾患の型、発症、増悪、重症度、頻度、期間、または確率、所望の臨床的エンドポイント、以前のまたは同時の治療、対象の一般的な健康、年齢、性別、人種または免疫学的能力、および当業者によって理解される他の因子に依存する。用量、回数、頻度、または期間は、治療または治療の任意の有害な副作用、合併症、または他の危険因子、および対象の状態によって示されるように、比例的に増加または減少され得る。当業者は、治療的または予防的利益を提供するのに十分な量を提供するために必要とされる用量およびタイミングに影響を及ぼし得る因子を理解するだろう

50

【 0 2 4 5 】

治療効果を達成するための用量、例えば、ベクターゲノム/体重キログラム (vg/kg) のrAAVの用量、または非ウイルスベクターの用量は、投与経路、治療効果を達成するのに必要なヘテロポリヌクレオチド発現のレベル、治療される特定の疾患、ウイルスベクターに対する任意の宿主免疫応答、ヘテロポリヌクレオチドまたは発現産物 (タンパク質) に対する宿主免疫応答、および発現されるタンパク質の安定性を含むが、これらに限定されないいくつかの因子に基づいて変化する。当業者は、特定の疾患または障害を有する患者を処置するためのrAAV/ベクターゲノムまたは非ウイルスベクター用量範囲を、前記の因子ならびに他の因子に基づいて決定することができる。

10

【 0 2 4 6 】

一般に、rAAVの用量は、治療効果を達成するために、対象の体重1キログラム当たり少なくとも $1 \times 10^8$ ベクターゲノム (vg/kg)、またはそれ以上、例えば、 $1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{13}$ もしくは $1 \times 10^{14}$ 、またはそれ以上の、対象の体重1キログラム当たりベクターゲノム (vg/kg) に及ぶ。

【 0 2 4 7 】

例えば、約 $2 \times 10^{11}$ 組換えAAV vg/kgまたは約 $2 \times 10^{11}$ 組換えAAV vg/kgより大きい用量；約 $3 \times 10^{11}$ 組換えAAV vg/kgまたは約 $3 \times 10^{11}$ 組換えAAV vg/kgより大きい用量；約 $4 \times 10^{11}$ 組換えAAV vg/kgまたは約 $4 \times 10^{11}$ 組換えAAV vg/kgより大きい用量；約 $5 \times 10^{11}$ 組換えAAV vg/kgまたは約 $5 \times 10^{11}$ 組換えAAV vg/kgより大きい用量；約 $1 \times 10^{12}$ 組換えAAV vg/kgまたは約 $1 \times 10^{12}$ 組換えAAV vg/kgより大きい用量；約 $2 \times 10^{12}$ 組換えAAV vg/kgまたは約 $2 \times 10^{12}$ 組換えAAV vg/kgより大きい用量；約 $3 \times 10^{12}$ 組換えAAV vg/kgまたは約 $3 \times 10^{12}$ 組換えAAV vg/kgより大きい用量；約 $4 \times 10^{12}$ 組換えAAV vg/kgまたは約 $4 \times 10^{12}$ 組換えAAV vg/kgより大きい用量；約 $5 \times 10^{12}$ 組換えAAV vg/kgまたは約 $5 \times 10^{12}$ 組換えAAV vg/kgより大きい用量；約 $1 \times 10^{13}$ 組換えAAV vg/kgまたは約 $1 \times 10^{13}$ 組換えAAV vg/kgより大きい用量；約 $2 \times 10^{13}$ 組換えAAV vg/kgまたは約 $2 \times 10^{13}$ 組換えAAV vg/kgより大きい用量；約 $3 \times 10^{13}$ 組換えAAV vg/kgまたは約 $3 \times 10^{13}$ 組換えAAV vg/kgより大きい用量；約 $4 \times 10^{13}$ 組換えAAV vg/kgまたは約 $4 \times 10^{13}$ 組換えAAV vg/kgより大きい用量；約 $5 \times 10^{13}$ 組換えAAV vg/kgまたは約 $5 \times 10^{13}$ 組換えAAV vg/kgより大きい用量である。

20

30

【 0 2 4 8 】

投与される組換えAAV vg/kgの例示的な用量範囲は、約 $1.5 \times 10^{11}$  ~ 約 $5 \times 10^{13}$ の組換えAAV vg/kg；約 $1.5 \times 10^{11}$  ~ 約 $2 \times 10^{11}$ の組換えAAV vg/kg；約 $2 \times 10^{11}$  ~ 約 $2.5 \times 10^{11}$ の組換えAAV vg/kg；約 $2.5 \times 10^{11}$  ~ 約 $3 \times 10^{11}$ の組換えAAV vg/kg；約 $3 \times 10^{11}$  ~ 約 $3.5 \times 10^{11}$ の組換えAAV vg/kg；約 $3.5 \times 10^{11}$  ~ 約 $4 \times 10^{11}$ の組換えAAV vg/kg；約 $4 \times 10^{11}$  ~ 約 $4.5 \times 10^{11}$ の組換えAAV vg/kg；約 $4.5 \times 10^{11}$  ~ 約 $5 \times 10^{11}$ の組換えAAV vg/kg；約 $5 \times 10^{11}$  ~ 約 $1 \times 10^{12}$ の組換えAAV vg/kg；約 $1 \times 10^{12}$  ~ 約 $1.5 \times 10^{12}$ の組換えAAV vg/kg；約 $1.5 \times 10^{12}$  ~ 約 $2 \times 10^{12}$ の組換えAAV vg/kg；約 $2 \times 10^{12}$  ~ 約 $2.5 \times 10^{12}$ の組換えAAV vg/kg；約 $2.5 \times 10^{12}$  ~ 約 $3 \times 10^{12}$ の組換えAAV vg/kg；約 $3 \times 10^{12}$  ~ 約 $3.5 \times 10^{12}$ の組換えAAV vg/kg；約 $3.5 \times 10^{12}$  ~ 約 $4 \times 10^{12}$ の組換えAAV vg/kg；約 $4 \times 10^{12}$  ~ 約 $4.5 \times 10^{12}$ の組換えAAV vg/kg；約 $4.5 \times 10^{12}$  ~ 約 $5 \times 10^{12}$ の組換えAAV vg/kg；約 $5 \times 10^{12}$  ~ 約 $1 \times 10^{13}$ の組換えAAV vg/kg；約 $1 \times 10^{13}$  ~ 約 $1.5 \times 10^{13}$ の組換えAAV vg/kg；約 $1.5 \times 10^{13}$  ~ 約 $2 \times 10^{13}$ の組換えAAV vg/kg；約 $2 \times 10^{13}$  ~ 約 $2.5 \times 10^{13}$ の組換えAAV vg/kg；約 $2.5 \times 10^{13}$  ~ 約 $3 \times 10^{13}$ の組換えAAV vg/kg；約 $3 \times 10^{13}$  ~ 約 $3.5 \times 10^{13}$ の組換えAAV vg/kg；約 $3.5 \times 10^{13}$  ~ 約 $4 \times 10^{13}$ の組換えAAV vg/kg；約 $4 \times 10^{13}$  ~ 約 $4.5 \times 10^{13}$ の組換えAAV vg/kg；約 $4.5 \times 10^{13}$  ~ 約 $5 \times 10^{13}$ の組換えAAV vg/kg；および約 $5 \times 10^{13}$  ~ 約 $1 \times 10^{14}$ の組換えAAV vg/kgの用量範囲である。

40

【 0 2 4 9 】

50

ある実施形態では、AAV vg/kgは、約 $1 \times 10^{11}$  vg/kgの用量で投与され、約 $2 \times 10^{11}$  vg/kgの用量で投与され、約 $3 \times 10^{11}$  vg/kgの用量で投与され、約 $4 \times 10^{11}$  vg/kgの用量で投与され、約 $5 \times 10^{11}$  vg/kgの用量で投与され、約 $6 \times 10^{11}$  vg/kgの用量で投与され、約 $7 \times 10^{11}$  vg/kgの用量で投与され、約 $8 \times 10^{11}$  vg/kgの用量で投与され、約 $9 \times 10^{11}$  vg/kgの用量で投与され、約 $1 \times 10^{12}$  vg/kgの用量で投与され、約 $2 \times 10^{12}$  vg/kgの用量で投与され、約 $3 \times 10^{12}$  vg/kgの用量で投与され、約 $4 \times 10^{12}$  vg/kgの用量で投与され、約 $5 \times 10^{11}$  vg/kgの用量で投与され、約 $6 \times 10^{12}$  vg/kgの用量で投与され、約 $7 \times 10^{12}$  vg/kgの用量で投与され、約 $8 \times 10^{12}$  vg/kgの用量で投与され、約 $9 \times 10^{12}$  vg/kgの用量で投与され、約 $1 \times 10^{13}$  vg/kgの用量で投与され、約 $2 \times 10^{13}$  vg/kgの用量で投与され、約 $3 \times 10^{13}$  vg/kgの用量で投与され、約 $4 \times 10^{13}$  vg/kgの用量で投与され、約 $5 \times 10^{13}$  vg/kgの用量で投与され、約 $6 \times 10^{13}$  vg/kgの用量で投与され、約 $7 \times 10^{13}$  vg/kgの用量で投与され、約 $8 \times 10^{13}$  vg/kgの用量で投与され、約 $9 \times 10^{13}$  vg/kgの用量で投与される。

#### 【0250】

本明細書で使用される「単位剤形 (unit dosage form)」は、治療される対象のための単位用量として適した物理的に別個の単位を指し、各単位は、1回以上の用量で投与される場合、所望の効果 (例えば、予防的または治療的效果) を生じるように計算される、薬学的担体 (賦形剤、希釈剤、ビヒクルまたは充填剤) と随意に関連する所定の量を含む。単位剤形は、例えば、液体組成物、または凍結乾燥もしくは凍結乾燥状態の組成物を含み得るアンプルおよびバイアル内にあり得；例えば、無菌液体担体は、投与または *in vivo* 送達の前に添加され得る。個々の単位剤形は、複数回投与キットまたは容器に含めることができ、rAAV粒子、非ウイルスベクター、およびその医薬組成物は、投与の容易さおよび用量の均一性のために、単一または複数の単位剤形に包装され得る。

#### 【0251】

治療のための「有効量」または「十分量」の用量 (例えば、治療上の利益または改善を改善または提供するための) は、典型的には、疾患の1つ、複数、またはすべての有害な症状、結果または合併症、例えば、疾患によって引き起こされるか、またはそれに関連する1以上の有害な症状、障害、疾患、病状、または合併症に対する応答を測定可能な程度に提供するのにも有効であるが、疾患の増悪または悪化を減少させる、減少させる、阻害する、抑制する、制限する、または制御することは満足のいく結果である。

#### 【0252】

ある実施形態では、本発明による方法は、C1インヒビターの必要性もしくはHAEの1以上の症状を低減し、減少させ、もしくは阻害し；またはC1インヒビターの必要性もしくはHAEの1以上の症状の進行もしくは悪化を防止もしくは低減し；またはC1インヒビターの必要性もしくはHAEの1以上の症状を安定化させ；またはC1インヒビターの必要性もしくはHAEの1以上の症状を改善する。

#### 【0253】

有効量または十分量は、単回投与で提供することができるが、必ずしもそうである必要はなく、複数回投与を必要とすることができ、単独で、または別の組成物 (例えば薬剤) 、処理、プロトコール、または治療レジメンと組み合わせて投与することができるが、必ずしもそうである必要はない。例えば、その量は、対象の必要性、治療される疾患の種類、状態および重症度、または治療の副作用 (もしあれば) によって示されるように、比例的に増加され得る。加えて、所与の対象において有効または十分であるとみなされるためには、そのような投与量を超える追加の投与量、量もしくは期間、または追加の組成物 (例えば、薬物または薬剤) 、治療、プロトコールもしくは治療レジメンが含まれるため、第2の組成物 (例えば、別の薬物または薬剤) を伴わずに単回または複数回の投与量で与えられる場合、有効量または十分量は、有効または十分である必要はない。有効であると考えられる量には、C1インヒビター欠乏症 (例えばHAE) の治療のためのC1インヒビターをコードする改変型核酸の投与等、別の治療、治療計画またはプロトコールの使用の低減をもたらす量も含まれる。

## 【0254】

したがって、本発明の方法および使用は、とりわけ、別の化合物、薬剤、薬物、治療レジメン、治療プロトコール、プロセス、または治療の必要性または使用の低減をもたらす方法および使用も含む。例えば、C1インヒビター欠損症について、本発明の方法または使用は、所定の対象において、対象における欠損または欠損C1インヒビターを補うための組換えC1インヒビターの用量のより少ない頻度または低減された用量または排除が必要とされる場合、治療的利益を有する。したがって、本発明によれば、別の治療または療法の必要性または使用を低減する方法および使用が提供される。

## 【0255】

有効量または十分量は、治療される各対象および全ての対象において有効である必要はなく、また、所定の群または集団において治療される対象の大多数において有効である必要もない。有効量または有効性もしくは十分量は、グループまたは一般集団ではなく、特定の対象における有効性または十分性を意味する。そのような方法に典型的であるように、一部の対象は、所与の治療方法または使用に対して、より大きな反応を示すか、またはほとんどもしくは全く反応を示さない。

## 【0256】

対象への投与またはin vivo送達は、疾患によって引き起こされるか、または疾患に関連する有害な症状、状態、合併症等の発症前に行われ得る。例えば、スクリーニング（例えば遺伝子の）を用いて、本発明の組成物、方法および使用の候補としてそのような対象を同定し得る。したがって、そのような対象は、機能的遺伝子産物（例えば、C1インヒビターまたはHAEをもたらすタンパク質の欠損）の不十分な量または欠損について陽性であるか、または異常な、部分的に機能的または非機能的な遺伝子産物（例えば、C1インヒビターまたはHAEに關与するタンパク質）を産生するスクリーニングされた対象を含む。

## 【0257】

本明細書に開示される本発明の方法および使用による対象への投与またはin vivo送達は、対象が治療の標的とされる疾患を有すると同定された後、疾患の1つ以上の症状を有すると同定された後、または疾患の1つ以上の症状を有すると同定された後、本明細書に記載されるように陽性であると同定された後、1~2時間、2~4時間、4~12時間、12~24時間または24~72時間以内に実施され得る。もちろん、本発明の方法および使用は、対象が治療のために標的とされる疾患を有すると同定された後、疾患の1つ以上の症状を有すると同定された後、またはスクリーニングされた後、および本明細書に記載されるように陽性と同定された後、1~7日、7~14日、14~24日、24~48日、48~64日またはそれ以上の日数、月数または年数で実施され得る。

## 【0258】

「改善する」という語は、対象の疾病もしくはその症候、または根底にある細胞反応の検出可能なまたは測定可能な改善を意味する。検出可能なまたは測定可能な改善には、疾患の発生、頻度、重症度、増悪、もしくは持続における主観的もしくは客観的な低減、減少、阻害、抑制、抑制、上限もしくは制御、または疾患によって引き起こされるもしくは疾患に関連する合併症、または疾患の症状もしくは根本的原因もしくは結果の改善、または疾患の逆転が含まれる。

## 【0259】

HAE疾患について、有効量は、顔、四肢、生殖器、胃腸管、および上気道等の身体の任意の部分における皮下浮腫、および腫脹等のHAE疾患のマーカー、ならびにC1インヒビター抗原および活性のレベル、補体C4のレベル（無症状の場合であっても、HAEを有する患者の95%においてC4レベルが正常未満）、ならびにブラジキニンのレベル等のバイオマーカーを改善する量であろう。

## 【0260】

HAEについてのバイオマーカーの改善には、C1インヒビター抗原および活性のレベルの増加、補体C4のレベルの増加または安定化（補体C4の低循環レベルはHAEの指標）、

10

20

30

40

50

およびブラジキニンのレベルの減少（C1-INH機能/活性の回復を示す）が含まれる。血漿、血清または組織中の補体C4のレベルを測定または定量するための多くのアッセイは、当技術分野において公知であり、マルチプレックスアッセイ（Lai et al., J. Pharm. Biomed. Anal., 195: 113844 (2020) doi: 10.1016/j.jpba.2020.113844）および放射状免疫拡散法（Koelle et al., J. Clin. Microbio., 16: 271-275 (1982)）およびELISA（Kaplan et al., Front. Med., 4: 206 (2017)）を含む。

【0261】

ある実施形態では、本発明の方法および使用は、対象の血液、血漿、血清ならびに/または組織におけるC1インヒビター抗原および活性のレベルを増加させる。ある実施形態では、本発明の方法および使用は、対象の血液、血漿、血清および/または組織中のブラジキニンレベルを低下させる。ある実施形態では、本発明の方法および使用は、対象の血漿、血清および/または組織中の補体C4のレベルを増加または安定化させる。

10

【0262】

治療用量は、他の要因の中でも、対象の年齢および全身状態、疾患または障害の重症度に依存する。したがって、ヒトにおける治療的有効量は、個々の患者の応答に基づいて医師が決定し得る比較的広い範囲に入る。

【0263】

本発明の方法および使用は、全身的、局所的もしくは局所的であり、または任意の経路、例えば、注射もしくは注入による送達および投与を含む。in vivoでの医薬組成物の送達は、一般に、従来のシリンジを用いた注射を介して達成され得るが、対流増強送達等の他の送達方法も想定される（例えば、米国特許第5,720,720号を参照。その開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。例えば、組成物は、皮下に、表皮内に、皮内に、髄腔内に、眼窩内に、粘膜内に、鼻腔内に、腹腔内に、静脈内に、胸膜内に、動脈内に、腔内に、経口的に、肝内に、門脈を介して、または筋肉内に送達され得る。他の投与様式には、経口および肺投与、坐剤、および経皮適用が含まれる。HAEを有する患者の治療を専門とする臨床医は、患者の条件および治療の目的（例えば、C1インヒビターレベルの増強または低減）を含むがこれらに限定されない多くの基準に基づいて、AAVベクターおよび非ウイルスベクターの投与のための最適な経路を決定し得る。

20

【0264】

組成物は単独で投与され得る。ある実施形態では、rAAV粒子または非ウイルスベクターは、免疫抑制剤なしで治療効果を提供する。治療効果は、場合により、免疫抑制剤を投与せずに、例えば、2~4日、4~6日、6~8日、8~10日、10~14日、14~20日、20~25日、25~30日、または30~50日以上、例えば、50~75日、75~100日、100~150日、150~200日以上持続される。したがって、治療効果は一定期間提供される。

30

【0265】

本発明のrAAVベクター、非ウイルスベクター、方法、および使用は、所望の治療、有益な、相加的な、相乗的な、または相補的な活性または効果を有する任意の化合物、薬剤、薬物、治療または他の治療レジメンまたはプロトコールと組み合わせられ得る。例示的な組合せ組成物および治療は、生物製剤（タンパク質）、薬剤（例えば免疫抑制剤）および薬物等の第2の活性物質を含む。そのような生物製剤（タンパク質）、薬剤、薬物、治療および療法は、本発明の任意の他の方法または使用の前に、実質的に同時に、またはその後、投与または実施され得る。

40

【0266】

化合物、薬剤、薬物、治療もしくは他の治療レジメンもしくはプロトコールは、組み合わせ組成物として投与することができ、またはポリヌクレオチド、発現カセット、rAAV粒子、もしくは非ウイルスベクターの送達もしくは投与と同時に、もしくは一連として、もしくは連続して（その前もしくは後に）等、別々に投与され得る。したがって、本発明は、本発明の方法または使用が本明細書に記載されているか、または当業者に知られている任意の化合物、薬剤、薬物、治療レジメン、治療プロトコール、プロセス、治療薬または組成物との組合せである組合せを提供する。本発明のポリヌクレオチド、発現カセット

50

、非ウイルスベクター、またはrAAV粒子は、対象に投与する前、投与と実質的に同時に、または投与後に、化合物、薬剤、薬物、治療レジメン、治療プロトコール、プロセス、治療薬、または組成物を投与または実施され得る。

【0267】

ある実施形態では、本発明の核酸、発現ベクター、非ウイルスベクター、またはrAAV粒子は、患者がrAAV粒子および/またはC1インヒビタータンパク質に対する免疫応答を有するか、またはそれを発症するリスクがある免疫抑制剤またはレジメンと組み合わせる患者に投与される。そのような免疫抑制剤またはレジメンは、本発明のポリヌクレオチド、発現カセット、非ウイルスベクター、またはrAAVベクターを投与する前、実質的に同時に、または投与した後に投与され得る。

10

【0268】

ある実施形態では、HAEを有するヒト患者等の対象または患者は、C1インヒビタータンパク質（抗C1インヒビター抗体および/または抗C1インヒビターT細胞を含む）に対するインヒビターを生じさせており、これは従来の酵素補充療法での処置後（例えば、組換えにより産生されたC1インヒビタータンパク質の投与後）に起こり得る。このようなC1インヒビターの開発は、酵素補充療法を受けている患者において、特に患者が検出不可なC1インヒビターレベルを有し、患者の免疫系に、補充C1インヒビタータンパク質が「外因性」とみられる場合に起こり得る。ある実施形態では、C1インヒビターを有するHAE患者に、本発明のrAAVベクターまたは非ウイルスベクターを投与する前、実質的に同時に、または投与した後に、患者におけるC1インヒビタータンパク質に対する免疫寛容を達成するか、または免疫反応を緩和することを目的とする1以上のレジメンを投与する。C1インヒビタータンパク質に対する免疫寛容を達成するか、または免疫反応を緩和するためのそのような計画はメトトレキサート、リツキシマブ、静注ガンマグロブリン（IVIG）、オマリズマブ、および合成ワクチン粒子（SVPTM）-ラパマイシン（生分解性ナノ粒子に封入されたラパマイシン）を含むが、これらに限定されない1以上の免疫抑制剤の投与、ならびに/またはB細胞枯渇、免疫吸着、および血漿交換等の1以上の免疫抑制プロトコールまたは手法の投与を含み得る。

20

【0269】

ある実施形態では、rAAVベクターまたは非ウイルスベクターは、rAAVベクターまたは非ウイルスベクターを投与する前、実質的に同時に、または投与した後に、1以上の免疫抑制剤と併せて投与される。ある実施形態では、1以上の免疫抑制剤は、rAAVベクターまたは非ウイルスベクターを投与した後、例えば、1~12時間、12~24時間または24~48時間、または2~4日、4~6日、6~8日、8~10日、10~14日、14~20日、20~25日、25~30日、30~50日、または50日より多く投与される。rAAVベクターまたは非ウイルスベクターを投与した後のある時間の後の免疫抑制剤のそのような投与は、初期発現レベルの後のある期間、例えば、rAAVベクターまたは非ウイルスベクターの後の20~25日、25~30日、30~50日、50~75日、75~100日、100~150日、150~200日または200日を超える期間、コードされたタンパク質またはインヒビター核酸の減少がある場合に行われ得る。

30

【0270】

ある実施形態では、免疫抑制剤は抗炎症剤である。

40

【0271】

ある実施形態では、免疫抑制剤は、ステロイド、例えば、コルチコステロイドである。ある実施形態では、免疫抑制剤は、プレドニゾン、プレドニゾロン、カルシニューリンインヒビター（例えば、シクロスポリン、タクロリムス）、CD52インヒビター（例えばアレムツズマブ）、CTLA4-Ig（例えばアパタセプト、ベラタセプト）、抗CD3モノクローナル抗体、抗LFA-1モノクローナル抗体（例えばエファリズマブ）、抗CD40モノクローナル抗体（例えばASKP1240）、抗CD22モノクローナル抗体（例えばエプラツズマブ）、抗CD20モノクローナル抗体（例えば、リツキシマブ、オレリズマブ、オフアツズマブ、veltuzumab）、プロテアソームインヒビター（例えばボルテゾミブ）、TACI-I

50

g (例えばアタシセプト)、抗C5モノクローナル抗体(例えばエクリズマブ)、ミコフェノール酸塩、アザチオプリン、シロリムス、エベロリムス、TNFR-Ig(例えばエタネルセプト(エンブレル(登録商標))、抗TNFモノクローナル抗体(例えばアダリムマブ(ヒュミラ(登録商標))、インフリキシマブ(レミケード(登録商標))；アブソラ(登録商標))、トファシチニブ、抗IL-2R(例えばバシリキシマブ)、抗IL-17モノクローナル抗体(例えばセクキヌマブ)、抗IL-6モノクローナル抗体(例えば、抗IL-6抗体シルクマブ、抗IL-6受容体抗体トシリズマブ(アクテムラ(登録商標))、IL-10インヒビター、TGF- $\beta$ インヒビター、B細胞標的抗体(例えばリツキシマブ)、哺乳類ラパマイシン標的(mTOR)インヒビター(例えばラパマイシン)、合成ワクチン粒子(SVPTM)-ラパマイシン(生分解性ナノ粒子封入ラパマイシン)、静注ガンマグロブリン(IVIG)、オマリズマブ、メトトレキサート、チロシンキナーゼインヒビター(例えばイブルチニブ)、シクロホスファミド、フィンゴリモド、B細胞活性化因子(BAFF)のインヒビター(例えば抗BAFFモノクローナル抗体、例えばベリムマブ)、増殖誘導リガンド(APRIL)のインヒビター、抗IL-1 $\beta$ モノクローナル抗体(例えばカナキヌマブ(Haris(登録商標)))、C3aインヒビター、トレジトープ(例えば、米国10,213,496を参照)、またはこれらの組合せおよび/もしくは誘導体である。

10

#### 【0272】

ある実施形態では、rAAVベクターまたは非ウイルスベクターは、rAAVベクターまたは非ウイルスベクターを投与する前、実質的に同時に、または投与した後、および/またはB細胞枯渇、免疫吸着、および血漿交換等の1以上の免疫抑制プロトコールまたは手法の投与と併せて、1以上の免疫抑制剤と併せて投与される。

20

#### 【0273】

ラパマイシンの使用を含む免疫抑制プロトコールは、単独で、またはIL-10と組み合わせ、C1インヒビタータンパク質に対する体液性免疫応答および細胞性免疫応答を低減し、減少させ、阻害し、予防し、または遮断するために使用され得る。本発明のAAVベクターを用いた肝臓遺伝子導入は、制御性T細胞(Treg)の誘導および他の機構を介してC1インヒビタータンパク質に対する免疫寛容を誘導するために使用され得る。全身性遺伝子導入におけるAAVに対する体液性免疫を克服または回避するための戦略には、高いベクター用量の投与、抗AAV抗体を吸着するためのデコイとしての空のAAVカプシドの使用、AAVに対する体液性免疫応答を低減し、減少させ、阻害し、予防し、または遮断するための免疫抑制薬の投与、AAVカプシド血清型を変化させるか、または中和抗体(Nab)に対する感受性がより低くなるようにAAVカプシドを操作すること、抗AAV免疫グロブリンを吸着するための血漿交換サイクルの使用、それにより抗AAV抗体力価を低下させること、およびバルーンカテーテル等の送達技術の使用、その後の生理食塩水洗浄が含まれる。そのような戦略は、Mingozzi et al., 2013, Blood, 122:23-36に記載される。さらなる戦略には、Bertin et al., 2020, Sci. Rep. 10:864に記載されるように、血漿からの総免疫グロブリンプールを枯渇させることなく抗AAV抗体を選択的に枯渇させるために、AAV特異的プラスマフェレーシスカラムを使用することが含まれる。対象においてAAV抗体を除去し、枯渇させ、捕捉し、かつ/または不活性化するためのアフエレーシス戦略は、WO2019018439号に記載される。

30

40

#### 【0274】

空のAAVカプシド対rAAVベクターの比は、約100:1~50:1、約50:1~25:1、約25:1~10:1、約10:1~1:1、約1:1~1:10、約1:10~1:25、約1:25~1:50、または約1:50~1:100の範囲内またはその中間であり得る。その比はまた、約2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、または10:1であり得る。

#### 【0275】

投与する空のAAVカプシドの量は、特定の対象において産生されるAAV抗体の量(力価)に基づいて補正され得る。AAV空カプシドは、任意の血清型、例えば、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、A

50

AV12、Rh10、Rh74（配列番号：188）、AAV3B、AAV-2i8、配列番号：226、配列番号：189、配列番号：190、および/または配列番号：191のものであり得る。

【0276】

あるいは、またはさらに、rAAVベクターまたは非ウイルスベクターは、直接筋肉内注射（例えば、筋肉の1以上の遅筋線維に）によって送達され得る。別の代替例では、大腿動脈に導入されたカテーテルを使用して、肝動脈を介して肝臓にrAAVベクターまたは非ウイルスベクターを送達し得る。非外科的手段、例えば内視鏡的逆行性胆管膵管造影（ER-P）を用いて、rAAVベクターまたは非ウイルスベクターを肝臓に直接的に送達し、それにより血流およびAAV抗体をバイパスすることもできる。他の管系、例えば顎下腺の管もまた、抗AAV抗体を産生するかまたは既存の抗AAV抗体を有する対象にrAAVベクターまたは非ウイルスベクターを送達するための門脈として使用され得る。

10

【0277】

AAVに対する体液性免疫を減少させるためのさらなる戦略には、一般にアフエレーシスと称される、AAV抗体を除去、枯渇、捕捉、かつ/または不活性化する方法が含まれ、より詳細には血液製剤が関与するプラズマフェレーシスが含まれる。アフエレーシスまたはプラズマフェレーシスは、ヒト対象の血漿が患者に戻る前に、構成要素の添加、除去、および/または置換を通して血漿を改変するデバイスを通して、*ex vivo*（体外）で循環されるプロセスである。血漿アフエレーシスを用いて、血液製剤（例えば血漿）からヒト免疫グロブリン（例えば、IgG、IgE、IgA、IgD）を除去し得る。この手順はAAVに結合する免疫グロブリン（抗体）を枯渇させ、捕捉し、不活性化させ、減少させ、または除去し、それにより、AAVベクター中和に寄与し得る、処置された対象におけるAAV抗体の力価を減少させる。一つの例は、AAVカプシド親和性マトリックスカラムから構成されるデバイスである。AAVカプシド親和性マトリックスを介して血液製剤（例えば血漿）を通過させると、AAV抗体およびすべてのアイソタイプ（IgG、IgM等を含む）のみが結合することになる。

20

【0278】

AAVカプシド親和性マトリックスを使用する十分な量のプラズマフェレーシスは、AAVカプシド抗体を実質的に除去し、ヒトにおけるAAVカプシド抗体力価（負荷）を低下させると予測される。ある実施形態では、処置された対象における力価は、実質的に低レベルに（ $< 1:4$ 、または $< 1:3$ 、または $< 1:2$ 、または $< 1:1$ 等、 $< 1:5$ 、またはそれ未満に）低下する。AAVカプシド抗体を産生するBリンパ球は、血漿交換前にAAVカプシド抗体力価を定常状態レベルに徐々に回復させると予想されるため、抗体力価の低下は一時的である。

30

【0279】

既存のAAV抗体力価が1:100から1:1に減少した場合、AAV抗体力価リバウンドは、約0.15%（1:1.2の力価に相当する）、0.43%（1:1.4）、0.9%（1:1.9）、1.7%（1:2.7）、および3.4%（1:4.4）であり、それぞれ、血漿交換の終了後1時間、3時間、6時間、12時間、および24時間で生じる。そのような対象からのAAV抗体の一時的な除去は、AAVベクターが対象に投与され、AAV抗体によるAAVベクターの実質的な中和なしに標的組織を効率的に形質導入することが予測され得る時間ウィンドウ（例えば、12時間以下、または6時間以下、または3時間以下、または2時間以下、または1時間以下等、約24時間以下、）に対応する。

40

【0280】

既存のAAV抗体力価が1:1000から1:1に減少した場合、AAV抗体力価リバウンドは、約0.15%（1:2.5の力価に相当する）、0.4%（1:5.3）、0.9%（1:9.7）、1.7%（1:18）、および3.4%（1:35）であり、それぞれ、血漿交換の終了後1時間、3時間、6時間、12時間、および24時間で生じる。したがって、AAVベクターの投与のためのウィンドウは比較的短くなる。

【0281】

50

AAV抗体は、既存のものであり得、標的細胞の治療的C1インヒビター遺伝子導入ベクター形質導入を低減または遮断するレベルで存在し得る。あるいは、AAV抗体は、AAVへの曝露またはAAVベクターの投与後に発生し得る。このような抗体がAAVベクターの投与後に発生する場合、これらの対象はまた、アフエーシスを介して、より具体的には、血漿交換を介して治療され得る。

**【0282】**

ある実施形態では、本発明のポリヌクレオチド、発現カセット、AAVベクター、および非ウイルスベクターは、ヒト血漿中の抗体（例えばIgG）レベルを低下させるための方法と組み合わせて使用され得る。ある実施形態では、本発明のポリヌクレオチド、発現カセット、AAVベクター、および非ウイルスベクターは、IgGと胎児性Fc受容体（FcRn）との相互作用を遮断し、阻害し、または減少させる薬剤、例えば抗FcRn抗体、*in vivo*でのIgGリサイクルを減少させ、IgGクリアランスを増強する薬剤、および/またはウイルスベクターに結合する循環抗体を減少させる薬剤、例えば組換えウイルスベクター、または組換えウイルスベクターによって封入された治療用ヘテロポリヌクレオチドによってコードされる核酸もしくはポリペプチド、タンパク質もしくはペプチドに結合する薬剤、または治療用ヘテロポリヌクレオチドに結合する薬剤と組み合わせて使用され得る。

10

**【0283】**

ある実施形態では、ウイルスベクターへの抗体結合は、IgGと、FcRn、プロテアーゼまたはグリコシダーゼとの相互作用を低減する薬剤によって低減または阻害される。

**【0284】**

ある実施形態では、本発明のポリペプチド、発現カセット、AAVベクター、または非ウイルスベクターは、エンドペプチダーゼ（例えば、化膿連鎖球菌由来のIdeS）もしくはその修飾変異体、またはエンドグリコシダーゼ（例えば、化膿連鎖球菌EndoS）もしくはその改変変異体と組み合わせて使用され得る。ある実施形態では、本発明のポリペプチド、発現カセット、AAVベクター、または非ウイルスベクターは、エンドペプチダーゼ（例えば、化膿連鎖球菌由来のIdeS）もしくはその改変変異体、またはエンドグリコシダーゼ（例えば、化膿連鎖球菌由来のEndoS）もしくはその改変変異体と組み合わせて対象に投与され、AAVカプシドに対する中和抗体を減少させるか、もしくは明らかにし、遺伝子治療に適格でない以前にみなされた患者の治療を可能にし、またはAAV遺伝子治療後にAAV抗体を発症する患者の治療を可能にする。そのような戦略は、Leborgne et al., C., Barbon, E., Alexander, J.M. et al., 2020, Nat. Med., 26:1096-1101 (2020), doi.org/10.1038/s41591-020-0911-7に記載される。

20

30

**【0285】**

ある実施形態では、本発明の核酸、発現カセット、AAVベクター、および非ウイルスベクターは、例えば、ベリナート（登録商標）、シンライズ（登録商標）、オラデオ™（ベロトラルスタット）、ルコネスト（登録商標（組換えC1-INH）、ヘガーダー（登録商標（血漿由来C1-INH濃縮物）、ラナデルマブ（タクザイロ（登録商標））、アンドロゲン（ダナゾール）、エカレッド、イカタント、およびトラネキサム酸を含む対症療法および支持療法および薬物療法；例えば、ラパマイシン、プレドニゾロン、タクロリムス、およびトシリズマブを含む免疫抑制レジメン；またはバルビツール酸、スルホンアミド、およびエストロゲン等のFDA承認薬物と組み合わせて使用され得る。

40

**【0286】**

ある実施形態では、本発明のポリヌクレオチド、発現カセットおよびAAVベクターは、薬理的シャペロン処理（酵素増強処理としても知られる）と組み合わせて使用することができ、1以上の薬理的シャペロンはHAE等の補体介在性障害の治療のために、本発明のポリヌクレオチド、発現カセット、AAVベクター、または非ウイルスベクターの投与の前に、同時に、または後に投与される。

**【0287】**

ある実施形態では、本発明のポリヌクレオチドおよび発現カセットは、AAVベクター粒子を介して送達または投与される。ある実施形態では、本発明のポリヌクレオチドおよ

50

び発現カセットは、レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルパー依存性アデノウイルス、ハイブリッドアデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス、ポックスウイルス、エプスタインバーウイルス、ワクシニアウイルス、およびヒトサイトメガロウイルス粒子を含む他のタイプのウイルス粒子を介して送達または投与され得る。ある実施形態では、本発明のポリヌクレオチドおよび発現カセットは、非ウイルスベクターを介して送達または投与され得る。

【0288】

キット

本発明は、パッケージング材料およびその中の1以上の構成要素を有するキットを提供する。キットは、典型的には、その中の構成要素の*in vitro*、*in vivo*、または*ex vivo*での使用のための構成要素または説明書の説明を含むラベルまたはパッケージング挿入物を含む。キットは、そのような成分の組み合わせ、例えば、rAAV粒子または非ウイルスベクター、および場合により、別の化合物、薬剤、薬物または組成物等の第2の活性成分を含み得る。

【0289】

キットは、キットの1つ以上の構成要素を収容する物理的構造を指す。

【0290】

パッケージング材料は、成分を滅菌状態に維持することができ、そのような目的のために一般に使用される材料（例えば、紙、波形繊維、ガラス、プラスチック、箔、アンプル、バイアル、チューブ等）から作製され得る。

【0291】

ラベルまたは挿入物は、その中の1以上の成分、用量、作用機序、薬物動態および薬力学を含む活性成分の臨床薬理学の識別情報を含み得る。ラベルまたは挿入物は、製造業者情報、ロット番号、製造場所および日付、ならびに有効期限を識別する情報を含み得る。ラベルまたは挿入物は、キット構成要素を使用することができる疾患に関する情報を含み得る。ラベルまたは挿入物は、方法、使用、または治療プロトコルもしくは治療レジメンにおいてキット構成要素のうちの1以上を使用するための、臨床医または対象のための指示を含み得る。説明書は、用量、頻度または期間、および本明細書に記載の方法、使用、治療プロトコルまたは予防または治療レジメンのいずれかを実施するための説明書を含み得る。

【0292】

ラベルまたは挿入物は、予防的または治療的利益等の、構成要素が提供し得る任意の利益に関する情報を含み得る。ラベルまたは挿入物は、特定の組成物を使用することが適切ではない状況に関する対象または臨床医に対する警告等の、潜在的に有害な副作用、合併症または反応に関する情報を含み得る。有害な副作用または合併症はまた、対象が組成物と不適合であり得る1以上の他の薬剤を有する、服用している、もしくは使用している、または対象が組成物と不適合であり得る別の治療プロトコルまたは治療レジメンを有する、服用している、服用している、もしくは使用している場合にも起こり得、したがって、指示書は、そのような不適合に関する情報を含み得る。

【0293】

ラベルまたは挿入物は、「印刷物」、例えば、紙もしくはボール紙、または構成要素、キットもしくはパッケージング材料（例えば箱）に別々にもしくは貼り付けられた、またはキット構成要素を含むアンプル、チューブもしくはバイアルに取り付けられた「印刷物」を含む。ラベルまたは挿入物はさらに、バーコード付き印刷ラベル等のコンピュータ可読媒体、ディスク、CD-またはDVDROM/RAM等の光ディスク、DVD、MP3、磁気テープ等の光ディスク、またはRAMおよびROM等の電氣的記憶媒体、または磁気/光記憶媒体、FLASH媒体もしくはメモリ型カード等のこれらのハイブリッドを含み得る。

【0294】

本明細書に開示される特徴の全ては、任意の組み合わせで組み合わせられ得る。本明細書に開示される各特徴は、同じ、同等、または同様の目的を果たす代替的な特徴によって

10

20

30

40

50

置き換えられ得る。

【 0 2 9 5 】

本発明は、本明細書において、本発明の多数の実施形態を説明するために肯定的な言葉を用いて一般的に開示される。本発明はまた、具体的には、特定の主題が物質または材料、方法ステップおよび条件、プロトコール、または手順等の、完全にまたは部分的に除外される実施形態を含む。例えば、本発明の特定の実施形態では、材料および/または方法のステップは除外される。したがって、本発明は一般に、本発明が含まないものに関して本明細書では表現されないが、本発明において明確に除外されない態様はそれにもかかわらず、本明細書で開示される。

【 0 2 9 6 】

本発明の特定の実施形態を説明してきた。それにもかかわらず、当業者は、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、本発明の種々変更および修正を行い、それを種々の使用および条件に適合させることができる。したがって、以下の実施例は、いかなる方法でもクレームされる本発明の範囲を例示することを意図しているが、限定することを意図していない。

【 0 2 9 7 】

配列表

10

20

30

40

50

【表 1】

	配列
1	<p>ctgcgctcgcctcactgagccgcccgggcaaaagcccggcgccctcagtgagcgcgagcgcgcagagaggagtggccaactccatca  ctagggggtcctcggcctagtaggctcagaggcacacaggagttctgggctcaccctgccccctccaacccctcagttccatcctccagcagctgtt  gtgtgctgcctctgaagtcacactgaacaaactcagcctactcatgtccctaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacacacagccctcc  ctgctctgaccttgagctgggagaggtcagagacctctctggccctgccacctccaacatccactgacccttggaattcgggtggagagga  gcagagggtgctcctggctggttaggtagtgtagaggggtaccggggtctgactaccagtggaacagccactaaggattctgcagtgagcagag  ggccagctaaagtgtactctccagagactgctgactcacgccccccctccacttgacacagagcctgtgtggtctgagccaggtacaatgactcct  ttcggtaagtgcagtggaagctgtacactgccaggcaagcgtccgggagcgttagcgggggactcagatcccagccagtgacttagccctgttt  gctcctccgataactggggtgacctggttaattaccagcagcctccccgtgccccctctgactccactgcttaatacggacgaggacagggccctg  tctcctcagctcagccaccactgacctgggacagtgaatagatcctgagaactcagggtgagctatgggaccttgatgtttcttccccctctttct  atggftaagttcatgtcfaaggaaggagaaagtaacagggtacacatattgacaaaacagggtaatttgcattfgtaatttaaaaaatgctttctttta  atactttttgttatctatttcaatacttcccaatcttcttccaggcaataatgatacaatgfatcatgctctttgaccattcaagaataaacagtataa  ttctgggftaaggcaatagcaatattctgcatataaattctgcatataaattglaactgatgaagaggttcatatgctaatagcagctacaalccagcta  ccattctgttttatttctggtgggataaggctgattattctgagttcaagctagccctttgctaactgttccataccttcttctccccacagctcctgg  gcaacctgctggtctctgctggccatccttggcaagcacgctgccaccatggcctcagcctgacctctgacctcctgctgctgctgctggc  tgggatagagcctcctcaaatccaatgctaccagctccagctccagatccagagagttfgcaagacagagggcaagggaaggctgcaacaacagt  latctccaagatgctatcgtggaacccatcctggaggttccagcttgcggacaaccaactcaacaaccaaltcagccacaaaataacagclaataccact  gatgaaccaccacacacaccaccacagagcccaccaccaaccaccatccaaccaccaaccaactaccagctccaacagattctctaccaca  gcccactactggctctctcccaggacctgtactctctgctgactggagagtcattcaacagagggcgtgtgggggatgcttggtagattctccct  gaagctctaccagcctctcagcaatgaagaagggtggagaccaatggcctttccctcattcagatcgcagcctcctfaccaggtcctgctcgggg  ctggggagaacacaaaacacactggagagcactctcttaccccaaggactcactgtgtccaccagccctgaagggttcacgaccaaaagggt  cacctcagctctcagatttccacagccagacctggccataagggacaccttfgaatgctctcggaccctgtacagcagcagccagagctcctaa  caacaacagtgacccaactggagctcatcaacacctgggtggcaagaacaccaacaacaagatcagccgctgtagacagctgacctccgatac  ccgcttgcctcctcaatgctatctactgagtcgaagtggagacaacattgataccaagaaaaccagaatggaaccttctcactcaaaaactcagfta  taaaagtgccatgatgaatagcaagaagtaccctgtggccattcattgacaaaacttgaagccaaggtggggcagctgagctctccacaatctga  gtttgtgactcctgtacccagaacctgaacatgcttgaagacatggaacaggtctctcagccctctgttttcaaggccatcatggagaactggagat  gtccaagtccagccactctcctaacactacccgcataaagtacagaccagcagatgctctcaatcatggagaatfggaattctcgtattttctta  tgaccttaacctgtgtggctgacagagacctgatctcaggttctgctgagcaccagacagctgctggaactgacagagactgggtggagggcg  gctgagcctccgcatctctgtgcccaccctgctggttgaagtgcagcagccctctctctgctctggaccagcagacaagtccctgct  tcatggggcagatatagccccaggcctgaagatctagagctgaattcctgacccaggggatcagcctactgtgcttctagtccagccatctg  ttgtttccccctccccctgcttctgacctggaaggtgccaactcccactgtccttccataaaatgaggaaatgcatcacattgctgagtaggtcat  tctattctgggggtgggtggggcagacagcaaggggagagattgggaagacaatagcagcagctggggatgagtggtctatggcttctga  ggcagaaaagaccagctgggctcagatccactagggccgaggaaccctagtgatggagttggcactcctctctgctgctcctgctcactg  aggccggcgaccaaaagtcgcccagcggggccttggcccggcgccctcagtgagcagcagcgcgag</p>
2	<p>ctgcgctcgcctcactgagccgcccgggcaaaagcccggcgccctcagtgagcgcgagcgcgcagagaggagtggccaactccatca  ctagggggtcctcggcctagtaggctcagaggcacacaggagttctgggctcaccctgccccctccaacccctcagttccatcctccagcagctgtt  gtgtgctgcctctgaagtcacactgaacaaactcagcctactcatgtccctaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacacacagccctcc</p>

10

20

30

40

50

	<p>ctgcctgctgacctggagctggggcagaggtcagagacctctgggccatgccacctccaacatccactgacccctfgaatttcgggtgagagga  gcagaggtgtcctggcgtggttttaggtagtgtagaggggtaccgggggacttgcaccagtggaacgccaactaaggattctgcagtgagagcagag  ggccagctaagtgactctcccagagactgtctgactcacgcccccctccacctggacacagagcgtgtggtttctgagccaggtacaatgactcct  ttcggtaagtgcagtggaagctgtacactcccaggcaaaagcgtccggcagcgtaggcggcgactcagatcccagccagtgacttagccccctgtt  gctcctccgataactgggggacttggtaataatcaccagcagcctccccctggccctctggtaccactgcttaatacggacgagggcagggccctg  tctcctcagctcagccaccactgacctgggacagtgaatagatcctgagaactcagggtagtctatgggacctgtatgttttcttcccccttttct  atggttaagtcatgcataggaaggggagaagtaacaggggtacacatatggcaaatcagggttaatttgattttaaataatgcttctctttaa  atactttttgttattcttatttctaatacttccctaactcttcttctcaggcaataatgatacaatgtatcatgctcttggcaccattcctaagataacagtata  ttctgggttaagcaatgcaatattctgcatataaataattctgcatataaattgtaactgatgtaagaggttcatattgtaatagcagctacaatccagcta  ccattctgcttttttctggtgggataagctggattattctgagccaagctaggccctttgctaactgttctataactcttattctccccacagctcctgg  gcaacctgctgctctctgctggccatcactttggcaaaacacgcgtgccaccatggcctttctgtgctgctgtcctgctggccctgctggggaccac  ctttggcaatccaaatgctaccagctccagctcccagatccagagaggttccaagacagagggcgaagggaaggtcgaacaacagttatccaagatg  ctattcgtlgaacccatcctggagggttccagcttggcacaaccaactcaacaacaaatcagccacaaaataacagctaalaccatgatgaaccacc  acacaaccaccacagagccaccacccaaccaccatcaaccacccaacaaactaccagctcccaacagattcctaccagcccactactggg  tcttctgcccaggacctgtactctgctctgacttggagagctatcaacagagccgtgtgggggatccttggtagatttccctgaagctctaccac  gccttccagcaatgaagaaggtggagaccaacatggccttttcccattcagatcggccctcctaccaggtcctgctcggggctggggagaacac  caaaacaacctggagagcactctcttaccccaaggactcactgtgtccaccagggcctgaagggtcctcagcaaaaaggtgtcactcagctctc  agatttccacagcccagacctggccataaggacacctttgtaagcctctcggaccctgtacagcagcagccccagagctcaagcaacaacagtga  cgccaacttggagctcaacaacctgggtggccaagaacacaacaagaatcagccggctctagacagctgcccctccgataccccctgtctc  ctcaatctatctactagtgccaagtgggaagacaacatllgatccaagaaaaccagaatggaaccttacttcaaaaactcagttataaaagtccca  tgatgaatacaagaagtacctgtgcccattcattgaccaaaacttgaagccaaggtggcgagctgagctctccacaatctgagttgtgatacct  ggtaacccagaacctgaacatcgtcttgaagacatggaacaggtcctcagccctgtttcaaggccatcatggagaactggagatgccaagtcca  ggccactctctaactaccggcatcaaaagtagcagaccagccagatgctctcaatcatggagaaattggaattctcgattttcttatgacttaacct  gtgtggctgacagagggacctgacttcaagtttctgcatgacagaccagacagctgctggaactgacagagactgggtggaggcgctgagcctc  cgccatctctgtgcccaccctgctggtttgaagtgcagcagcccttctctctgctctgggaccagcagcaagtccctgtctatggggcga  gtalatgacccaggccctgaagatctagagctgaattcctgcagccaggggatcagcctctactgtgcttctagtggccagccatctgttggccctc  ccccctgcttctgacctggaaaggtgccactcccactgcttcttaataaaatgaggaaatgcatcaattgctgagtaggtctattctatctgggg  gggtgggtggggcaggacagcaagggggagattgggaagacaatagcagggcatgctggggatgagtggtctctatggctctgagcagaaga  accagctggggctcagatccactagggccgaggaaccctagtgtgaggtggccactcctctctgcccgtcgtcgtcactgagggccggcg  accaaaggtgcccgaecggggcttggcccggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgag</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p>
<p>3</p>	<p>ctgcgctcgtcgtcactgagccggccggcaaaagcccggcgccctcagtgagcagcgagcgcgagagggagtgccaactccatca  ctaggggttctgcccctagtaggctcagagggcacacagaggttctgggctaccctgccccctccaaccctcagttccatcctccagcagctgtt  gtgtctgctctgaagtccactgaacaaactcagcctactatgtccctaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaaacacagccctcc  ctgctctgacctggagctgggagaggtcagagacctctgggccatgccactccaacatccactgaccccttgaatttgggtgagagga  gcagaggtgtcctggcgtggttttaggtagtgtagaggggtaccgggatcttaccagtggaacgccaactaaggattctgagtgagagcagag  ggccagctaagtgtactcaccagagactgtgactcacgcccccctccacctggacacagagcgtgtggtttctgagccaggtacaatgactcct  ttcggtaagtgcagtggaagctgtacactcccaggcaaaagcgtccggcagcgtaggcggcgactcagatcccagccagtgacttagccccctgtt  gctcctccgataactggggacttggtaataatcaccagcagcctccccctggccctctggtaccactgcttaatacggacgagggcagggccctg  tctcctcagctcagccaccactgacctgggacagtgaatagatcctgagaactcagggtagtctatgggacctgtatgttttcttcccccttttct</p>	<p>40</p>

	<p>atggttaagttcatgcataggaaggggagaagtaacagggtacacatattgaccaaatcagggaattttgcatftgtaattttaaaaaatcifttcttfttaata  atacttttttfttattctatttctaatacttccctaatacttcttctcagggaataatgatacaatgtatcatgacctttgacacfttaagaataacagtataa  tttctgggtaaggaatagcaatatttctgcatataaataatttctgcatataaattgtaactgatgtaagaggfttcatattgctaatagcagctacaatccagcta  ccattctgctftttttctggttgggataagctggtatttctgagccaagctaggccctttgctaacttctgcatatacttcttctctccacagctcctgg  gcaacctgctgctctctgctggtcccatcactttggcaaaagcacgctgcccacatgaagtggttaaccttatttcccttcttcttctttagctcggcttaltc  caatcaaatgctaccagctccagctccagatccagagatttgaagacagaggcgaaggggaaggtcgaacaacagttatctccaagatgctattc  gttgaacctatctggaggttccagcttggcacaaccaactcaacaaccaatcagcccaaaataacagctaataaccactgatgaacctaccacaca  accaccacagagcccaccaccaaccacatccaaccaccaaccaactaccagctccaacagattctctaccagcccactactgggtctctc  tggccagacctgtactctctctgactggagagtcattcaacagaggcctgttgggggatgctttgtagatttccctgaagctctaccacgctctc  tcagcaatgaagaagtgtagaccaatgaccttcccaatcagcatcgccagcctctaccaggtcctgctcggggctgggagaacacaaaa  caaacctggagagcatctcttaccacaagacttaccctgttccaccagggcctgaagggcttcacgaccaaaaggtgacacctcagctctcagattt  ccacagcccagacctggccaataaggacaccttgtgaatccctctcggacctgtacagcagcagcccagagtcctaagcaacaacagtgacgcca  cttgagctcatcaaacctgggtggccaagaacaccaacaacaagatcagccggctgtagacagcttccctccgatacccctgtctctcaatg  ctatctactgagtgcaagtggaagacaacattgatccaagaaaaccagaatggaaccttctactcaaaaactcagttataaaagtgccatgatgaa  tagcaagaagtaccctgtggcccatttattgaccaaaccttgaagccaaggtggggcagctgagctctccacaatctgatttggtagctctgaccc  cagaacctgaaacatgcttgaagacatggaacaggctctcagccctctgtttcaaggccatcatggagaactggagatgccaagtccagcccact  ctctaactactccccgcatcaaatgacgaccagccagatgctctcaatcagagaatggaattctcagatttcttatgacctaacctgtgtggg  ctgacagaggacctgatctcaggttctgcatgacagcaccagacagctgctgaaactgacagagactgggggtggggcggctgacccctccatc  tctgtggcccgcacctgctgcttgaagtgtagcagcagccctctctctgctctgggaccagcagcacaagtccctgtcttcatggggcagatatag  accccagggcctgaagatctagagctgaattctgtagccaggggatcagcctctactgtccttctagttgacagccatctgttggcttccctccctt  gccttctgacctggaaggtgccaactccactgtcttctcaataaaaatgaggaatgcatcacttctgtagtaggttcttattctgggggtgg  gggtggggcagagcagaaggggggaggtgggaagacaatagcagcagctgctgggatgtagtgggctctatgcttctgagccagaagaacag  ctgggctcagatccactagggcaggaaccctagtatggagttggcactccctctctgctgctcctcactgagccggggcgacca  aggtcggccgacggggcttggccggggcggcctcagtgagcgagcagcgcgcag</p>	<p>10</p> <p>20</p>
<p>4</p>	<p>ctgcgcctcctcctcactgagccgcccgggcaaagcccggggcctcagtgagcagcagcgcagagagggagtggccaactccatca  ctagggggtctcggcctagtaggctcagagggcacagaggttctgggctaccctgccccttccaaccctcagttccatctccagcagctgtt  gtgctgctcctcgaagtcacactgaacaaactcagcctactatgctcctaaaatgggcaaacattgcaagcagaacacagcaaacacacgacctcc  ctgctgctgacctggagctggggcagaggtcagagacctctctggccatgccactccaatcactgaccccttgaatttgggtgagagga  gcagaggttctcctgctggttagtagttagaggggtaccggggtctgctaccagtggaacagccactaaggattctcagtgagagcagag  ggccagctaaagtgactctccagagactgctgactcagccacccctccacttggacacagcagctggttctgagccaggtacaatgactcct  ttcgtaagtgtagtggaagctgtaactcccaggaagcgtccgggagcagtagcggggcactcagatcccagcagtgactgacctgtt  gctcctccgataactgggtgaccttggtaataatcaccagcagcctccccgttcccctctggatccactgctaaatacagacagagacaggccctg  tctctcagctcaggcaccactgacctggagcagtgaaatagatcctgagaactcagggtagtctatggacccttggatttcttccctctcttct  atggttaagttcatgcataggaaggggagaagtaacagggtacacatattgaccaaatcagggaattttgcatftgtaattttaaaaaatcifttcttfttaata  alacttttttfttatttctaataacttccctaalccttctcagggaataatgatacaatgtatcatgacctttgacacfttaagaataacagtataa  tttctgggtaaggaatagcaatatttctgcatataaataatttctgcatataaattgtaactgatgtaagaggfttcatattgctaatagcagctacaatccagcta  ccattctgctftttttctggttgggataagctggtatttctgagccaagctaggccctttgctaacttctgcatatacttcttctctccacagctcctgg  gcaacctgctgctctctgctggtcccatcactttggcaaaagcacgctgcccacatggcgtgctctgggtctctacagctcctcactcctctgctg  gaagccaatccaatgctaccagctccagctccagatccagagatttgaagacagaggcgaaggggaaggtcgaacaacagttatctccaagatg</p>	<p>30</p> <p>40</p>

	<p>ctattcgtgaaccatctggaggttccagctgccgacaaccaactcaacaaccaattcagccaccaaataacagctaataaccctgatgaaccacc  acacaaccaccacagagcccaccaccaaccaccatccaaccaccaaccaactaccagctccaacagattctctaccagcccactactggg  tcctctgccagacctgtactctctgctgactggagagtcattcaacagagccggttgggggatgcttggtagattctccctgaagctctaccac  gccttctcagcaatgaagaaggfaggaccaacatggcctttcccaltcagcatcgcagcctcctaccaggtcctcctggggctgggagaacac  caaaacaaactggagagcatcctctcttaccccaaggacttcacctgtgtccaccagccctgaagggttcacgaccaaaaggtgcacctcagctctc  agatttccacagcccagacctggccataaggacaccttggatgctctcggaccctgtacagcagcagccccagagctcctaagaacaacagtga  cgcaactfaggctcatcaacactgggtggccaagaacaccaacaacaagatcagccggctgctagacagctgccctccgatacccgccttgcctc  ctcaatgctatctacctgagtgccaagtggagacaacattgatccaagaaaaccagaatggaaccccttacttcaaaaactcagttataaaagtcca  tgatagaatagcaagaagtacctgtgcccattcattgaccaaaacttgaagccaaggtggggcagctgcagctctcccacaatctgatttggatcct  ggtaccccagaacctgaacatcgtcttgaagacatggaacaggctctcagcccttctgttttcaaggccatcatggagaaactggagatgccaagtcca  gcccactctctaactaccccgatcaaaagtacaccagccagatagctctcaatcagggagaaattggaattctcattttctatgacctaacct  gtgtgggctgacagaggacctgatctfagcttctgcatgacagcaccagacagctgtggaactgacagagactgggggtggagggcctgcagcctc  cgccatctgtggcccgcacctgctgttgaagtgcagcagccctctctctgctcctggaccagcagcaaatgctcctctctatggggcga  gtatagaccaccagggcctgaagatctagagctgaattctgacagcaggggatcagcctctactgtgcttctagtgcagccatctgttggctccctc  ccccctgctcctgacctggaaggtgcccactcccactgctcttctcaataaaatgaggaattgcatcattgtctgagtaggtctattctattgggg  ggtggggggggcagacagcaagggggaggattgggaagacaatagcagcagctgggatgagtgaggctctatggcttctaggcagaaaaga  accagctggggctcagatccactagggccgcaggaaccctagtgatgagttggccactccctctctgcccctcgtcgtcactgagccggggcg  accaaaagctgccgaccccggcttggcccggcgccctcagtgagcagcagcagcgcag</p>	10
5	<p>ctgcgctcgtcctcactgagcccccgggcaagcccggcgccctcagtgagcagcagcgcgagcagagaggagtgccaactccatca  ctaggggtctcctcggcctagtagctcagaggcacacagaggttctgggctcaccctgcccctccaaccctcagttccatcctcagcagctgtt  gtgtgctcctcgaagtcacactgaacaaactcagcctactatgtccctaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacacacagccctcc  ctgctgctgacctggagctggggcagaggtcagagacctctgcccctgcccactccaacatccactcagcccctggaaattcgggtgagagga  gcagaggttctcctggcgtggttaggtgtagtgtagaggggtaccgggatctgctaccagtggaaacagccactaaggattctcagtgagagcagag  ggccagctaaagtgactctcccagagactgtctgactcaccccccctccactggacacagcagctgtggttctgagccaggtacaatgactcct  ttcggtaagtgagtggaagctgtacactcccaggcaagcgtccggcgagctagggggcgactcagatcccagccagtgacttagccccgttt  gtcctccgalaactggggtgacctgggttaataatcaccagcagcctccccctgcccctctgcatccactgcttaaalacggagcagagggccctg  tctcctcagcttcagccaccactgacctgggacagtgaaatagatcctgagaactcagggtagtctatgggacctgattgtttcttccccttcttct  atggttaagltcatgtcataggaaggggagaagtaacagggtacacatattgaccaaatcagggttaatttgcattgtaatttaaaaaatgttcttcttaaat  atactttttgttacttatttctaatacttccctaactcttcttctcagggcaataatgatacaatgatcatgcctcttgcaccattctaaagaataacagtataa  ttctgggtaaggcaataatctcgcataataatctctgcataaaatgtaactgatgtaaggttctatattgctaataagcagctacaatccagctc  ccatctgcttatttctggtgggataaggctgaltattctgagtcacaagctagggcccttctgtaacttcttcaacctcttacttcccacagctcctgg  gcaacctgctgtctctctgcccatacttggcaagcacgctgcccacatgaggctcggctggggagccctgctgctcgcctcctgggg  ctgtgtctggtaataatctaccagctccagctcccagatccagagattgcaagacagaggcgaagggaaggtcgaacaacagttatctcca  agatgctattctgtaaacctcctggaggttccagctgcccacaaccaactcaacaaccaatcagccaccaaaaataacagctataaccactgatgaac  ccaccacacaaccaccacagagcccaccaccaaccacatccaaccaccaaccaactaccagctccaacagatctcctaccagcccacta  ctgggtcctctgcccagacctgtactctctgctgacttggagagtcattcaacagggcctgttgggggatgcttggtagatttctcctgaagetct  accagcctctcagcaatgaagaaggfaggagaccaacatggccttctcccaltcagcagcctcctfaccaggtcctgctcggggctgggggag  aacacaaaacaaactggagagcctcctcttaccccaaggacttcacctgttccaccagccctgaaggctcagaccaaaggtgtcacctcag  ctctcagatttccacagcccagacctggccataaggacaccttggatgctctcggacctgtacagcagcagccccagagctctaagcaacaaca</p>	20 30 40

10

20

30

40

50

	<p>gtgacccaacttgagctcatcaacacctgggtggccaagaacaccaacaacaagatcagccggctgctagacagctctgccctccgatacccgcttgc cctcctcaatgctatctacctgagtgccaagtggaagacaacatftgatcccaagaaaaccagaatggaacctttcacttcaaaaaactcagttataaaagt cccatgatgaatagcaagaagtaccctgtgcccatttcattgaccaaaacttgaagccaaggtggggcagctgcagctctcccaaatctgagtttgggtg atcctgtgtaaccagaacctgaacatcgtcttgaagacatggaacaggctctcagccctctgtttcaagccatcatggagaaactggagatgccaag ttccagcccactctctaactacccccgatcaaaagtacgaccagccagatgctctcaatcatggagaaattggaattctcgaattttctatgacctta acctgtgfggctgacagaggacctgatctcagggttctgcatgagcaccagacagtgctggaactgacagagactggggggaggcgctgcag cctcccatctctgtgcccgcacctgctgtcttgaagtgcagcagccctctctctgtctctggaccagcagcaaaagtccctgtcttcatggg ggcagtatatgacccagggcctgaagatctagagctgaaltctgcagccaggggagcagcctctactgtgcttctagtgccagccatctgtttg cctcccccttgccttcttgacctggaaggtgccactccactgtcttcttaataaaatgagaaattgcaicacattgctgagtaggtctatttct gggggggtggggggggcagcagcaagggggaggattgggaagacaatagcagccatgctggggatgagtgggctctatgcttctgaggcaga aagaaccagctggggctgagatccactagggccgaggaaccctagtgatggagttggccactcctctctgcgctcctcactgagggcg ggcgaccaaaagtgccccagccccggccttggccggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgag</p>	<p>10</p>
<p>6</p>	<p>ctgcgctcgtctcactgagcgccccggcacaagccccggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgagagaggagtgccaactccatca ctaggggtctctgcccctagtaggctcagaggcacacaggagttctgggctcaccctgcccccttcaaccctcagttccatctccagcagctgtt gtgtctgctctgaagtccacactgaacaaactcagcctactcatgctcctaaaatggcacaactgcaagcagcaaacacacagccctcc ctgctctgacctfgagctggggcagagctcagagacctctggcccactccactccaactccactgacctctgaaattctgagagagga gcagaggtgtctctgctggttttaggtagtgtagaggggtaccgggatctgtctaccagtggaacagccactaaggattctcagtgagagcagag ggccagctaagtggtactctccagagactgtctgactcagcccccctcacttgacacagagcgtgtgtttctgagccaggtacaatgactcct ttcgtaagtgagtggaagctgtactctcccagcgaagcgtccggcgagctgagcggcgactcagatccagccagtgacttagccctgttt gtctcctcgataactgggtgaccttggtaaatatccaccagcagcctccccgttccccctctgatccactgttaataacggagcagggccctg tctctcagctcagccaccactgacctgggacagtgaatagatctgagaactcagggtagtctatggacccttgatgtttcttccccctttct atggttaagttcatgcataggaaggggagaagtaacagggtacacafatgaccaaatcagggttaattttgattgtaatttaaaaaatgcttctctttaa atacttttcttcttcttcttaacttccctaactcttcttccaggaataatgatacaatgatacatgcttctgaccacttaagaataacagtgataa tttctggftaaggcaatagcaatatttctgcatataaatttctgcatataaattgtaactgatgtaagaggttcatattgctaatagcagctacaatccageta ccattctgtttattttctggtgggataaggctggtgatttctgagccaagctagcccctttgctaactctgttatacctcttactctccacagctcctgg gcaacctgctgtctctctgcccactcttggcacaagcagcgtgccaccatgagggagcctcggggccctgctctgtctgagcgcctgctctgg cggtgagcgtcaatccaatgctaccagctccagctccaggtccagaggtttgcaagacagaggcgaagggaaggtcgcaacaacagttatctcca agatgctatcgtgtaaccatctggagggttccagcttcccgacaaccaactcaacaacaaatcagccacaaaataacagctaataccactgatgaac ceaccacacaaccaccagagcccaccaccaaccacatccaaccaccaactaccagctcccaacagattctcctaccagcccacta ctgggtctctctcccagacctgtactctctctgacttggagagtcattcaacagaggcgtgttgggggatcttggtagatttctccctgaaagtct accacgcttctcagcaatgaaaggtggagaccaaatggccttttccccattcagcatcggcagcctcttaccaggctctgctcggggctgggggag aacacaaaacaaactgagagatcctctcttaccaccaagacttaccctgtfcccaccagccctgaaggcttcacgacaaaaggtgtcactcag ctctcagatttccacagcccagacctggccataaggacaccttggtaatgctctcggaccctgtacagcagcagccccagagctcaagcaacaaca gtgacccaacttgagctcatcaacacctgggtggccaagaacaccaacaacaagatcagccggctgctagacagctctgccctccgatacccgcttgc cctcctcaatgctatctacctgagtgccaagtggaagacaacatftgatcccaagaaaaccagaatggaacctttcacttcaaaaactcagttataaaagt cccatgatgaatagcaagaagtaccctgtgcccatttcattgaccaaaacttgaagccaaggtggggcagctgcagctctcccaaatctgagtttgggtg atcctgtgtaaccagaacctgaacatcgtcttgaagacatggaacaggctctcagccctctgtttcaagccatcatggagaaactggagatgccaag ttccagcccactctctaactacccccgatcaaaagtacgaccagccagatgctctcaatcatggagaaattggaattctcgaattttctatgacctta acctgtgfggctgacagaggacctgatctcagggttctgcatgagcaccagacagtgctggaactgacagagactggggggaggcgctgcag</p>	<p>20 30 40</p>

10

20

30

40

50

	<p>cctccgccatctctgtgccccgaccctgctgtctttgaagtgcagcagcccttctctctgtctctggaccagcagcacaagtccctgtcttcatggg  gcgagfatafgacccccaggcctgaagatctagagctgaattctgcagccagggggatcagcctctactgtccttctagtgtccagccatctgttfttgc  ccctccccctgcttcttaccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcatcacattgtctgagtaggtgctattctatct  gggggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggallgggaagacaatagcagcagctgtggggalgcagtgggctctatggcttctgaggcaga  aagaaccagctggggctcagatccactaggccgaggaaccctagtgtatgagttggccactccctctctcgcgctcgtctcactgagggccg  ggcgaccaaaaggtcggccgacggccggcttggccggggcctcagtgagcagcagcgcgcag</p>
7	<p>ctgctcgtctcgtctcactgagggcccccgggcaaaagccggcgccctcagtgagcagcagcgcgcagagaggagggtggccaactccatca  ctaggggttctcggcctagttaggctcagaggcacacaggagttctggctcacctgccccctccaaccctcagttccatcctccagcagctgttt  gtgtgctcctctgaagtcacactgaacaaattcagcctactcatgtccataaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacacacagccctcc  ctgctcgtcagcttggagctggggcagaggtcagagacctctctggcccatgccctccaacatccactcagcccttggaaattcgtgtggagagga  gcagagggttctcctggcgtggttaggtgagtgagagggtaccggggatcttctaccagtggaaacagccactaaggattctcagtgagagcagag  ggccagctaagtggactctccagagactgtctgactcacgccccctccacttggacacagggacgctgtgttctgagccaggtaaatgactcct  ttcggtaagtgcagtggaagctgtactgcccagcaaaagcgtccggcagcgtagggggcactcagatccagccagtgacttagccctgtt  gctcctcggataactggggtagcttggtaataatcaccagcagctccccgttggccctctggatccactgcttaaatcggacgaggacagggccctg  tctcctcagctcagccaccactgacctgggacagtgaatagatcctgagaactcagggtagtctatggaccctttagtttcttcccccttttct  atggttaagttcatgcataggaaggggagaagtaaacagggtlacacatitgacaaatcagggtaafttgcatttgaatitaaaaaatgcttcttctttaa  atactttttgtttatctatttctaactttccctaactcttcttctcagggcaataatgatacaatgtatcatgcctcttgcaccattcfaaagaataacagtataa  ttctgggttaaggcaatagcaatattctgcataaaatattctgcataaaatgtaaactgatgtaagaggttcatattgtaatgacagctacaatccagcta  ccattctgttttatttctgttgggataagctgattattctgagctcaagctagggccctttgctaacttctgttcatacttattcttccccacagctcctgg  gcaacctgctgtctctctgctggccatcatttggcaaacgacgctgcccacatggcggccccggcagcggccggaccctgctgctgactg  ctgtgtctgctcctggcctcatgcttctgctcagcaaatccaaatgctaccagctccagctcccagatccagagagtttgcagacagaggcgaagg  gaagctgcacaacagttatctcaaatgctattctgtgaacctctctgaggttccagcttgcgacaaccaactcaacaaccaatcagccacaa  aataacagctaataaccatgatgaaccaccacacacaccaccacagagccaccaccaaccacatccaaccaccaaccaactaccagctccc  aacagattctctaccagccactactgggtccttctcccaggacctgttactctctctgacttggagagcttcaacagagggcgtgtgggggat  gctttggtagatttctccctgaagctctaccagccttctcagcaatgaagaaggtggagaccaatggcctttccccattcagcatcggcagcctcttac  ccaggtctctcgggctggggagaacacaaaacaaacctggagagcactctcttaccaccaaggacttacctgttccaccagggcctgaaggg  cttaccagcaaaaggtgtacacctgctctcagatttccacagccagacctggccataagggacaccttggtaatgctctcggaccctgtacagcag  cagccccagagcttaagcaacaacagtgacgcaacttggagctcatcaacctgggtggcgaagaacaccaacaacaagatcagccggctgctag  acagctcctccgatacccgcttctcctcaatgctatctactgagtgccaagtgaagacaacattgatcccaagaacaccagaatggaacctt  tcaactcaaaaactcagttataaaagtcccatgatgaatagcaagaagtacctgtggccatttcaatgacaaaacttgaagccaaggtggggcagctg  cagctctcccaactgagtttggatctggttaccaccagaacctgaaacatcgtcttgaagacatggaacaggtctcagccctctgtttcaaggccat  catggagaactggagatgccaagttccagcccactctcctaactaccgcatcaaatgacgaccagccagatgctctcaatcatggagaaat  tggaaftctcgaftttctatgaccttaacctgtgtggctgacagaggacctgactcaggttctgcatgacagaccagacagctggaactgacag  agactgggggtggagcggctgagcctccgcatctctgtgcccgcacctgctgcttgaagtgcagcagccctcctctctgctctggaccag  cagcacaagttccctgtctcatggggcagatatafgacccaggcctgaagatctagagctgaattcctgcagccaggggatcagcctctactgtgcc  ttctagttccagccatctgttfttggccctcccccttgccttcttaccctggaaaggtgccactcccactgcttctcctaataaaatgaggaaattgcatca  cattgtctgagtaggtcattctattctgggggtgggggtggggcagcagcaagggggaggattgggaagacaatagcagcagctgtggggatgca</p>

10

20

30

40

	<p>gtgggctctatgctctgagcgagaagaaccagctggggctcgagatccactaggccgaggaacccctagtgatggagtggccactccctctctg  cgcgctcgtcgtcactgagccggcgaccaaaggctgcccagccggccttggcccggcgctcagtgagcgagcgagcgagcgcag</p>
8	<p>ctgcccgtcgtcgtcactgagggccgcccgggcaaaagcccggcgccctcagtgagcgagcgagcgagcgagagggagtggccaactccatca  ctaggggttctgctgagcctagtaggctcagagggcacacagaggttctggctcaccctgcccctccaacccctcagttccatctccagcagctgttt  gtgtgctgctctgaaagtcacactgaacaaactcagcctactcatgtccctaaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaaacacacagccctcc  ctgctgctgacctggagctggggcagaggtcagagacctctctggccatgccacctcaacatccactgaccccttggaaattcgggtggagagga  gcagaggttctctggcgtgtttaggtagtgtagaggggtaccggggtcttctaccagtgaacacccactaaggattctcagtgagagcagag  ggccagctaaagtgactctccagagactgtctactacgcccacccctccacctggacacagagcgtgtgttctgagccaggtlacaatgactcct  ttcggtaagtgcagtggaagctgtactctcccaggcaaaagctccggcagcgtagcggcgactcagatccagccagtgacttagccctgttt  gtcctctcgataactgggtgacctgttaataatccaccagcagcctccccgttcccctctggtaccactgctfaaatagcagagggagagggccctg  tctctcagctcagccaccactgacctgggacagtgatagatcctgagaactcagggtgagctatgggacccctgatgtttcttccccttctttct  atggtlaagtcatgcatagaaggggagaagtaacaggttacacataatgaccaaatacagggttaatttgcatttgaatttlaaaaaatgcttcttcttaat  atacttttggttatcttaacttccataacttccataacttcttctcaggcaataatgatacaatgtatcctcttggcaccattctaaagaataacagtgataa  ttctgggttaagcaatagcaatatttctgcatataaatttctgcatataaattgtaactgatgaaggttcatattgctaatagcagctacaatccagcta  ccattctgttttatttctgttgggataagctggattattctgagccaagctaggccctttgctaacttctcatacctttatctctcccacagctcctgg  gcaacctctgctctctctgcccacacttggcaaaagcagcgtgcccacatggaaccagctgctgctgcaacttccctccagcctccctctc  ctcctctgctcctcctctctcagcctgtgtcactggtctcagccaalcaaatgtaccagctccagctcccagatccagagagtttcaagacagag  gcaaggggaaggtgcaacaacagttatctccaagatgctattcgttgaacctatcctggagggttccagcttccgacaaccaactcaacaacaatcag  ccacaaaataacagctaataccactgatgaaccaccacacaaccaccacagagcccaccaccaaccacatccacccaaccaactacc  cagctcccaacagattctctaccagcccactactgggtcctctgcccaggacctgtactctctgctgacttgagagtcattcaacagagccggtt  gggggatgcttggtagatttctcccgaagctctaccacgctctcagcaatgaagaaggtggagaccaacatggccttttcccattcagatcggcagc  ctcttaccaggtcctgctcggggctgggggagaacacccaaaacaaacctggagagctctcttaccaccaaggacttccctgtgtccaccagggcct  gaagggctcagaccaaaggtgtcaccctcagctctcagatftccacagcccagacctggccataaaggacaccttftgtaatgctctcggacctgta  cagcagcagcccagagtcctaaagcaacaacagtgacccaactggagctcatcaaacctgggtggccaagaacaccaacaacaagatcagccgg  ctgtagacagctgcccctccgataccgcttctctcctcaatgctatctacctgagtgcaagtggaagacaacatttgatccaagaaaaccagaatg  gaaccttctactcaaaaactcagttataaaagtcccatgatgaatgcaagaagtacctgtggccatttcaatgacaaaacttgaagcaaggtgg  ggcagctcagctctcccacaactgagttgggtgctctggtaccaccagaacctgaacatcgtcttgaagacatggaacaggtctcagccctctgtttc  aagccatcatggagaaactggagatgtcaagttccagcccactctcctaactaccgcatcaagtgacgaccagccagatgctcctcaatcat  ggagaaatggaattctgattttcttatgaccttaacctgtgtggctgacagagggacctgatctcaggtttctgcatgagcaccagacagtgctgg  aactgacagagactgggtggagggcgtcagcctccgccaalctgtggcccgcacctgctgttgaagtgacagccctctctctcgtgctc  gggaccagcagcaaaagttccctgtctctatggggcgagtataatgaccccagggcctggaagatctagagctgaattcctgagccagggggatcagcctc  tactgtcctctagtgccagccatctgttttggcccctcccccttgccttctgacctggaaggtgccactcccactgtccttctataaaaatgaggaa  attcatcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggtgggtggggcagcagcaagggggaggattgggaagacaatagcagggatgctg  gggatgagtgggctctatggcttctgagcgagaaagaaccagctggggctcagatccactaggccgaggaaccctagtgatggagttggccact  ccctctctcgcgctcgtcgtcactgagccggcgaccaaaggctgcccagccggccttggcccggcgccctcagtgagcgagcgagcgcg  gcag</p>
9	<p>ctgcccgtcgtcgtcactgagggccgcccgggcaaaagcccggcgccctcagtgagcgagcgagcgagcgagagggagtggccaactccatca  ctaggggttctgctgagcctagtaggctcagagggcacacagaggttctggctcaccctgcccctccaacccctcagttccatctccagcagctgttt</p>

10

20

30

40

50

	<p>gtgtgctgcctctgaagtcacactgaacaaactcagcctactcatgtccataaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaaacacacagccctcc  ctgcctctgaccttggagctggggcagaggtcagagacctctctgggccatgccacctccaacatccactgaccccttggaafttcggtggagagga  gcagaggttgcctggcgtggttaggtagtgtagaggggtaccggggatctgtctaccagtggaacagccactaaggattctgcagtgagagcagag  ggccagctaagtggtactctccagagactgtctgactcacgcccccctccacttggacacagggacgtgtgttctgagccaggtaaatgactcct  ttcgtaagtgcagtggaagctgtacactgcccaggcaaagcgtccggcagcgtagggcggcactcagatcccagccagtgacttagccctgttt  gctcctccgataactgggtgaccttggtaataatccaccagcctccccctggccctctggatccactgcttaatacggacgaggacagggccctg  tctcctcagctcagggaccaccactgacctgggacagtgaatagatcctgagaactcaggggtgagctctatgggaccttgatgtttcttcccccttttct  atggtaagtcatgtcataggaaggggagaaagtaacaggggtacacataftgaccaaatcagggtaatttgcatttgaatttaaaaaatgctttctttaa  atactttttgttacttatttctaacttccctaactcttcttccaggcaataatgatacaatgtatcctcttggcaccattcaagaalaacagtataa  ttctgggttaagcaatagcaatattctgcataataatattctgcataataatgtactatgtaagaggtttcatattgctaatagcagctacaatccagcta  ccattctgtttatttctgttgggataagcgtgattattctgagtcaggatagccctttgctaattctgttcatacctcttcttccccacagctcctgg  gcaacctgctgtctctctgctgcccacttctgcaaagcacgctgcccactgtgctgcttggctgtgttcttctgggtcccagatgtttg  ctaatacaatgtaccagctccagctccaggatccagagagtttgaagacagagggcaagggaaaggtcgaacaacagttatccaagatgtcttcc  gtgaacccactcggaggttccagcttccgacacaaactcaacaacaaatcagccacaaaalaacagctaatacactgatgaaccaccacaca  accaccacagagcccaccaccaaccaccatccaaccaccaactaccagctcccaacagattctctaccagcccactactgggtcctc  tccccagacctgttactctctgctgacttgagagctcaacagagccgtgttggggatgcttggtagatttccctgaagctctaccagcctc  tcagcaatgaaagaggtggagaccaacatgcccctttccccattcagatcgcagcccttaccaggtcctgctcgggctggggagaaacacaaaa  caaacctggagagctcctcttaccccaagacttccctgtgtccaccagccctgaagggcttcacgaccaaaaggtgtcacctcagctctcagattt  ccacagcccagacctggccataagggacaccttggtaatgcctctcggacctgtacagcagcagccccagagctcaagcaacaacagtgacccaa  cttggagctcatcaacacctgggtggccaagaacaccaacaacaagatcagccggctgtagacagctctccctccgatacccctgtcctcctcaatg  ctatcactcagtgccaagtggagaacaacattgatcccaagaaaaaccagaatggaacccttcaactcaaaaactcagttataaaagtcccatgatgaa  tagcaagaagtacctgtgcccatttcatgaccaacttgaagccaaggtggggcagctgcagctctcccacaatctgagtttggtagctgtgtaacc  cagaacctgaaacatcgtctgaagacatggaacagcctcagccctctgttttcaagccatcagagaaactggagatgccaagtccagcccact  ctcctaactactcccgcataaagtgcagcaccagccagatgctctcaatcatggagaaattggaattctcgtattttcttatgaccttaacctgtggg  ctgacagagaccctgatctcaggttctgctgacgaccagacagctgctggaactgacagagactgggtggagcggctgcagcctccgcatc  tctgtgcccgcacctgtgctgttgaagtgacgagccctctctctgctctggaccagcagcaaaagttccctgtctctatggggcgatgatag  accccagggcctgaagatctagagctgaattcctgcagccaggggagcagcctctactgtgcttctagtgtccagccatctgtttgtccccccccct  gcttcttaccctggaaggtgcccactcccactgctcttctaataaaatgaggaattgcatcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggtgg  ggtggggcagcagcaagggggagattgggaagacaatagcagggcatgctggggatgagtggtgctctatggtctctgagcagaagaaccag  ctgggctcagatccactagggccgaggaaccctatgtatggaggtggccactcctctctgctgctcctcactgagggcggcgaccaa  aggtcgcggcagcccggcttggcccggcggcctcagtgagcagcgagcgcgag</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
<p>10</p>	<p>ctgcgctcgtcgtcactgagcccccgggcaaaagcccggcggcctcagtgagcagcagcgcgagagaggagtgccaactccatca  ctaggggttctcggcctagtagctcagagggcacacagaggttctgggtcaccctccccctcaacccctcagttccatctccagcagctgtt  gtgtctgcctctgaagtcacactgaacaaactcagcctactcatgtccataaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaaacacacagccctcc  ctgcctctgaccttggagctggggcagaggtcagagacctctctgggccatgccacctccaacatccactgaccccttggaafttcggtggagagga  gcagaggttgcctggcgtggttaggtagtgtagaggggtaccggggatctgtctaccagtggaacagccactaaggattctgcagtgagagcagag  ggccagctaagtggtactctccagagactgtctgactcacgcccccctccacttggacacagggacgtgtgttctgagccaggtaaatgactcct  ttcgtaagtgcagtggaagctgtacactgcccaggcaaagcgtccggcagcgtagggcggcactcagatcccagccagtgacttagccctgttt  gctcctccgataactgggtgaccttggtaataatccaccagcctccccctggccctctggatccactgcttaatacggacgaggacagggccctg</p>	<p>40</p>

10

20

30

40

50



	<p>ctgctgctcttgcacaaatgctaccagctccagctccagagagagttgcaagacagagcggaagggaaggtcgcaacaacagttatctc  caagatgctatctgtaaacctcctgaggtttccagcttccgacaaccaactcaacaaccaattcagccacaaaataacagctaataaccctgatga  accaccacacaaccaccagagcccaccaccaaccacatccaaccaccaaccaactaccagctcccacagatttctctaccagccca  ctactgggtcctctgcccagacctgttactctctgctgacttgagagagcattcaacagagccgttgggggatgctttgtagatttccctgaagc  tctaccagcctctcagcaatgaaaggtgagaccaacatggcctttcccattcagcctccagcctcttaccagctcctgctcgggctggg  gagaacacaaaacaaactggagagcctctcttaccacaagacttaccctgtgtccaccagccctgaagggttcacgaccaaaaggtcacct  cagtctctcagatttccacagcccagacctggccataaggacaccttggtaatgctctcggacctgtacagcagcagccccagagcctaagcaac  aacagtgacgccaactggagctcatcaacacctgggtggccaagaacaccaacaacaagatcagccggctgtagacagltgcccctccgataccgc  cttctcctctcaatgctatctactgagtgccaagtggagacaacattgatcccaagaaaacagaatggaaccttctactcaaaaactcagttataa  agtgcccagatgaaatgcaagaagttaccctgtggccatttctaccacaaacttfgaaaagcaaggtgggagcagctcagctctcccaaatctgattf  gggtgatctggatccccagaacctaagaacatgcttgaagacatggaacagcctctcagccctctgtttcaaggccatcagagaactggagatgc  caagttccagcccactctcaactaccctccatcaaaagtacgaccagccagatgctctcaatcagagaaatggaaattctgattttctatga  ccttaacctgtgtggctgacagagaccctgatctcaggttctcagatgagcaccagacagtgctggaactgacagagactggggtggagcggct  gacgctccgccaatctgtggcccaccctgctgcttgaagtgcagcagccctctctctgctcctggaccagcagcaaaagttccctgtctca  tggggcagtatatgacccagggcctgaagatctagagctgaattcctcagccaggggatcagcctctactgtcctctagtgtccagccatctgtg  ttgccctccccctgctccttaccctggaaaggtgcaactccactgctcttcaataaaatgagaaatgcatcactgtctgagtaggtgctatct  attctgggggtgggggtgggagcagcaagggggaggtgggaagacaatagcagcctgctgggatgagtggtgctctatgctctgaggg  cagaagaacaccagctgggctcagatccactagggccgaggaaccctagtgatggagttggcactccctctctcgcgctcgtcctcactgag  gcccggcgaccaaaaggtgcccagcggcgttggcccggcggcctcagtgagcagcgagcgcgcag</p>	<p>10 20</p>
<p>12</p>	<p>ctgcgctcgtcctcactgagcccccgggcaaaagcccggcgccclcaglgagcagcagcgcgcagagagggagtgccaactccatca  ctaggggttctcggcctagtagctcagaggcacacagggfcttgggctcaccctgccccctccaaccctcagttccatctccagcagctgtt  gtgtgctcctctgaagtcacactgacaacactcagcctactcagctcctaataatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaaacacacacccctcc  ctgctctgaccttgagctgggagcagagctcagacctctctggccctcaccctccaacatccactcagcccttgaatttgggtgagagga  gcagaggttctcctggctgtggtttagtagtgtagagggglaaccgggagcttctaccagtggaacagccactaaggattctcagtgagagcagag  ggccagctaaagtgactctccagagactgtctgactacgccccccctcaccctggacacagagcctgtggttctgagccaggtacaatgactcct  ttcgtaagtcagtggaagctgtacactgcccagggcaagcgtccgggagcgtagggcgactcagatccagccagtgacttagcccctgtt  gctcctccgataactggggtgacttgtaataatccaccagcagcctccccgtgcccctctgagcactgcttaataacggagcagagagggccctg  tctcctcagctcagcaccaccactgacctgggacagtgaaatagctcctgagaactcagggtagtctatggacccttgatgtttcttcccccttttct  atggttaagttcatgcataggaaggggagaagtaacagggtaacacatattgaccaaactcagggtaatttgcatttgaatttaaaaaatgcttctctttaa  atactttttgttatcttaatttaatacttccctaactcttctcagggcaataatgatacaatgatcatgctcttggaccatttaaaagataacagtgataa  ttctgggttaaggcaatagcaatattctgcataataatctgcataataatgtaactgatgtaagaggttcatattgctaatagcagctacaatccagcta  ccattctgcttttattctgtggtgataaggtgattatctgagtcgaagctaggccctttgctaactctgttcaaccttctctccacagctcctgg  gcaacctgctggtctctctgctggccatcatttggcaagcagcgtgccaccatgaagtcctctgctcctcttcttctcagctctgggctgccc  actcaaatcaaatgctaccagctccagctcccagatccagagagtttgaagacagagcgaagggaaggtcgaacaacagttatctcaagatgct  attctgtaacccactcctggaggttccagcttggcacaaccaactcaacaaccaattcagccacaaaataacagctaataccactgatgaacccaccac  acaacccaccacagcccaccaccaaccacatccaaccaccaaccaactaccagctccaacagattctctaccagcccactactgggtc  cttctgccagacctgtactctctctgacttgagagctcattcaacagagccgtgttggggatgcttggtagatttccctgaagctcaccagc  cttctcagcaatgaaaggtggagaccaacatggcctttcccattcagcctccagcctccttaccagctcctcctcgggctgggagacaacca  aaacaacctggagagcctctcttaccacaaggactcactgttccaccagccctgaagggttcacgaccaaaaggtgcacctcagctctcag</p>	<p>30 40</p>

10

20

30

40

50

	<p>atftccacagcccagacctggccataaggacacctfttgtaatgctctcggacctgtacagcagcagcccagagctctaagcaacaacagtacg  ccaacttgagctcatcaacctgggtgccaagaacaccaacaacaagatcagccggctgtagacagctfcccctccgataccccccttctctctc  aatgctatctacctgagtgccaagtgaagacaacatftgatcccaagaaaaccagaatggaaccttctactcaaaaactcagttataaaagtgccatga  fgaatagcaagaagtacctgtgcccatttcaaacatftgaaagccaaggtggggcagctgcagctctcccacaatcagtttggtgatcctggt  accccaagaacctgaaacatctgttgaagacatggaacaggtctctcagccctctgttttcaaggccaatcaggaacacfggagatgccaagttccaacc  cactctcctaactaccccgcataaagtacgaccagccagatgatgctctcaatcatggagaatggaattctctgattttctatgacctaacctggt  ggctgcagacagagacctgatctcaggttctgcagcagcaccagacagctgctggaactgacagagactgggggagggcggctgcagcctccgc  catctctgtgcccgcacctgctggtcttgaagtgcagcagccctctctctgctctggaccagcagcacaagttccctctctcatggggcagta  fatgaccccaggcctgaagatctagagctgaattctgcagccagggggatcagcctctactgtgctctagttgccaccatctgtttgcccctccc  ccttgcctctgacctggaaggtgccactcccactgctcttctataaaaaagagaaattgcatcattctctagtaggtcattctattctgggggg  tggggtggggcagacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctgggatcagctgggctctatgctctgagggcagaaaagaacc  agctgggctcagatccactagggccgcaggaacccctagtgatggagttgccactcccctctctgcgctcctcactgagggccggcgacc  aaagtgcccgcaccccgggctttgcccggcgccctcagtgagcagcgagcgcgag</p>	10
13	<p>ctgcgctcgtcctcactgagcggcccggcgaagcccggcgccctcagtgagcagcagcgcagagagggagtgccaactccatca  ctaggggttccggcctagtagctcagagccacacagagttctgggctcaccctgccccctccaaccccagttccatectccagcagctgltt  gtgctgctcctgaagtccacactgaacaaactcagcctactcatgtccctaaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacacagcccctcc  ctgctctgaccttgagctgggagagctcagagacctctctggccatgccacctcaacatccactgaccttggaaattcgtggagagga  gcagaggtgctctgctggtttagtagtgtagaggggtaccggggtcttctaccagtggaacagccctaagattctcagtgagagcagag  ggccagctaaagtggfacctccagagactgtctactacgccccctccacctggacacagcagcgtgtgtttctgagccaggtacaatgactcct  ttcgtaagtgcagtggaagctgtactgcccagcgaagcgtccggcagcgtaggcgggactcagatcccagccagtgacttagcccctgtt  gtcctcagataactggggtgacctggttaataatcaccagcagcctccccgttggccctctggatccactgcttaataacggagcagggcctctg  tctcctcagctcagcaccaccactgacctgggacagtgaaatagatcctgagaactcaggggtgagtctatgggacctgtggtttcttcccccttttct  atggttaagttcatgcataggaaggggagaagtaacaggggtacacataatgaccaaatcagggttaatttgattgtaatttaaaaaatcttcttcttaat  atactttttggtatctatfttaataatcttccataatctcttctcagggcaataatgatacaatgtatcatgctcttggcaccattcaagaataacagtataa  ttctgggttaagcaatagcaatatttctgcatataaatttctgcatataaattgtaactgatgaaaggtttcatattgctaatagcagctacaatccagcta  ccattctgctttatitctggtgggataagctggtatttctgagtcgaagctagccctttgtctaacttcttatacctcttacttctcccagctcctgg  gcaacctctggtctctctgctgcccacacttggcgaagcagcgtgccaccatgaagttccctgtggtggccctggcctctgctggttctctgtg  gagcagctcagggccaatccaatgtaccagctccagctcccagatccagagagttgcaagacagagcgaaggggaaggtcgaacaacagtta  tctcaagatgctatctgtaaacctcctggagggttccagcttccgacaaccaactcaacaaccaatcagcccaaaaataacagctaataccactga  tgaaccaccacacaaccaccagagcccaccaccaaccaccatccaaccaccaaccaactaccagctccaacagattctctaccagcc  cactactgggtcctctgcccagacctgtactctctctgactggagagctcaatcaacagagccgtgtgggggagctttgtagatttccctgaa  gctctaccacgcctctcagcaatgaagaaggtggagaccaacatgacctttcccattcagcatcggcctccttaccaggtcctgctcgggctgg  ggagaacacaaaaaacctggagagcactctcttacccaaggacttctctgttccaccagccctgaagggtctcagaccaaaaggtgtcacc  tcagctctcagattttccacagcccagacctggccataaggacaccttggtaatgctctcggacctgtacagcagccccagagctcctaagcaac  aacagtgcgccaactggagctcatcaaacctgggtggccaagaacaccaacaacaagatcagccggctgtagacagtctcctccgataaccgc  ctgtctctcaatgctatctactgagtgccaagtggaaacaacattgatccaagaacccaagatggaaccttctactcaaaaactcagttataaa  agtgcccagatgaaatgaagaagttaccctgtggcccatttcatgaccaactttgaaagccaaggtgggagcagctcagctctcccacaatctgagttt  ggfctcctggtaaccagaacctgaaacatcgtcttgaagacatggaacaggtctcagccctctggtttcaaggccatcaggaacactgagatgct  caagttccagcccactctcaactaccccgatcaagtacgaccagccagatgctctcaatcatggagaatggaattctcgaatttcttatga</p>	20 30 40

10

20

30

40

50

	<p> cctaacctgtgtggctgacagaggacctgatcttcaggtttctgcatgagccaccagacagtctggaactgacagagactgggtggaggcggct  gcagcctccgcatctctgtgcccgcaccctctgctcttgaagtgcagcagcccttctctgctctgaggaccagcagacaaagttccctgtctca  tggggcgagtatatgacccagggcctgaagatctagagctgaattcctgcagccagggggatcagcctctactgtcctctagtccagccatctgtt  ttgccctcccccttgcctcttaccctggaggtgccactcccactgtccttctaataaaatgaggaattgcatcattgtctgagtaggtcattct  attctgggggtgggtggggcaggacagcaagggggaggatgggaagacaatagcaggcatgctggggatgagtgggctctatggctctgagg  cagaaaagaaccagctggggctgagatccactaggccgcaggaaccctagtgatggaattggccactcctctctgctgctcactgag  gcccggcgacaaaaggtcggggacggggccttggccggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgag </p>	
14	<p> ctgctgctgctgctgctcactgaggccgccggcgaagcccggcgccctcagtgagcgagcgcgagcgagagggagtgccaactccatca  ctaggggttcctgctggcctagtaggctcagagggcacacagagtttctgggctcaccctgccccctccaacccctcagttcccatctccagcagctgtt  gtgtgctcctctgaagtcacactgaacaaactcagcctactatgtcccataaatgggcaaacatgcaagcagcaaacacacagccctcc  ctgctgtgactctgagctggggcagagggcagagacctctctgggcccagccactccaacatccactgacccccctggaaattcgggtgagagga  gcagagggtgctctgctggttaggtagtgtgaggggtaccggggctctgctaccagtggaacaccactaaggattctcagtgagagcagag  ggccagctaaagtgactctccagagactgtgactcaccccccctcaccctggacacagagcgtgtgtttctgagccaggtacaatgactct  ttcgtaagtgcagtgaagctgtacactgcccaggcaaacgctcggggcagcgtagggcggcgactcagatcccagccagtggacttagccccgtt  gctctccgataactggggtagctgtaattaccagcagcctccccctgccccctgctgacatgcttaaatcggagcagagacagggccctg  tctctcagctcagccaccactgacctgggacagtgaatagactctgagaactcaggggtgagctatgggaccttgatgtttcttcccccttttct  atggtaagtctatgcataggaaggggagaagtaacagggtacacatattgacaaatcagggtaattttgatttfaaaaaatgctttctttta  atacttttcttattcttaatacttccatactcttcttccaggcgaataatgatacaatgatcctcttgcaccactfaaagaataacagatgata  tttctgggttaagcaatagcaatattctgcatataaattttctgcatataaattgtaactgatgaagggttcatattgctaatacagctacaatccagcta  ccattctgctttttctggtgggataaggctgalltattctgagccaagctaggccctttgctaatctgttcacactctatcttctcccagctcctgg  gcaacctgctgctctctgctggccatcattggcaagcagcgtgccaccatgaagttccctggtggcgccctggccctgctgctgttctctgtg  ggctgcccacagcaatcaaatgtactcagctccaggtccaggtccagagagtttgaagcagagggcgaagggaaggtgcgaacaacagtattctc  caagatgctattcgtgaaccatcctggaggtttccagctggcagcaaccaactcaacaaccaatcagccacaaaataacagctaataccactgatga  accaccacacacaccacagagcccaccaccaaccaccatccaaccaccaaccaactaccagctccaacagattctctaccagcca  ctactgggctctctcccaggacctgttactctctgctgactgagagtcattcaacagagcgggttgggggatgcttctgtagattctccctgaagc  tctaccagcctctcagcaatgaagaagtgagaccaacatggcctttccccattcagcatcgcagcctccttaccaggtcctgctcgggctggg  gagaacacaaaacaaactggagagcctcctcttaccacaagcattcactgctgaccaccagccctgaaggctcagcaaaaaggtgtcact  cagctctcagatftccacagcccagacctggccataagggacaccttgaatgcccctcggacctgtacagcagcggcccaagctcctaaagcaac  aacagtgacccaactggagctcatcaacctgggtggccaagaacaccaacaacaagatcagccggctgtagacagtctccctccgataccggc  ctgtcctcctcaatgctatctacctgagtgccaagtggaagacaacattgatccaagaaaaccagaaatggaacctttcactcaaaaactcagttataaa  agtgccatgatgaatgcaagaagtacctgtggccattcattgacaaaacttgaagccaaggtgggagcagctcctccacaactctgagtt  ggatcctggtaccccagaacctgaacatctctgagacatggaacaggctcctcagccctctgtttcaaggccatcagagaaactggagatgctc  caagtccagcccactctcctaactaccccctcaaaagtgacgaccagccagatafctctcaatcagagaaatggaattctcattttctatga  ccftaacctgtgtggctgacagaggacctgatcttcaggtttctgcatgagcaccagacagtctggaactgacagagactgggtggaggcggct  gcagcctccgcatctctgtgcccgcaccctgctgtcttgaagtgcagcagcccttctctgctctgaggaccagcagacaaatccctgtctca  tggggcgagtatatgacccagggcctgaagatctagagctgaattcctgcagccagggggatcagcctctactgtccttctagtccagccatctgtt  ttgccctcccccttgcctcttaccctggaggtgccactcccactgtccttctaataaaatgaggaattgcatcattgtctgagtaggtcattct  attctgggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggatgggaagacaatagcaggcatgctggggatgagtgggctctatggctctgagg </p>	10
		20
		30
		40

	<p>cagaaagaaccagctgggctcgagatccactagggccgcaggaaccctagtgatggagttggccactccctctctgcgctcgtcactgag gccccggcgaccaaaagctgcccacgcccgggctttgccccggcgccctcagtgagcgcgagcgcgcagagaggagtgccaactccatca</p>
15	<p>ctgcgctcgtcgtcactgagcgcgcccgggcaaaagcccggcgccctcagtgagcgcgagcgcgcagagaggagtgccaactccatca ctaggggttcctgctgagcctaggtctcagaggcacacaggagttctgggctcacctgccccctccaacccctcagttccatctccagcagctgtt gtgtctgctctgaagtcacactgaacaaactcagcctactcatgtccctaaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaaacacacagccctcc ctgctctgaccltggagctgggagcagaggtcagagacctctctggcccatgcccactccaalccactcagcccltggaaattcgggtggagagga gcagaggttctctggcgtggttaggtgtagtgagaggggtaccggggatcttctaccagtggaaacagccactaaggaattctcagtgagagcagag ggccagctaaagtgtactctcccagagactgtctactcagcccccctccacttgacacagagcctgtgtgttctgagccaggtacaatgactcct ttcgtaagtgcagtggaagctgtactctcccagggcaaaagcctccggcagcgtagcggcgactcagatcccagccagtgagcttagcccctgtt gtcctccgataatggggtgaccttggtaataatccaccagcctccccctggccctctggatccactgcttaataacgcagcagggacagggccctg tctctcagctcagccaccactgacctgggacagtgaaatagctctgagaactcaggggtgagctatggaccctgtatgtttcttccccctctttct atggttaagtcatgcataggaaggggagaagtaacaggggtacacatattgaccaaatcagggtaatttgcattgtaatttaaaaaatgcttctctttaat atacttttggttatcttatttaataacttccctaactcttcttccaggcaataatgatacatgtatcctcttggaccattctaagaataacagtgataa ttctgggttaagcgaatagcaatattctgcataaaatattctgcataaaatgtactgtagtaagaggttcatattgtaatagcagctacaatccagcta ccaftctgttttattctggttgggataagctgatttctgagccaagctaggcccttcttaactgttataccttctctcccacagctcctgg gcaacctgctgtctctgctgcccacatcttggcaagcagcgtgccaccatgaagtgggtgacctgctgacctgctgctgctgctgttctg tgggctgcccacagcaatccaaatgctaccagctccagctccaggtccagagagttgcaagcagagcgaagggaaggtcgcacaacagttatc tccaaatgctatcttgaacctcctggaggttccagcttccgacaaccaactcaacaaccaatcagccacaaaataacagtaataaccactgatg aaccaccacacaaccaccacagagcccaccacccaaccacatccaaccacccaaccaactaccagctccaacagatctctaccagccc actactggctctctgcccagacctgttactctctgctgacttgagagctattcaacagagccgtgttggggatgcttggtagattctccctgaag ctctaccacgctctcagcaatgaagaagtgtagaccaaacatggcccttccccattcagcatcggccctctaccagctcctcctgggctggg gagaacacaaaacaaactggagagctctcttccccaaaggacttccctgttccaccagccctgaagggttcacgaccaaaaggtgtcacct cagctctcagatttccacagcccagactggccataaggacaccttggtaatgctctcagccctgtacagcagcagcccagagcttaagcaac aacagtgacgccaactggagctcatcaaacctgggtggccaagaacccaacaacaagatcagccgctgctagacagctgctccctccgatacccgc ctgtctcctcaatgctatctactgagtgccaagtgaagacaacattgataccaagaaaaccagaatggaaccttctactcaaaaactcagtataaa agtgcccatgatgaatgaagaagtaccctgtggcccatttaccgaaacttgaagccaaggtgggagcagctgagctctcccacaatctgagtt ggtgatcctgttaccagaaacctgaaacatcgtcttgaagacatggaacagcctcagccctctgttttcaaggccatcatggagaaactggagatgc caagttccagcccactcttaactaccctcagcaatgacgaccagccagatagctctcaatcatggagaaattggaattctcgaatttctatga ccttaacctgtgtggctgacagaggacctgatctcaggttctgctgatgcagcaccagacagtgctggaactgacagagactggggtggaggcggct gcagcctcccactctctgtgcccgcacctgctgtcttgaagtgcagcagccctctctctgctctgaggaccagcacaagttccctgtctca tggggcagatatafaccagggcctgaagatctagagctgaatcctgagccaggggatcagcctctactgtgcttctagttgccaacctctgtg ttgccccctcccccttctctgacctggaaggtgccactcccactgcttcttaataaaaatgaggaattgcatcattgtctgagtaggtgtcattct attctgggggtgggtggggcaggacagcaagggggaggaattgggaagacaatagcaggcatctggggatcagtggtgctctatgcttctgagg cagaaagaaccagctgggctcgagatccactagggccgcaggaaccctagtgatggagttggccactccctctctgcgctcgtcgtcactgag gccccggcgaccaaaagctgcccacgcccgggctttgccccggcgccctcagtgagcgcgagcgcgcag</p>
16	<p>ctgcgctcgtcgtcactgagcgcgcccgggcaaaagcccggcgccctcagtgagcgcgagcgcgcagagaggagtgccaactccatca ctaggggttcctgctgagcctaggtctcagaggcacacaggagttctgggctcacctgccccctccaacccctcagttccatctccagcagctgtt gtgtctgctctgaagtcacactgaacaaactcagcctactcatgtccctaaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaaacacacagccctcc</p>

10

20

30

40





	<p>ctgtgatcagcaagatgctgtttgtggagcctatcctggaggtagcagcctgccaccactaactctactactaattctgccactaagatcactgccaatac  cactgatgagccaaccactagcccaccactgagcccaccaccagcccaccattcagcccactcagcctaccaccagctgctactgacagcccac  tcagcccactactggctctttctgctcctggcctgtgactctgtctctgacctggaatcccacagcactgaggctgtgctggggatgccctgtggattc  agcctgaagctgtaccatgcttctctccatgaagaaggtagagaccaatagccttcagccccttctctatfccaagcctgtgactcaggtgctgtg  gggctggggagaataccaagaccaactcggagtctatcctgagctatccaaggacttcaactgtgtgaccaggccctgaagggttcaccaccaagg  gggtgacctctgtgtctcagatcttcacagccctgacctggccatcagggatacctttgtaatgccagcaggacctgtacagcagagcccagggtg  ctgagcaacaactctgatgccaacctggagctgatcaacactgggtggccaagaacaccaacaagaatcagcaggctgtgacagcctgcccctct  gataccaggctgtgctgtgaatgccatctacctgtctgaagtggaggaccactttgtatcctaagaagaccaggatggagccccttcaactcaagaact  ctgtgatcaagggtgccatgatgaacttaagaaataccctgtggcccactcattgatcagaccctgaaggccaagggtggccagctgacgtgagccac  aacctgagcttgggtgatcctgtgctcagaacctgaagcacaggctggaggacatggagcaggccctgagcccctctgtgtcaaggccattatggaga  agctggagatgagcaagtccagcctaccctgtgacctgccagatcaagggtgactactagccaggatgctgagatcatatggagaagctggagttt  ttgattcagctatgacctgaacctgtgtgcccctgactgaggacctgacctgagggtctgctccatgacatcagactgtgctgagctgactgagactg  gggtgaggctgtgctgctcctctgacctctgtgcccagacctgctgtggtttgaggctcagcagccttctgtttgtgctgtggatcagcagaca  agttctgtgttcatggcagggtgatgaccccaggcctgaagatctagagctgaattctgcagccaggggatcagcctctactgtgcttctatgtg  ccagccatctgtttgcccctcccccttgcctcctgacctggaagggtccactcccactgcttctcctaataaafaggaaattgcatcacattgtctg  agtaggtgtcattctatctgggggtgggggtggggcaggacagcaaggggaggattggaagacaatagcaggcatgctgggatgagctgggctc  tatgctctgagcagaaagaaccagctgggctcagatccactagggccaggaacccctagtgatggagtggccactccctctctcgcgctcg  ctgctcactgaggccggcgaccaaaagtcgccgacccgggcttggcccggcgccctcagtgagcagcagcagcgcgag</p>	<p>10</p> <p>20</p>
<p>19</p>	<p>ctgcgctcgtcctcactgaggccgcccgggcaaagcccggcgccctcagtgagcagcagcagcgcagagagggagtgccaactccatca  ctagggttctctgcccctagttagctcagaggcacagggatttctgggctaccctgccccttccaaccctcagttccactctccagcagctgtt  gtgtgctgctctgaagtccactgaacaaactcagcctactatgctccataaattggcaaacattgcaagcagaaacagcaaacacacagccctcc  ctgctgctgacctgagctggcagaggtcagagacctctctggcccactgcccactccaacatccactgaccccctggaattctggtgagagga  gcagagggtgctcctggcgtttagttagttagaggggtaccggggatctgctaccagtggaaacccaactaaggattctcagtgagagcagag  ggccagctaagtggtaactcaccagagactgctgactcagcccccctccactgacacagcagcgtgtgttctgagccaggtaaatgactcct  ttcggtaaagtgcagtggaagctgtactgcccaggcaaacgctccggcagcagctagcggggcagcagatcccaagcagtgactgcccctgtt  gctcctccgataactggggtgaccttggtaataattaccagcagcctccccgttggcccctctgactccactgcttaataacgacgaggaaggccctg  tctctcagctcagccaccactgacctggacagtgatagatcctgagaactcagggtgagctatggaccctgatgttttcttcccctctttct  atggttaagtcataggaaggagaaagtaacaggttacacataatgacaaaacagggtaatgttgcattttaaattttaaacttcttctttaa  atacttttgtttatcttatttaataacttccctaactcttcttctcaggcaataatgatacaatgtatcctcttgcaccattctaagaataacagtataa  ttctgggtaaggcaatagcaatattctgcatataaattctgcatataaattgtaactgatgtaagaggttcatattgctaataagcagctacaatccagta  ccattctgtttatttctggtgggataaggctgattattctgagtcgaagctagccccttctgtaacttctgtaactctctctcccacagctcctgg  gcaacctgctgtctctgctgcccacttggcaaacgagcgtgccaccatggctagcagactgactctgctgacctgctgctgctgctgctg  tgggagcagggccagcagcaacctaatgctactctagcttagccaggacctgagcctgagcagatagggggagggcaagggtgccaccact  gtgatcagcaagatgctgttggagcctatcctggaggtagcagcctgccaccaccaactctactaccaactctgctaccaagatcactgccaatacc  actgatgaaccaccactcagcccactactgagcccaccaccagcccaccattcagcccactcagcccactaccagctgctactgactctcccacc  agcccaccactgggagctctgtccagcccctgtgactctgttctgacctggagccacagcactgaaagctgtgctggggatgctctgtgacttc  agcctgaagctgtaccatgcttctgcatgaagaagggtgaaaccaatggcctttagcccctcagcattgctagcctgctgactcaggtgctgctg  gggctggggagaacactaagactaacctggagtctatcctgcttataccaaggactcactgtgctatcagccctgaagggttcaccaccaagg  ggtcacctctgtgagccagatcttcacagccctgatctgcccacagggaccttggtaagcctctagactctgtacagcagcagcccagggtgct</p>	<p>30</p> <p>40</p>

10

20

30

40

	<p>gagcaacaactctgatccaacctggagctgatcaaacctgggtggccaagaactaacaacaagatcagcagctgctggacagctgccctctga  cactagctggctgctgaatgccatctatctgctgccaagtggaaagaccacctttgacccaagaagactagatggagccctttatitaaagaactct  gtgatcaagctgccatgatgaacagcaagaataacctgtggccatttcattgaccagactctgaaggctaaagtgggccagctgcagctgagccaca  acctgagcctggatcctgggtccacagaatctgaagcagcagctggagacatggagcagctctgtccctctgtgttcaaggccatcatggagaa  gctggagatgtcaagttccagcccacctgtgacctgccagatcaaggtgaccacttctcagacatgctgtctatcatggagaagctggagttttt  gacttttctatgacctgaacctgtgtggcctgactgaggacctgatctgcaggtctgtccatgcagcaccagactgtgctggagctgactgagctggg  gtggaggctgctgctcttccatttctgtggctagactctgctgtgttgaggctgagcagcccttctgtgtgctgggaccagcagcacaagt  ccctgtttcatggcagggtgatgatccagggtgaaatctagagctgaaltctgcagccaggggatcagcctctactgtgcttctagtgtccag  ccatctgtgttggcccccttcccttcccttaccctggaaaggtgccactcccactgctcttcttaataaaatgagaaatgcatcacattgtctgagta  gggtcattctatctggggggggggggggggggcaggacagcaagggggaggaltgggaagacaatagcagcagctgctgggggatcagctgggctctatg  gtctctgagcagaagaaccagctgggctcagatccactagggcggcaggaaccctagctgatggagttggccactcctctctgcgcgctcgtc  gtcactgagggcggcgaccaaaagctgcccggacggcgggctttggggggcgccctcagtgagcggagcggcgcgag</p>	10
20	<p>ctgctgctgctgctgctcactgagcccccggcacaagcccggcgccctcagtgagcagcagcgcgagagagggagtgccaactccatca  ctaggggtcctgcccctagtaggctcagagccacacaggagttctgggctcaccctgccccctccaaccctcagttcccctccagcagctgtt  gtgtgctgctctgaagtcacactgaacaactcagcctactctgtccataaatgggcaaacattgcaagcagcaaacacacagccctcc  ctgctgctgacctggagctggcagaggtcagagacctctgtggccatgccacctccaatccactgaccccttgaatttcgtgagagga  gcagaggttctctggctgtgttaggtgtagtgagaggggtaccgggatctgtaccagtggaaacccactaagattctcagtgagagcagag  ggccagctaaagtgctactctcccagagactgtctgactcaccacccctccacttggacacagcagctgtgtgttctgagccaggtacaatgactct  ttcggtaagtcagtgaaagctgtacactgcccaggcaagcgtccggcagcgtagggcggcgactcagatcccagccagtgacttagcccctgtt  gtcctccgataaactgggtgacctgtgtaattaccagcagcctccccttggccctctggatccactgttaatafacggacagagcagggccctg  tctctcagctcagcaccaccactgacctgggacagtgatagatcctgagaactcaggggtgagctctatggaccctgatgtttcttccctctttct  atgttaagttcatgtacagaaggggagaagtaacagggtacacatattgaccaaatcagggtaatgttctgattttaaataatcttcttitaat  atacttttgttatctatttctataacttccctaaactcttcttccagggcaataatgatacaatgtatcatgctcttggaccattctaaagaataacagtataa  tttctgggtaagggcaatagcaatatttctgcatataaataattctgcatataaattgtaactgatgtaagaggttcatattgctaatagcagctacaatccagta  ccattctgcttttatttctggttgataaggtgattattctgagtcacaagctagggccctttgtaactctgttataactcttattctcccacagctcctgg  gcaacctgctgtctctctgctgcccacactttggcaagcagcgtgcccactggctagcagactgactctgctgacctgctgctgctgctgctg  tggggacagggccagcagcaacctaatgctacctctagctctagccaggacctgagagcctgagagcctgagagcctgaggggcaaggtggccaccact  gtgatcagcaagatgctgttggagcctatctggaggtgagcagcctgccaccaccaactctactaccaactctgctaccaagatcactgccaatacc  actgatgaaccaccactcagcccactactgagcccaccaccagcccactcagcccactcagcccactaccagctgcccactgactctcccacc  agcccaccactggcagcttctcccctggcctgtgacctgtgctgacctggagagccattctactgagcctgtgctgctggggatgccctgggattca  gcctgaagctgacctgctctctgcccaggaaggtggagaccaaatggccttctctccctcagcattgcccagcctgctgaccaggtgctgctgg  ggcctgggggagaacccaagcaacctggagagcctctcttacccaaggactcactgtgtgcalcagccctgaagggctcactactaagg  gggtgacctctgtctcagatttccacagccctgacctggctattaggacactttgtaagcttctagaccctgtacagcagctctcccagggtgctga  gcaaacctctgatccaacctggagctgattaacctgggtggccaagaacactaacaataagatcagcagcctgctgacagcctgccctctgacac  caggtgctgctgctgaatccatctactctgctccaagtgaagactcttctgatcctaaagaagaccagatggagccttccactcaagaactctgtg  atcaaggtgccatgatgaattctaaagtaacctgtgctcactcttaccagaccctgaagccaaggtggccagctgagctgagccacaacct  gagcctggtgattctgctgcccagaacctgaagcagcgtggagacatggagcagccctgagccctctgttcaaggccatcatggagaagct  ggagatgagcaagttccagcctactctgctgactctcccagatcaaggtgaccactagccagacatgctgagcattatggagaagctggagttcttg  actttctatgatctgaacctgtgtggcctgactgaggacctgacctgaggtgtctccatgcagcaccagactgtgctggagctgactgagactgggg</p>	20 30 40

10

20

30

40

50



	<p>cttctgagggcagaaagaaccagctggggctcgcagatccactagggccgcaggaaccctagtgatggagttggccactccctctcgcgcctcgcctcgc ctcactgagggccggcgaccaaaggctcggcgaccccggtttgccccggcgccctcagtgagcagcagcgcgcgcag</p>
22	<p>ctgcccgcctcgcctcactgagggcccccggcaaaagcccggcgccctcagtgagcagcagcgcgcagagagggagtgccaactccatca ctaggggttctcgcgcctagtaggctcagagggcacacaggagttctgggctcaccctccccctccaaccctcagttcccatctccagcagctgtt gtgtgctcctgaagtcacactgaacaaactcagcctactcatgtccataaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacacagcaaacacagccctcc ctgctcctgctgacctggagctggggcagaggtcagagacctctctggcccctgcccactccaacatccactcacccttggaattcgggtggagagga gcagaggtgtcctggcgtggttttaggttagtggagaggggtaccggggatctgctaccagtggaacagccactaaggattctgcagtgagagcagag ggccagctaagtgtactctccagagactgctgactcacgcccccctccacttgacacagggacgctgtgtttctgagccaggtacaatgactcct ttcgttaagtgcagtggaagctgtacactgcccaggcaaaagcgtccggcagcgtagggcggcgactcagatccagccagtgactgagccctgttt gctcctccgataactgggtgactctgttaataatccaccagcctccccctgtccccctctgactcactgctaaatagcagcagagacagggccctg tctcctcagcttcaggcaccaccactgacctgggacagtgatagatctgagaactcaggggtgagctctatggaccctgatgtttcttcccctctttt atggttaagtctatgcataggaaggggagaaagtaacaggggtacacataatgacaaatcagggtaatttgatgttaatttaaaaaatgcttctctttaa atactttttgtttatcttattctaaactttccctaactcttcttccaggcaataatgatacaatgtatcatgctcttggaccatttaagaataacagtgataa ttctgggtaaggcaataatcttctgcatataatattctgcalataaaatgtaactgatgtaagaggttcatattgclaatagcagclacaatccagcta ccattctgctttttctgttgataaggctgattattctgagccaagctagccctttgtaactctgttcatactcttattctcccacagctcctgg gcaacctgctgtctctctgctgcccactctgtgcaaaagcacgctgcccactatggcctctagggctgactctgctgactctgctcctgctgctgct ggggacagggccagctctaaccctactctctctcagaccctgagagcctgcaggacagggggagggcaaggtggccaccactgt gatctcaagatgctgtttggagccatctggaggtgagcagcctgcccaccaccaacagcaccaccaactctgccaactaagatcactgccaacacca ctgatgagcccaccaccagccactactgagcccaccaccagcctactatccagcccaccagccactaccagctgccactgacagccctacc agcccaccactggcagcttctgcccctggcctgtgacctgtgctctgacctggagagccattctactgaggctgtgctgggggafgcccctgtggactct ctctgaagctgacctgcttctctgcatgaagaaggtggagactaacatggcttttagccccttcagcattctagcctgctgaccaggtgctgctggg ggctggggagaaactaagcaaacctggaatctatctgagctaccccaggactcactgtgtgaccagccctgaagggttaccaccaagggg gggtgacctgtgagccagatctccacagcctgacctgcccacagggatactttgtgaaatgcccagcagaacctgtactctttagccccagggtgct gagcaataatctgatgtaacctggagctgatcaatactgggtggcctaagaataccaacaacaagattagcagcctgctgactctctcctctgatacc aggctggctgctgtaatccatttactctgccaagtggagaccactttgaccctaagaagactaggtggagccttccactcaagaactctgctcat taaggtgccatgatgaacagcaagaatctctgtggcccactttatgaccagactctgaaggccaaggtggccagctgcagctgagccataacctg agccgtggtgacctggtgcccagaaactgaagcatagggctggagacatggagcagcctctgagcccctctgtgtcaaggctaltatggagaagctgg agatgagcaagttccagccactctgctgacctgcccagaatcaaggtgaccacctcagcagatctgagcatatggaaaactggagttctttgact ttcttatgacctgaatctgtgtgacctgagatcctgatctgagggtctgccaatgagcaccagactgtgctgagctgactgagactgggtggga ggctgctgctcttctgcatctctgtgcccaggaccctgctggtttgaggtgacagcagccctctgtttgtgctgtggaccagcagcaagaattctg gttcatgggcaggggtgtatgccccagagcctgaagatctagagctgaattctctgacccaggggatcagcctctactgtgcttctagtgtccagccat ctgttttccccctcccccttgccttcttaccctggaaggtgcccactcccactgctccttcttaataaaatgaggaaattgcatcaattgtctgagtggtg tcattctattctgggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggtgggaagacaatagcaggcatctggggatgagtggtcctctatggcttc tgaggcagaagaaccagctggggctcagatccactaggggcgcaggaaccctagtgtgaggtggccactccctctcgcgcctcctcgcctca ctgagcccggcgaccaaaggctcggcgacccggctttgccccggcgccctcagtgagcagcagcgcgcgcag</p>
23	<p>ctgcccgcctcgcctcactgagggcccccggcaaaagcccggcgccctcagtgagcagcagcgcgcagagagggagtgccaactccatca ctaggggttctcgcgcctagtaggctcagagggcacacaggagttctgggctcaccctccccctccaaccctcagttcccatctccagcagctgtt gtgtgctcctcgaagtcacactgaacaaactcagcctactcatgtccataaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacacagcaaacacagccctcc</p>

10

20

30

40

50

	<p>ctgcctgctgacctggagctggggcagaggfcaagacctctctggccatgccacctccaacatccactcgacccttggaafttcggfaggagga  gcagaggfctcctggcgtggtttaggtagtgtgagagggtaccgggatctgtaccagtggaaacagccactaaggatctgcagtgagagcagag  ggccagctaagtgtactctccagagactgtctgactcacgccccccaccctggacacagagcctgtgtgtttctgagccaggtacaatgactcct  ttcggtaagtgcagtggaaagctgtacactgcccaggcaagcgtccggcagcgtaggcggcgactcagatcccagccagctgacctgttt  gctcctccgataactggggfacctggttaataatcaccagcagcctccccgtggccctctggatccactgcttaatacggacgagacagggccctg  tctcctcagctcagccaccactgacctgggacagtgaatagatctgagaactcaggggtgagtctatgggacctgtatgtttcttcccctttttct  atggtaagtcatgtcataggaaggggagaagtaacaggggtacacatattgaccaaatcagggtaatfttgatftgtaatfttaaaaaaactttcttctttaa  atacttttttttttcttattcttaactttccctaactcttctttcagggcaataatgatacaatgtatcatgctctttgaccattcaagaataacagtgataa  ttctgggttaagcaatgcaatatttctgcatataaatttctgcatataaattgtaactgatgtaagggttcatattgctaatagcagctacaatccagcta  ccattctgttttttttctgttggtggataagctggatattctgagtccaagctaggcccttttctaactgttccatacctctatcttcccaccagctcctgg  gcaacctgctgtctctctgctggccatcactftggcaagcacgctgcccacatggtagcaggctgacctgctgacctgctgacctgctgctgctgctg  tggggacagggcctctagcaatcccaatgccacctctagctctagccagatcctgagagcctgcaggacaggggggagggcaaggtggccaccact  gtgatcagaagatgctgtttgtggagccatctggaggtgtcttctgcccaccaccaatagcaccactaattctgcccaccaagatcactgtaaacca  ctgatgagcccaccactcagcctaccactgagcccaccaccagcccactaccagcccaccaccagcccaccaccagctgacctgacagccctacc  agcccactactggagctctgcccctggcccctgacctgtgctctgacctggagagccacagcactgaggctgtctgtggggatgcccctgtggactt  cagcctgaagctgtaccatgccccttctccatgaagaggtgagaccaaatgcccctttagccccttccagattgcccagcctgctgactcaggtgtgctg  ggggctggggagcaacaccaagaccaactggagagcctcctgactaccccaaggacttactgtgtgcaccaggccctgaagggcttactactaa  gggggtgacttctgtgagccagatctccacagccctgacctggccatcaggatactttgtgaatgccagcaggacctgtacagcagcagcccagg  gtgctgagcaaacctctgatgtaactgtagctgatcaatactgggtggccaagaacaccaacaagaattctagctgctggactctgcccctct  gacactaggctgtgctgctgaatgccaatcactgctgccaagtgaagaccctftgatcccaagaagactaggatgggaccttccactcaagaac  tctgtgatcaaggtcccagatgaaacagcaagaaglacctgtggcccattctgaccagacctgaaggccaaggtggggcagctgctgctgagcc  acaactgagcctgtgattctgtgcccagaactggaagcacagactggagacatggagcaggtctgtctcctctgtgttcaaggccatctggag  aagctggagatgagcaagtccagcccactctgactctgctaggatcaaggtgaccaccagccagacatgctgagcattatggagaagctggagt  tctttgactcagctatgacctgaacctgtgtgcccactgactgaggacctgactgagggtgtctgcccagcaccagactgtctgagctgactgaga  ctgggtggagcctgctgctgcccctgtctatttctgtgcccagacctgctgtgtttgaggtgacagcagccctctgtttgtgctgtggaccagcagca  caagtttctgtgttcatggggaggtgtatgaccccagggcctgaagatctagagctgaattcctgagccagggggatcagcctctactgtgcttctagt  tggcagccatctgttttggcccctccccttgccttccctgacctggaaaggtgccactcccactgtccttcccaataaaatgaggaaftgcatcacattgtc  tgagtaggtgtcattctattctgggggtgggggtggggcagacagcaagggggaggtgggaagacaatagcagcagctgctgggatgagctgggc  tctatggctctgagcagaaagaaccagctggggctgagatccactagggccgaggaaccctagtgtgaggtggccactcctctctgctgctg  cgctcgtcactgagccggcgacaaaggtcggcagccccgggctftgcccggcgccctcagtgagcgagcagcgcgag</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p>
<p>24</p>	<p>ctgcgctcctgctcactgagccgcccgggcaagcccggcgccctcagtgagcgagcagcgcagagagggagtgccaactccatca  ctagggggtcctcgccctagtaggctcagagcagacagaggatftctgggctcaccctgccccctccaaccctcagttccatcctccagcagctgtt  gtgtctgctcctgaaagccacactgaacaaactcagcctactcatgtcccaaaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacacacagcccctc  ctgcctgctgacctggagctggggcagaggfcaagacctctctggccatgccacctccaacatccactcgacccttggaafttcggfaggagga  gcagaggfctcctggcgtggtttaggtagtgtgagagggtaccgggatctgtaccagtggaaacagccactaaggatctgcagtgagagcagag  ggccagctaagtgtactctccagagactgtctgactcacgccccccaccctggacacagagcctgtgtgtttctgagccaggtacaatgactcct  ttcggtaagtgcagtggaaagctgtacactgcccaggcaagcgtccggcagcgtaggcggcgactcagatcccagccagctgacctgttt  gctcctccgataactggggfacctggttaataatcaccagcagcctccccgtggccctctggatccactgcttaatacggacgagacagggccctg  tctcctcagctcagccaccactgacctgggacagtgaatagatctgagaactcaggggtgagtctatgggacctgtatgtttcttcccctttttct</p>	<p>40</p>

10

20

30

40

50

	<p>atggttaagtcatgcataggaaggggagaagtaacaggggtacacataatgacaaatcagggtaatitgcatitglaattttaaaaaatgctttcttttaata  atactttttttatcttatttctaatacttccctaactctttctttcaggcgaataatgatacaatgtatcatgctctttgcaccattctaaagaataacagtataa  ttctgggftaagcaatagcaaatattctgcatataaaatattctgcatataaattgtaactgatgaaaggttcatattgctaataagcagctacaatccagcta  ccattctgcttttatttctggttgggataagggctggatttctgagccaagtaggcccctttgctaattgttcatacctttatctctcccacagctcctgg  gcaacctgctggtctctctgctggccatcactttggcaagcagcgtgccaccatggcctccaggctgacctgctgacctcctgctgctctgctggc  tgggatagagcctctagcaatcaaatgctaccagctcctctcccagatcctgaafccctcaagacaggggggagggcaaggtggcaactactgtg  attccaagatgctgttggagccatcctggaggtagcagccttctactaccaactcaacaaccaattcagccacaaaattacagctaataccacag  atgagccaacaactcaaccaccactgagccaccactagccaaccatccaaccaccaactaccagctccaacagatttctctaccacagc  ctaccactgctcctctgcccaggacctgttactctctctctgacttggaaagccattctactgaggtctgctgggggatgcttttgtagacttctcctga  agctctaccatgcatfttcaagatgaagaaggtggagaccaatggcctttcccattcagtagcaagctctgactcaggtcctgctggggcag  gggagatacaaaagcaacctggagagcctcctgattccaaggtcactgctgcccaggccctgaagggttcacaacaaaggggtga  cctcagctctcagatfttccacagcccagacctggccataaggacaccttfgaatgctctagaccctgactcaagctccccagagctcctaaagca  caacagtgatgcaaatitggagctcaaacacctgggtggccaagaacccaacaagaatcagcaggtctgtagacagctgccaagtatacaag  gcttctctctcaatgctatctactgagtgccaagtgaagacaacalltgatccaagaacccaagaatggaaccttctactcaaaaactcattataa  aagtgccatgatgaaatgcaagaaggtaccctggtgcccattcattgacaaacttgaagccaaggtggggcagctgcaagctctcccaactctgagtc  tggtaactctgtaccagcaacctgaacatagccttgaagacatggaacaggtctcagccctctgtttcaagccataatggagaagctggagatg  ccaagftccagcccactcttaactaccagatcaaaatgacaaccagcagatgctctcaatcagagaatggaaatfttttctatg  accttaacctgtggtgctgacagaggacctgactctcaggttctcaatgagcaccagacagtgctggaactgacagagactgggtggaaagctgct  gcagcaagtgcaatctctggtgccaagacctgctgcttgaagtgagcagccctctgcttggctggtggaccagcagcaaaagctcctgcttca  tggggaggttatatgacccagggcctgaagatctagagctgaatcctgagcagccaggggatcagcctctactgctgcttctagttgccagccatctgtg  ttgcccccccccttctctgacctggaaggtgcccactccttctcaataaaatgaggaattgcatcacattgctgagtaggtgctcattct  attctgggggtggtggggcagcagcaagggggaggtgggaaagacaatgacagcagctggtgggatgagtgaggtgctctatggctctgagg  cagaaaagaacagctggggctcagatccactagggccgagcaacccctagtgatggaggtggccactcctctctcgcgctcctcctcactgag  gcccggcgacaaaaggtgcccagcccgggcttggcccggcggcctcagtgagcagcagcagcgcag</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
<p>25</p>	<p>ctgctgctcgtcgtcactgagccgcccgggcaagcccgggcccctcagtgagcagcagcgcagagagggagtgccaactccatca  ctagggttctgctggcctagtaggctcagaggcacacagaggttctgggctaccctgccccttccaaccctcagttccatcctccagcagctgtt  gtgtgctgctctgaagtcacactgaacaaactcagcctactatgctccfaaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaaacacacagccctc  ctgctgctgacttggagctggggcagaggtcagagacctctctggccatgcccactccaacatccactcagcccttggaafttgggtgagagga  gcagaggtgtcctgctggtttagtagtgtgagaggggtaccggggatctgtaccagtggaacagccactaaggattctgagtgagagcagag  ggccagctaagtgtactctccagagactgctgactcagccacccctccacttggacacagcagcgtggttctgagccaggtacaatgactcct  ttcgtaagtgcagtggaagctgtactcaccagcgaagcgtccgggagcgtgagcgggagcactcagatcccagccagtgactgcccctgtt  gctctccgataactgggtgacctgttfaatattaccagcagcctccccgttcccctctggtccactgcttaaacagcagcagcagggccctg  tctcctcagctcagcaccaccactgacctgggacagtgaaatagatcctgagaactcagggtgagctatggacccttgatgtttcttcccctctttct  atggttaagtcatgcataggaaggggagaagtaacaggggtacacataatgacaaatcagggtaatitgcatitglaattttaaaaaatgctttcttttaata  atactttttttatcttatttctaatacttccctaactctttctttcaggcgaataatgatacaatgtatcatgctctttgcaccattctaaagaataacagtataa  ttctgggftaagcaatagcaaatattctgcatataaaatattctgcatataaattgtaactgatgaaaggttcatattgctaataagcagctacaatccagcta  ccattctgcttttatttctggttggataagctggatttctgagccaagctagcccctttgctaattgttcatacctttatctctcccacagctcctgg  gcaacctgctggtctctctgctggccatcactttggcaagcagcgtgccaccatggcctccaggctgacctgctcaccctcctgctgctctgctggc  tggggacagggcctcagcaacccaatgcaaccagcagttcctctcagatccagatgctcctgagcagcagggggagggcaaggtggccaccact</p>	<p>30</p> <p>40</p>

10

20

30

40

	<p>gtgatccaagatgctgtttggagcccatctggaggtatccagcctccctaccaccaacagcaccaccaactcagccaccaaaactcactgtaaacac  cactgalgagcccacaacccaagcaactactgagccaaccactcagcctaccatccaaccaccagcctactaccagctccccactgactctccacc  cagccccaccctggcagctctgccagggacctgacccctctgctgactggagtcceatccacagagggcagtgctgggggagccctgtagactt  ctcccgaagctcaccatgcaatctctgcatgaagaaggtggagaccaacatggccttctcccctcagcattggccgctcctgaccaggtctctg  ggggcaggggagaacacaaagacaaacctggagtcctcctcagctaccccaaggactcacctgtgtccaccagggccctgaagggttcacaacaa  gggggtgaccagtgctcagatctccacagcccagacctggccatcaggacacctttgtaatgccagtagaccctgtacagctccagctccaga  gtcctcagcaaacactctgatccaacctggagctgatcaaacctgggtggccaagaacaccaacaagaatcagcagctgctgactcactgccc  ctgacacaaggtgctcctcctcaatgcaatctacctgagtgccaagtggagaccaccttggaccccaagagaccaggtggagccctcactcaag  aacagtgtcattaaggtgccatgatgaacagcaagaagtacctgtggcccacttcaatgaccagacctgaaggccaaggtggggcagctcagctct  ccccaacctgctactgctcctggttccccagaacctgaagcagagccttgaggacatggagcagggccctcagccctctgtatfaaggccataatg  gagaagctggagatgagaagttccagcccactctgctgaccctaccaggatcaaggtgaccaccagccagacatgctcctcaatcatggagaagttg  gagttcttgactcagctatgacctgaacctgtgtggctgacagagaccctgacctcaggtgtcagccatgacaccagacagctgctggaactgac  agagactgggggtgaaagctgctgagcaagctctatctcagtgccagggacctgctgcttggaggtccagcagccctctgttctgctctggacca  gcagcacaagttccctgctcctggggggtctatgaccaccggcctgaagalctagagctgaalctctcagccagggggatcagcctctactgtgc  cttctagtggcagccatctgttggcccctcccctgcccctctgaccctggaaaggtgcccactccactgctcttccataaataaggaaattgcatc  acattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggtggggggcagggacagcaagggggaggattgggaagacaatgagggatgctgggatgc  agtgggctctatgctctgagcagaaagaacctggtgggctcagatccactagggccaggaacctagtgatggagttgcccactcctctct  gcgcgctcctcctcactgagccgggcgaccaaggtgcccgcagcccggccttggcccggcggcctcagtgagcagagcagcgcgcag</p>	10
26	<p>ctgcgctcgtcctcactgagcccccgggcaagcccggcgccctcagtgagcagcagcgcgcagagagggagtgccaactccatca  ctaggggttctcgcggctagtagctcagagccacacaggagtctgggctcaccctgccccctccaaccctcagttccatcctccagcagctgtt  gtgtgctcctctgaagtcacactgaacaaactcagcctactatgtccctaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacacacagccctcc  ctgctctcagctgagctggggcagaggtcagagacctctctggcccctgcccctcacaatcactcagcccttggaafttggtgagagga  gcagaggtgtctcctgctgtttgtagtgtgagaggggtaccggggtatctgtaccagtggaaagccactaaggattctcagtgagagcagag  ggccagctaaagtggtactctccagagactgtctgactcagcccccctccacttggacacagcagctgtgttctgagccaggtacaatgactcct  ttcggtagtgtagtggaagctgtactgcccagcaaaagctccgggcagcgtagggcggcgactcagatcccagcagtgagcttagcccctgtt  gctcctccgataactggggtgaccttggtaattaccagcagcctcccctgctcccctctgagctccttaatacggacgagggacagggccctg  tctcctcagctcagccaccactgacctgggacagtgaatagatcctgagaactcaggggtgagtctatggaccctgagtttcttcccctctttct  atggllaagttcatgcataggaaggggagaagtaacagggtaacatattgaccaaatcagggtaatttgcatttgaatttaaaaatgcttctctttaa  atactttttttatctatttctaatacttccctaactcttcttccagggcaataatgatacaatgtatcatgctcttggaccattetaaagaataacagtgataa  ttctgggtaaggaalgaalatttctcatataaataattctgcatataaattgtaactgatgaagaggttcatattgctaataagcagctacaatccagcta  ccattctgtttttttctgtgtggataaggtgattattctgagtcgaagctagggcccttggtaactgtttcatacctcttatcttcccacagctcctgg  gcaacctgctgtctctctgctggcccactcttggcaaaagcagcgtgcccactatggcctcagcctgacctgctgacctcctgctcctctgctggc  tggggacagagccagcagaacccaatgccaccactccagctctcagaccagagagcctgacggacaggggggggcaaggtggccacca  cagtgatcagcaagatgctgtttgtagccatcctgaggtgagcagcctcccaccaccaacagcaccaccaattctgccaccaagatcacagccaa  caccacagatgagcccacaaccagcctaccacagagccaaccacacagcccaccatcaaccaccaactactaccagctgccacagacagc  cctaccagcctaccacagcagcttctccctgcccctgtgacctgtgctctgactggagagccactccacagagctgtgtgggggatccctgtg  ggatttcagcctgaagctgaccatgcttctgccaatgaagaaggtggagaccaacatggcctcagcccctcagcattggccgctcctgaccaggt  cctgctgggggctgggggagaacacaaagaccaacctggagagcatcctgagctaccccaaggactcacctgtgtgaccagggccctgaaggctca  ccaccaagggggtgacctctgtgagccagatctccacagcccctgacctggccatcagggacaccttggtaatgctccagaccctgtacagctctagc</p>	20
		30
		40

10

20

30

40

50

	<p>cccagggctgtagcaacaactctgatccaactggagctgatcaacacctggggccaagaacaccaacaagaatcagcaggctgctggacag  cctgccctctgacaccaggctggtgctcctgaatccatctacctgctgccaagtggaagaccacctftgacccaagaagaccagaatggagccctcc  actfcaagaactctgataaagggtgcccattgatgaacagcaagaagttacctgtggcccactcattgaccagaccctgaaagccaagggtggccagct  gcagctcagccaacaactgagcctggtcatctgggtccccagaacctgaagcacaggctggagggacatggaacaggccctcagccctctgtttcaa  ggccattatggagaagctggagatgagcaagttccagcccactctgtagactgcccaggatcaagggtgaccaccagccaggacatgctgagcat  ggagaagttggagttcttactcagctatgacctgaacctgtgtggcctgacagaggacctgacctccagggtgctgcatgagcaccagacagtgct  ggaaactgacagagacaggggtggaagctgctgctcctctgccatctctgtggccaagaacctgctgggtgtgaggtgagcagccctctgtttgtct  gtgggaccagcagcaaaagttccctgtgtcatgggcagggtgtatgacccccaggcctgaagatctagagctgaaatctctgacccagggggatcagc  ctctactgtcctctagttgcccagccatctgtttggccccctccctctgacctggaaggtgcccactcccactgctcttccataataaagtggg  aaattgcatcacattgtctgagtaggtgctcatttattctgggggtgggggtggggcagcagcaagggggaggattgggaaacaatagacggcatgc  tggggatgagcagtggtctatgctctgagcagaagaacctggtggcctgagatccactaggcccgaggaacccctagtgtgaggtggcca  ctccctctgctgcgctgctgctcactgagccggggcaccaaaggtcggccgacgcccgggctttggccggcgccctcagtgagcagcagc  gcgcag</p>	10
27	<p>ctgctgctgctgctgctcactgagccgcccgggcaagcccggcgccctcagtgagcagcagcgcgagagaggagtgccaactccatca  ctaggggttctcggcctgtaggtcagagggcacacagggtttctgggctcaccctgccccctccaaccctcagttcccctccagcagctgtt  gtgtgctgctcctgaagttccactgaacaactcagcctactcatgctcctaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaaacacacagccctcc  ctgctgctgacctggagctggggcagaggctcagacacctctggccatccacctccaactccactgaccccttgaattcgggtgagagga  gcagagggttctcggctgtgttaggtgtagtgagaggggtaccgggatctgtaccagtggaacagccactaagattctgagtgagcagag  ggccagctaagtggtactctcccagagactgctgactcacgccacccctccacctggacacagagcctgtgtgttctgagccaggtacaatgactct  ttcggtaagtgagtggaagctgtactgcccaggcaagcgtccggcagcgtagggcgactcagatcccagccagtggaacttagcccctgttt  gtctctccgataactggggtgacctgttaataatccaccagcagcctccccgttggccctctgagatccactgttaataacggagcagagggccctg  tctctcagctcagccaccactgacctgggacagtgaaatagatctgagaactcagggtagtctatggacctgtagtttcttccccctcttttct  atgttaagtcatgcataggaaggggagaagtaacaggggtacacataatgaccaaatcagggtaattttgatttgaatttataaaatgcttctctttaa  atactttttgttattctatttctaatactttccctaactcttcttctcagggcaataatgatacaatgatcatgctctttgaccattctaagaataacagtgataa  ttctgggtaaggcaataatftctgcatataaataatftctgcatataaataatgtaactgtagtaagagggttcatattgctaatagacgtacaatccagcta  ccattctgttttatttctgtgggataaggctggattattctgagtcgaagctagggcctttgtctaattctgttcatactcttatctctcccacagctcctgg  gcaacctgctggtctctctgctggcccaactftggcaagcacgctgcccactggcctctaggctgactctgctgactctgctctctctgctgctgct  ggggacagggccagctlaacccaatgctactctagctcctctcagaccctgagagcctcaggacaggggggggcaaggtggccaccactgt  gatcttaagatgctgtttgtgagccatctggagggtgagcagcctgcccaccacaacagcaccaccaactctgccactaagatcactgccaacacca  ctgatgagcccaccaccagcccactactgagcccaccaccagcctactatccagcccaccagcccactaccagctgcccactgacagccctacc  agcccaccactggcagcttctccctggcctgtgacctgtgctctgacctggagaccattctactgagcgtgtgctggggatgcccctgtgacttct  ctctgaaagctgacctgcttctctgcatgaagaagggtggagactaacatggcttttagccctcagcattgctagcctgctgaccaggtgctgctggg  ggctggggagaacactaagaccaactggaatctatctgagctaccccaaggacttcaactgtgtgaccaggccctgaagggttaccaccaaggg  gggtgacctctgtgagccagatctccacagccctgacctgacctcagggatactttgtgaatgccagcagaacctgtactcttagccccagggtgct  gagcaataaftctgtagcactgagctgataaacctgggtggctaaataccaacaacaagattagcagcgtgctggactctgctctctgatacc  aggctgggtgctgctgattgacattacctgctcgaagtggaagaccactttgaccctaaagactaggtgagcctttccacttcaagaactctgctat  taagggtcccatgatgaacagcaagaagtatctgtgcccactttattgaccagactctgaaggccaaggtgggcccagctcagctgagccataacctga  gcctggtgatcctggtgccccagaacctgaagcataggtggagacatggagcagcctctgagccctctgtgttcaaggctattatggagaagctgga  gatgagcaagttccagcccactctgctgacctgcccagaatcaagggtgaccacctcagagacatgctgagcatcatgaaaagctggagttcttact</p>	20 30 40

10

20

30

40

50

	<p>ttcttatgacctgaatctgtgtggcctgactgaggatcctgatctcaggtgtctccatgagcaccagactgtgctggagctgactgagactggggtggag  gctgctgctctctccatctgtgcccaggacctgctgggtttgaggtgcagcagccccttctgttgcctgctggaccagcagacaagttcctgt  gttcatggcagggtgatgacccagagcctgaagatctagagctgaattcctcagccaggggatcagccttactgtgcttctagtgtccagccatct  gttgttggccctccccctgcttctgaccctggaaggtgccactccactgcttcttaataaaaatgaggaaatgcatcacatfictgagtaggtgtc  attctattctgggggtgggtgggacagcaaggggaggtgggagacaataagcaggcatgctggggatgagctgggctctatgcttctg  aggcagaaaacacagctggggtcggatccactagggcccgagaacccctagtgtgaggtggccactccctctctgctgctcctcctcact  gagccgggagcacaaggtgcccagcccgggttggccggcgccctcagtgagcagcagcgcgagcgcag</p>
<p>28</p>	<p>ctgctgctgctgctgctgctgactgaggccgcccgggcaaagcccggcgccctcagtgagcagcagcgcgcagagaggagtgccaactccatca  ctaggggtctctgctgctgactaggtcagagccacacagggttctggtctaccctgcccccttcaacccctcagttccatctccagcagctg  ttgtgtgctgctctgaagtccacactgaacaaactcagcctactcagtcctaaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaaacacagccct  ccctgctgctgacttggagctgggagcagaggtcagagcctctctggccatgccactccaactcagaccctggaaatcgggtggagag  gagcagagggttctctgctgttaggtgtgagaggggtaccggggatctgctaccagtggaaacagccaataagattctgagtagagcag  aggccagctaaagtgtactctccagagactgctgactcaccaccctccacttggacacagggcgtgtgttctgagccagggtacaatgact  ccttctglaagtcagtggaagctgtacactgccaggcaaagctccgggcagcglagcgggagcagactcagatcccagccagtgacttagccccctg  tttctctccgataactgggtgactgttgaatattaccagcagcctccccgttggccctctgactcactgcttaataacgagcagggacagggccc  tctctcactgactcagccaccactgactgggacagtaataatctgagaactcaggggtgagctctatggaccctgattgttcttcccccttttct  tatggttaagttcatgcataggaagggaagtaacaggggtacacatattgaccaaatcagggttaatttgcattgttaatttataaaatgcttctctttaa  tatactttttgttattcttaataactttccctaactcttctcagggcaataatgatacaatgtatcctcttggcaccattctaaagaataacagtgata  attctgggttaaggcaatagcaatattctgcatataaatttctgcatataaattgtaactgatgtaagaggttcatattgtaatagcagctacaaccagct  accattctgcttttattctgtgggataagcgtgattattctgagccaagctagccctttgtctaatctgttcatacctcttatctctccacagctctg  ggcaacctgctgtctctctgctggccatcacttggcaaagcactagtgccacctgagcctctagcctgactctgctgactctgctgctgctgctgctg  ggggacagggccagctcaaccccaatgacttctgctcctctcagaccctgagagcctgcaggacagggggaggggcaaggtggccaccactgt  gatctaaatgatgctgtttgtggagcccactctggaggtgagcagcctgcccaccaccaacagcaccaccaactctgccaataagatcactgccaacacca  ctgatgagccccaccagcccactactgagcccaccaccagcctactatccagccccaccagccactaccagctgcccactgacagccctacc  agcccaccactggcagctctgcccctggcctgtgacctgtgctctgacctgagagcattctactgaggctgtgctgggggatccctgtggtgacttct  ctctgaagctgtaccatcttctctccatgaagaaggtggagactaacatggcttttagccccctcagcattgctgctgctgctgctgctgctgctgctg  ggctggggaacactaagaccaactggaactctactgactacccaagcactctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctg  gggtgacctctgtagccagatctccacagcccctgacctggccatcaggatctttgtgaatccagcagaacctgtactctctgccccaggggtgct  gagcaataatctgatgtaacctggagctgacatcaactgggtggtgtaagaatacaacaagaagcctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgct  aggctggtgctgctgaatgcaatctctgccaagtgaagaccattgtaccctaagaagactagatggagccttccactcaagaactctgtcat  taagggtccatgatgaacagcaagaagatctctgtgcccactttatggaccagactctgaaggccaaggtgggccagctgacgctgagccataactg  agcctgggtgactctgctgccccagaacctggaagcatagctggaggacatggagcagcctctgagccccctctgtgtcaaggctattatggagaagctgg  agatgagcaagttccagcccactctgctgaccctgcccagaatcaaggtgaccacctctcagacatgctgagcatatggaaggctggagtcttggact  ttcttatgacctgaatctgtgtgcccactgagatcctgatctgaggtgctcctatgagcaccagactgtgctgagctgactgagactgggggtgga  ggctgctgctgcttctgcccactctgctggccagaccctgctggtttgaggtgcagcagccctctctgtgtgtgggaccagcagcacaagttctctg  gttctatggcagggtgatgacccagagcctgacatctagagctgaattcctgacccaggggatcagccttactgtgcttctagtgtccagccatct  gttgttggccctccccctgcttctgaccctggaaggtgccactccactgcttcttaataaaaatgaggaaatgcatcacatfictgagtaggtgtc  attctattctgggggtgggtgggacagcaaggggaggtgggagacaataagcaggcatgctggggatgagctgggctctatgcttctg</p>

10

20

30

40

50

	<p>aggcagaagaaccagctgggctcgatccactagggccgcaggaaccctagtgatggagtggccactccctctcgcgctcgcctcact gagccggggcgacaaaggctccccacgccggccttfgccggggcgcctcagttagcgagcagcagcgcagagaggagtggccaactccatca</p>	
29	<p>ctgcgctcgtcgtcactgagcccccggcaaaagcccggcgccctcagttagcgagcagcgcgcagagaggagtggccaactccatca ctaggggttcctcggcctagttagctcagaggcacacagaggtttctggctcacctgccccctccaaccctcagtcccatcctccagcagctg ttgtgtcgtccttgaagtccactgaacaaactcagcctactatgctccataaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaaacacagccct ccctcctgctgacctggagctggggcagaggtcagagacctctctggccatgccacctcaacatccactgaccttggatctggtggagag gagcagagggttctcggctggtttaggtagtgtgagagggtaccggggatctgctaccagtgaacagccactaaggfctgcaagttagagcag agggccagctaagtggtactcaccagagactgtgactacgcccccctccacctggacacaggacgctgtgttctgagccaggtacaatgact ccttcgtaagtcagtggaagctgtacctgcccaggcaaagcgtccggcagcgttagcgggcagactcagatcccagcaggtgacttagcccctg ttgtcctccgataactgggtgacctggftaataatcaccagcagcctccccgtgcccctctggatccactgcttaataacgacgaggacaggccc tctcctcagctcaggcaccaccactgacctggcagagtaatactgagaactcagggtgagctctatgggaccttgatgtttctccctcttctt tatgttaagttcatgtcataggaaggggagaagtaacagggtacacatattgacaaatcagggttaatttgcattgtaatttaaaaaatgcttctttaa tatactttttgttatctafatttaatactttccataatcttctttcagggcaataatgatacaatgtatcctcttggcacctcaagaataacagtgata attctgggtaagcaatagcaatattctgcatataaataattctgcatataaattgtaactgatgtaagaggttcatattgtaatagacgtacaatccagct accattctgctttattttcgttgggataaggctgattatctgagccaagctaggccctttgctaattctgttcatactctattctcccccagctcctg ggcaacctgctgctctctgctgcccacactttggcaaagcactagtgccacatgctagcagcgtgacctgctgacctgctgctcctgctgctg ctggggcagaggcccttagcaatcccaatgccacctctagcctgacagctcctgagagcctgcagagcagggggggaggcaaggtggccaccact gtgatcagcaagatgctgtttggggagcccattctggaggtctctctgcccaccaccaatagcaccactaattctgccaccaagatcactgtaacacca ctgatgagcccaccactgacctaccactgagcccaccaccagcccactatccagcccaccagcccaccaccagctgectactgacagccctacc agcccactactgggagcttctgcccgtgcccctgctgacctgctgctgacctggagaccacagcactgaggctgctgctggggatgcccgtggtgact cagcctgaagctgtaccatgctttctgcatgaagaagggtgggagcaacaatggcctttagcccttcagcattgccagcctctgactcaggtgctgctg gggctggtgggagaacaccaagaccaactggagagcatcctgagctacccaagactcactgtgtgaccaggccctgaagggcttactaccaa gggggtgactctgtgagccagatctccacagccctgacctgcccacataggatactttgtgaatgccagcagcaccctgtacagcagcagcccagg gtgctgagcaaaactctgatgtaacctggagctgataacttgggtggccaagaacaccaacaagaattctaggctgctgactctctgcccct gacactagcctggtgctgctgaaatgccaatctcctgctgccaagtgggagaccctttgaccaaagaagactagatggagccctccactcaagaac tctgtgatcaaggctccatgatgaacagcaagaagtaacctgtgcccattcattgaccagacctgaaggccaaggtggggcagctgagcctgagcc acaactgagcctgggtgattctggtgcccagaatctgaagcacagactggaggacatggagcagcctctctccctctgtttcaaggccatcatggag aagctggagatgagcaagttccagcccactctgctgactctcctgagatcaaggtgaccaccagccagacatgctgagcattatggagaagctggagt tctttgactcagctatgacctgaaacctgtgtgcccactgagggacctgactctcaggtgtctgccaatgacaccagactgtgctgagctgactgaga ctgggggtggagcctgctgctcctctgctattctgctgcccaggacctgctggtttgaggtgcagcagccctcctgtttgtctggtggaccagcagca caagttctgtgtcatggggaggggtgatgacccaggccctgacatctagagctgaaatctgagccagggggagatcagcctactgctgcttctagt gcccagcatctgtgttccccctccccctgcccctctgacctggaaggfcccactcccactgtcttccataaaaaatgaggaaattgcatcacatgtct gagtaggtgctattctattctggggggtgggggtggggcagacagcaagggggaggattgggaaacaatagcaggcatgctggggatgagtggtgct ctatgctctgagcagaaaagaaccagctggggctcagatccactagggccgaggaaccctagttaggtggccactcctctctgctgctgctg gctcgtcactgagccggcgcacaaaggctccccacgccggccttfgccggggcgcctcagttagcgagcagcgcgcag</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p>
30	<p>ctgcgctcgtcgtcactgagcccccggcaaaagcccggcgccctcagttagcgagcagcgcgcagagaggagtggccaactccatca ctaggggttcctcggcctagttagctcagaggcacacagaggtttctggctcacctgccccctccaaccctcagtcccatcctccagcagctgtt gtgtgctccttgaagtccactgaacaaactcagcctactatgctccataaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaaacacagccctcc</p>	40

10

20

30

40

50

	<p>ctgcctgctgaccttggagctggggcagaggtcagagacctctctggcccatgccacctccaacatccactcgacccttggatftcggaggagagga  gcagaggttgcctggcgtggttttaggtagtgtagaggggtaccggggatcttgcctaccagtggaacagccactaaggattctgcagtgagagcagag  ggccagctaagtggactctcccagagactgtctgactcacgcccccctccaccttggacacaggacgctgtggtttctgagccaggtacaatgactcct  ttcggtaagtgacgtggaagctgtacactgccaggcaaagctccgggcagcgtaggcgggctgactcagatcccagccagtgactagcccctgttt  gctcctccgalaactggggtgaccttggtaataattcaccagcagcctcccccttgcctctctgacccactgctaaatagcagagagcagggccctg  tctcctcagcttccagccaccactgacctgggacagtgaaatagatcctgagaacttcagggtgagctctatgggaccttgatgtttcttcccctctttct  atggttaagttcatgtcataggaaggaggagaagtaacagggfacacataatgaccaaatcagggttaatttgcatttgaattttaaaaaatgctttctttta  atactttttgtttatcttatttctaatacttccctaactcttcttccagggcaataatgatacaatgtatcatgcctcttgcaccatttaagaataacagtataa  ttctgggtaaggcaataatattctgcatataaatttctgcatataaattgtaactgatglaagaggttctafatgctaatagcagctacaatccagcta  ccatctgcttttttctgttgggataagctgattattctgagtcaggctagggcccttttgaactctgttctacactcttcttctcccacagctcctgg  gcaacctgctgtctctctgctgccatcacttggcaagcacgctgcccaccatggcctcaggctgacctctgacctcctgctgctgctgctgctg  tggggatagagccctcctaatacccaccatccaacccccaacaaactaccagctccaacagattctctaccagcccactactgggctccttctgcc  caggacctgtactctctgctgacttggagagtcattcaacagagccgctgtggggatgcttggtagatttccctggaagctctaccacgccttctcag  caatgaagaagggtggagaccaacatggcctttccccattcagcatcgccagcctcctaccagctcctcctgggctgaggagaacacaaaacaaa  cctggagagatcctctcttaccccaaggacttccctgtgtccaccagggcctgaaggcttcacgaccaaagggtcacctcagctctcagattttccac  agcccagacctggccataaggagacaccttggtaatgctctcggacctgtacagcagcagcccagagctctaagcaaacagtgacccaactg  gagctcatcaacacctgggtggccaagaacaccaacaacaagatcagccggctgtagacagctcctccgatacccctgtcctcctcaatgctat  ctacctgagtgccaagtggaagacaacattgattcccaagaaaaccagaatggaaccttccactcaaaaaactcagttataaaagtcccatgatgaatag  caagaagtaccctgtgcccattcattgaccaaaccttgaagccaagggtggggcagctgagctctcccacaactcagtttggtagctctgtagccca  gaaactgaacatcgtctgaaagacatggaacaggctctcagccctctgtttcaaggccatcatggagaaactggagatgccaagtccagcccactctc  ctaacactacccccataaaagtacaccagccagatagctctcaatcatggagaaatggaattctcattttcttatgacctaacctgtgtgggctg  acagaggacctgatctcaggttctgcafgcagcaccagacagtgctggaactgacagagactggggtggagcggctgagcctcccctcctctct  gtggcccgaccctgctgtcttgaagtgacagccctcctctctgctctgaggaccagcagcacaagtccctgctctcatgggagcagtagatgacc  ccaggccctgaagatclagagctgaaltctgacgcccaggggacagccctctagctgctcttagtggaccactctgttggcttcccctccccttgcct  tcttaccctggaagggtgccactcccactgctcttcttaataaaaatgaggaaatgcatcacttctgtagtaggtgctatctatctggggggggggg  gggacagcagcaaggggaggatgggaaagaataagcagcagctgctgggatcagtgaggctctatgcttctgaggcagaagaaccagctgg  ggctcagatccactagggcgcaggaacccctagtgatggagttggccactcctctctgctgctgctgctgctcactgagcggcggcagcaaaagg  cgcccagccccggccttggcccggcgcctcagtgagcagcagcagcgcag</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p>
<p>31</p>	<p>ctgcgctcctgctcctcactgagccgccggcggcaagcccggcggcctcagtgagcagcagcagcagagagggagtgccaactccatca  ctaggggttctcgcgctagtaggctcagagcacaagaggttctgggctcaccctccccctccaacccctcagttccatcctccagcagctgttt  gtgtgctcctcgaagtcacactgaacaaactcagcctactcatgtccctaaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacacacagccctcc  ctgctgctgaccttggagctggggcagaggtcagagacctctctggcccatgccacctccaacatccactcgacccttggatftcggaggagagga  gcagaggttgcctggcgtggttttaggtagtgtagaggggtaccggggatcttgcctaccagtggaacagccactaaggattctgcagtgagagcagag  ggccagctaagtggactctcccagagactgtctgactcacgcccccctccaccttggacacaggacgctgtggtttctgagccaggtacaatgactcct  ttcggtaagtgacgtggaagctgtacactgccaggcaaagctccgggcagcgtaggcgggctgactcagatcccagccagtgactagcccctgttt  gctcctccgataactggggtgaccttggtaataattcaccagcagcctcccccttgcctctgacccactgctaaatagcagagagcagggccctg  tctcctcagctcagcaccaccactgacctgggacagtgaaatagatcctgagaacttcagggtgagctctatgggaccttgatgtttcttcccctctttct  atggttaagttcatgtcataggaaggaggagaagtaacagggfacacataatgaccaaatcagggttaatttgcatttgaattttaaaaaatgctttctttta  atactttttgtttatcttatttctaatacttccctaactcttcttccagggcaataatgatacaatgtatcatgcctcttgcaccatttaagaataacagtataa</p>	<p>40</p> <p>50</p>

	<p>ttcttggttaaggcaatagcaatatttctgcataataatttctgcataataattgtaactgatgtaagaggtttcatattgctaatagcagctacaatccagcta ccattctgttttttctggttgggataaggctggattatctgaglcacagctagcccttttctaaatctgttcataaccttatactctccccacagctcctgg gcaacctgctgctctctgctggccatcactttggcaaagcacgcgtgccaccatggcctccaggctgacctgctgacctctgctgctgctgctggc tggggatagagcctcctcaaatgggtcctctgccagacctgttactctctgctctgacttggagagcttcaacagaggccgtgttgggggatgctttg gtagatttctccctgaaagctctaccacgctctcagcaatgaaagggtggagaccaatggcctttccccattcagatcggcagcctccttaccagg tctgctcggggctgggagaacacaaaacaaacctggagagctcctcttaccceaaggacttccctgctccaccaggccctgaaggcttccac gaccaagggtgcacctcagctctcagatttccacagcccagacctggccataaggacacctttgtgaatgctctcggacctgtacagcagcagcc ccagagtccaaacaacagtgacccaactggagctcaaacacctgggtggccaagaacacaaacaagaatcagccgctgctgacagct ctgcccctcgataaccgctgtctcctcaatgctatctactgagtgccaagtggagaacaacattgatcccaagaaacagaaatggaaccttactt caaaaactcagttataaaagtcccatgatgaatagcaagaagtaccctgtgcccatttcaatgacaaacttgaagccaaggtggggcagctgcagct ctcccacaatctgagttgtgctatcctgtgaccccagaacctgaaacatgcttgaagacatggaacaggtctctcagcccttctgtttcaagccatcatgg agaaactggagatgctcaagtccagcccactctcctaactaccccgaacaaagtacgaccagcagatgatctctcaatcatggagaattggaa ttctcgtattttctatgaccttaacctgtgtggctgacagaggacctgatctcaggtttctgctgatgcagcaccagacagctgctggaactgacagagact gggggtggagggcgtgcagcctcccatctctgtgcccgcacctgctggttttgaagtgcagcagccctctctctgctctggtggaccagcagca caagttcctgctctatgctggggctgatatgaccccaggcctgaagactgagctgaattctctcagccagggggatcagcctctactgtgcttctagt tgccagccatctgttttccccctcccctgcccctctgacctggaaggtgccactcccactgcttctcaataaaatgaggaattgcatcactgttc tgagtaggtgtcattctattctgggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaaacaatagcagccatgctggggatgctgctggc tctatgctctgagggcagaagaaccagctggggctcagatccactlagggccgcaggaaccctagtgatggagtggccactcctctctgctgctc cgctcgtcactgagggcggcgaccaaggctgcccagccccggctttgcccggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgag</p>	<p>10 20</p>
<p>32</p>	<p>ctgctgctcgtctgctcactgagggcccccgggcaaagcccggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgagagggagtgccaactccatca ctaggggttctctgcccctagactagggctcagaggcacacaggagtcttctgggctcaccctgcccccttccaacccctcagttccatctccagcagctg ttgtgtgctcctctgaaagtcacactgaacaaactcagcctactcatgctcctaaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaaacacacagccct ccctgctgctgacctggagctggggcagaggtcagagacctctctggcccactgcccactccaactcaccctgaccttggaaatfttggggagagg agcagaggtgtctctgtgtgttttaggtagtgtagaggggtacctggggacttctgctaccagtggaaacagccactaaggattctcagtgagagcagag ggccagctaagtggtactcaccagagactgctgactcagcccccccacttggacacagatgctgtgtttctgagccaggtacaatgactcctt ggtaagtgcagtggaagctgtacactgcccagcaaggtctggcgaggtagggggtgactcagatcccagccagtgactagccccctgttctcctc tgataactggggctgacctggttaataatcaccagcagcctcccctgttcccctctgactccttaaatatggatgaggacagggccctgtctctcag cttcagccaccactgacctgggacagtgaaatagatcttgagaactcaggggtgagctctatgggacccttgatgtttcttcccctcttctctatggttaagt tcatgctatggaaggggagaagtaacaggggtacacataatgacaaatcagggtaatttgcatttgaattttaaataaatgcttctctttaaataacttttgt ttatcttattctaatacttcccatactcttcttctcaggcacaatgatacaatgtatcatgccccttggaccatttaagaataacagtgataattctgggta aggcaatagcaataatttctgcataataatfttctgcataataattgtaactgatgtaagaggtttcatattgctaatagcagctacaatccagctaccattctgctt tatttctggttggataaggctgattatctgagctcaagctagcccttttctaaatctgttcataaccttatacttccccacagctcctgggcaacctgct ggctctctgctggccatcactttggcaaagcactagtgcaccatggcctctagggctgactctgctgactctgctgctcctctgctgctgctgggacagg gccagcttaacccaatgctactctagctctcctctcaggacctgagagctgcaggacagggggaggggcaaggtggccaccactgtgatcttaaga tctgttttggagccatcctggaggtgagcagcctgccaccaccaacagcaccaccaactctgccaactaagatcactgccaacaccactgatgagcc caccaccagcccactagcaccaccaccagcctactatccagcccaccagcccactaccagctgcccactgacagccctaccagcccacca ctggcagcttctcccctggcctgtgacctgtgctctgacctggagagccattctactagggctgtgctgggggatcccctgggtgacttctctgaaact gtaccatgttctctgcatgaagaaggtggagactaactgctttagccccctcagactgtgactgctgagccaggtgctgctggggctggggga gaactaagaccaactggaatctatcctgagctacccaaggacttccctgtgaccaggccctgaagggttaccaccaagggggtgacctct</p>	<p>30 40</p>

10

20

30

40

50

	<p>gtgagccagatctccacagccctgacctgccaatcaggatacttftgtaatgccagcagaacctgtactctctagccccagggtgctgagcaataaft  ctgatgctaacctggagctgafcaataacctgggfggtaagaatacaacaacaagattagcaggctgctgactctctgactctctgataaccaggctggctg  tctgtaatgccatttacctgtctccaagtgaagaccactttgacctaaagaagactagggatggagccttccactcaagaactctgtcattaaggtgcc  atgatgaacagcaagaagtatcctgtgcccactttatgaccagactctgaaggccaaggtggccagctgagctgagccataacctgagcctggtgat  cctggtgccccagaacctgaagcataggtgagggacatgagcaggctctgagccccctgtgttcaaggctattatgagaagctggagatgagcaa  gttccagcccactctgctgacctgcccagaatcaaggtagccacctctcaggacatgctgagcatcatggaagctggagtcttctgactttcttatgacc  tgaatctgtgtggcctgactgagatcctgatctgcaaggtgtctccatgacgaccagactgtgctggagctgactgagactggggtggaggctgctgct  gcttctgccatctgtgcccaggacctgctggtttgaggtgacgaccccttctgtttgtgctgtggaccagcagacaagtctctgtttcatggg  cagggtgatgacccagagcctgacatctagagctgaattcctgacgcccagggtgatcagccctactgtgcttctagttgccacatctgtgtttgcc  cctccccctgcttctctgacctggaaggtgccactcccactgtcttcttaataaaatgaggaattgcatcacattgtctgagtaggtctatctattctg  gggggtggggtgggagacagcaaggggagatgggaagacaatagcaggcatctgggagatgaggtggctctatgcttctgagccagaa  agaaccagctgggctcgatccactagggccgaggaacctagtgtgaggtggccactccctctgctgctgctgctgctgctgactgagccggg  gagaccagaaggtgcccagcccggcctgcccggggcctcagtgagcagcagcagcgcgag</p>	10
33	<p>ctgctgctgctgctgctgactgagccggccgcaagcccggcgccctcagtgagcagcagcgcgagagaggagtgccaaactccatca  ctaggggttctgcccctagtagctcagaggcacacaggatfttggctaccctgccccctcaaccccctcagttccatctccagcagctg  ttgtgtgctgctctgaagtccactgaacaacttcagcctactatgtccctaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacacacagccct  ccctcctgctgacttggagctggggcagaggtcagagacctctgggcccagccactccaactgacctgaccttggaaatttgggtgagagg  agcagaggttctgctggtggtggttaggtgtaggtgagaggggtacctgggactgtctaccagtggaacagccactaaaggattctgagtgagagcagag  ggccagctaaagtgactctccagagactgtctgactcagcccccctccacttggacacaggatgctgtgttctgagccagggtacaatgactcttt  ggtaagtgcagtggaagctgtactgcccagcaaaagctgggaggtgaggggtgactcagatcccagccagtgacttagcccctgttctgctctc  tgaatactggggtgacctggtaataatcaccagcagccctcccctgtgcccctctgatccactgcttaaatatgagtaggagcagggccctgctcctcag  ctcagcaccaccactgacctgggacagtgaaatagatctgagaactcagggtgagctatgggacctgatgtttcttccccctctttctatggttaagt  tcatgtcataggaagggaagaagtaacgggtacacataatgaccaaatcagggttaatttgcatttgaatttaaaaaatgcttctctttaaataacttttgt  ttactttatctaatactttccctaactcttcttctcagggcaataatgatacaatgtatcatgctcttggacacattcaagaataacagtgataattctgggta  aggcaatagcaatattctgcalataaataattctgcatataaattgtaactgatgaaagggttcatattgctaataagcagctacaatccagctaccattctgctt  tatttctggttgggataaggctggattattctgagccaagctagccccttctgtaacttcttatacctcttactctcccacagctctgggcaacctgct  ggctctctgctggcccacttggcaagcactagtgccacatggctagcagcctgacctgctgacctgctgctcctgctgctgctggggacag  ggcctctagcaatcccactgacctctagcagcagcctgagagcctgacagggggggagggcaaggtggccaccactgtagatagca  agatgctgttggagcccacttggagggtctctctgcccaccaccaatgaccactaattctgcccaccaagatcagctaacaccactgatgagcc  caccactcagcctaccactgagcccaccaccagcccactatcccaccaccagcccaccaccagctgctactgacgcccactaccagcccactac  tgggagcttctccctggccctgtgacctgtgctctgacctggagaccacagcactgagcctgctgctggggatgcccctggtgactcagcctgaag  ctgtaccatgcttctgcatgaagaaggtggagaccaaatggcctttagcccctttagcattgcccagcctgctgactcaggtgctgctggggctggg  gagaacaccaagaccaacctggagagcctcctgagctaccccaggacttactgtgtgaccagccctgaagggtctactaccaaggggtgact  tctgtgagccagatctccacagccctgacctgcccatacttftgtaatgccaagcagacctgtacagcagcagccccagggtgctgagca  acaactctgatctaactggagctgataaactgggtggccaagaacaccaacaagaattctaggtgctgagactctgcccctgacactagggct  ggctgctgtaafgcatctactgtctccaagtgaagaccacctgtatccaagaagactaggtgagccctccactcaagaactctgtgatcaa  ggtgccatgatgaacagcaagaagctggtgcccatttctgaccagacctggaagccaaggtggggcagctgagctgagccacaactctgag  cctggtgattctggtgcccagaactctgaagcagactggagacatggagcagcctctgctcctctgtgttcaagccatcatggagaagctggaga  tgagcaagttccagcccactctgctgactctgctgagatcaaggtgaccaccagccagacatgctgagcattatggagaagctggagtcttctgacttca</p>	20 30 40







	<p>caaacacacagccctccctgctgacclggagctggggcagaggctcagagacctctctgggccatgccacctccaacatccactcgacccctgg  aattcgggtgagaggagcagagggtgctctggctggttttagtgatgtagaggggtctagagctgaattcctcgagccaggggatcagcctctactgt  gcctctagttgccagccatctgtgtttgcccctcccccttgccttcttgacctggaagggtgccactcccactgtccttccataataaagagaaattgca  lcacallgctgagtaggtgctatctatctggggggggggggggggggcagagcagcaaggggggaggallgggaagacaatagcaggcatgctggggat  gcagtgggctctatggcttctgaggcagaagaaccagctggggctcgagatccactagggccgaggaacccctagtatggagttggccactccctc  ctcgcgcctcgcctcactgagccggggcaccaaaggctcggggcagccggggcttggccggggcctcagtgagcgagcgagcgcgag</p>
37	<p>ctcgcgcctcgcctcactgagcccccgggcaaaagcccggggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagaggagtgcccaactccatca  ctaggggtcctgcccctagtcgggatcttctaccagtggaaacagccactaaggattctcagtgagagcagaggccagctaatggctactctcc  cagagactgtctgactcacgcccccctccacttgacacagggagcgtgtgtttctgagccagtgacaatgactccttccgtaagtgcagtggaagct  gtacactgcccagcgaagcgtccggcagcgtagggcggcagctcagatcccagccagtgactgagccctgttctcctccgataactggggtga  ccttggttaatatcaccagcagcctccccgttggccctctggatccactgcttaaacggagcagggccctgtctcctcagctcagccaccac  cactgacctgggacagtgaaatagatcttgaactcaggggtgagctatgggacccttgatgtttcttccctctttctatggttaagttcatgcatagga  aggggagaaagtaacaggggtacacataatgaccaaatcagggttaatttgcattgtaatttaaaaaatgcttctctttaaatacttttttattctttctaa  tactttccctaactcttcttctcagggcaataatgataaatgtatcatgctcttccaccatttaagaataaacagtataattctggggttaaggcaatagca  atatttctcatataaattctgcatataaattgtaactgatgtaagggttctatgctaataagcagctacaatccagctaccattctgtttttttctgtgtg  ggafaaggctggattattctgagfccaagctagccctttgctaactgttctacactcttctctctccacagctcctgggcaacctgctgtctctctgct  ggcccatcactttggcaaaagcactagtcaccatggcctctagctgactctgctgctcctgctgctgctggggacagggccagctctaa  cccaatgctactctgctcctcagggaccctgagagcctgagggacaggggggagggcaagggtgccaccactgtgatctctaaagctgtttgtgg  agcccaactcctggaggtgagcagcctgccaccaccaacagcaccaccaactctgccaataagatcactgccaacaccactgatgcccaccaccag  cccactactgagcccaccaccagcctactatccagcccaccagcccactaccagctgccactgacagccctaccagcccaccactggcagcttt  gcccctggcctgtgaccctgtcctgacctggagagccattctactgaggctgtgctgggggatccctgtggtgacttctctgaaagctgtaccatgcttt  ctctgccatgaagaagggtgagactaacatggcttttagcccttcagcattctagcctgctgaccaggtgctgctggggctggggagaaactaaga  ccaacctggaatctatcctgagctacccaaggacttcacctgtgtgaccagccctgaagggttaccaccaagggggtgacctctgtgagccagaf  ctccacagccctgacctggccatcagggatactttgtaatgccagcagaacctgtacttctagccccaggggtgctgagcaataattctgatgtaac  ctggagctgatcaatactgggtgctaagaatacaacaagaatagcagcgtgctgactctgctcctctgataaccagctgctgctgctgtaagcc  attacctgtctgccaaggtggaagaccctttgaccctaaagaagactaggtgagccttccactcaagaactctgcaataaggtgccatgatgaacag  caagaagatcctgctggcccactttatgaccagactctgaaggccaagggtggccagctgcagctgagccataacctgagcctgtgatcctgctgcccc  agaacctgaaagcagctggggacatggagcaggtctgagccctctgtgttcaaggctattatggagaagctggagatgagcaagttccagcccac  tctgctgaccctgcccagaatcaaggtgaccacctctcagggacatgctgagcatatgaaaagctggagttcttgaactttctatgacctgaatctgtgtg  gacctgactgaggatcctgatctgaggtgctgcatcagcaccagactgtgctgagctgactgagactgggggtggaggctgctgctgcttctgcccac  tctgtggccagaccctgctgtgtttgaggtgagcagccctctgtgtgctgtggaccagcagcacaagttcctgtgttcatggcgagggtgtatg  accacagcctgacatctagaagctcagagggcacacaggaattctgggtcaccctgccccctccaacccctcagttccatctccagcagctgttt  gtgtgctgcttgaagtccacactgaacaactcagcctactatgtccctaaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaaacacacagccctcc  ctgctgctgaccttggagctggggcagaggtcagagacctctctggcccctgccaactccaacatccactgacccctggaafttcgggtgagagga  gcagaggtgtctgctgggttttaggtgtagtgtagaggggaggtcagagggcacacagaggtttctggctcaccctgccccctccaacccctcagttccc  atctccagcagctgtttgtgctgctcctgaagtccacactgaacaactcagcctactatgtccctaaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagc  aaacacacagccctccctgctgacctggagctggggcagaggtcagagacctctctggcccctgccaactccaacatccactgacccctgga  atftcgggtgagaggagcagaggttctctggcgtgttttaggtgtagtgtagaggggaggtcagagggcacacaggaattctgggtcaccctgccccct  ccaacccctcagttccatcctccagcagctgtttgtgctgctcctgaagtccacactgaacaactcagcctactatgtccctaaaatgggcaaacatt</p>

10

20

30

40

50

	<p>gcaagcagcaaacagcaaacacacagccctccctgctgctgacctggagctggggcagaggtcagagacctctctgggcccctgcccacccaacat ccactcgacccttggaaatcgggtgagagagcagaggttgctctggctggttttaggtgtgtagagggaggctcagagggcacacagggtttctg ggctcaccctgcccccctcaacccctcagttcccatctccagcagctgfttggctgctcctcgaagtcacactgaacaaactcagcctactcatgtcc claaaatgggcaaacatgcaagcagcaaacagcaaacacacagccctccctgctgacctggagctggggcagaggtcagagacctctctgggc ccatgccacctcaacatccactgacccttggaaatcgggtgagagagcagaggttgctctggctggttttaggtgtgtagaggggtctagagctg aattcctgagccaggggatcagcctctactgtgcttctagtgtccagccatctgttggctctccctcccccttggctctctgacctggaaggtgccactc ccactgtcccttaataaaatgaggaaatgcatcacatgctctgagtaggtgtcaltctatctggggggtgggggaggcaggacagcaaggggagg attgggaagacaatagcagcgatctgggatgacgtggctctctgctctgaggcagaaagaaccagctggggctcagatccaactagggccgca ggaaccctagtgatggagtggccactccctctctgcgcctcctcctcactgaggccggcgacaaaggctggcccgacgcccggcttggcccg ggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgag</p>	10
38	<p>ctgctgctcctcactgagcggcccgggcaagccggggcggcctcagtgagcgagcgagcgcagagagggagtggccaactccatca ctagggggtctcggccctagtagctcagagccacacaggagtcttggctcaccctgccccctcaacccctcagttccatctccagcagctg tttggctgctcctctgaagccacactgaacaaactcagcctactcatgtccctaaaatgggcaaacatgcaagcagcaaacacacagccct ccctgctgctgacctggagctggggcagaggtcagagacctctctgggccctgcccactccaacatccactgacccttggaaatcgggtgagag gagcagaggtgtctgctggctggttttaggtgtgtagaggggtaccggggtatctgtaccagtgaacagccactaaggattctgagtgagagcag aggccagctaaagtgtactctccagagactgtctgactcaccacccctccactggacacagggacgctgtgttctgagccaggtacaatgact ccttctgtaagtgcagtggaaactgtactgcccaggcaaacgctccgggcagcgtagggggcagctcagatcccagccagtggacttagccctg ttgtctctccgataactggggtgacctgtgtaataaccagcagcctccccgtggcctctggatccactgcttaataacggacgagacaggggccc tgtctctcagcttccagccaccactgacctgggacagtgaatagatctgagaactcaggggtgagctfatgggacctgatttcttccccttctttc tatggttaagtcatgtataggaaggagaaatgtaacagggtacacataatgaccaaatcagggttaatttgcattgtaatttaaaaaatgcttctctttaa tatacttttctttatcttatttctaatacttccctaactcttcttccagggcaataatgatacaatgtatcatgcctctttgaccacttcaaagaataacagtata atttctgggttaaggcaatagcaatatttctgcatataaatttctgcatataaattgtaactgagtaagaggttccatgtctaatagcagctacaatccagct accattctgcttatttctgttgggataaggtgctgattatctgagtcacaagctaggccctttgtcaatctgttccatactcttattctctcccacagctcctg ggcaacctgctggtctctcctgcccacacttggcaaaagcactagtgccacatggcctctagctgactctgctgactctgctcctgctgctggct ggggacaggccagctctaaccatgctactctcctcagaccctgagacctgacagcagggggggagggcaaggtggccaccactgt gatctcaatgctgttggtagccactctggaggtgagcagcctgcccaccacaacagcaccaccaactctgcccactaagatcactgccaacacca ctgatgagcccaccaccagcccactactgagcccaccaccagcctactatccagcccaccagcccactaccagctgcccactgacagccctacc agcccaccactggcagcttctccctggccctgtgacctgtgctcctcagaccctgagacctgacagcagggggggagggcaaggtggccaccactgt ctctgaaagctgtaccatcttctctccatgaagaaggtgagactaacatggcttttagccctctcagcattgctagcctgctgaccagggtgctgctggg ggctggggagaaactaagcaaacctggaatctatcctgagctacccaaggacttcacctgtgtgaccaggccctgaagggtccaccacaagg ggtagcctctgtgagccagatctccacagccctgacctggccatcaggatacttttgtaatgcccagcagaacctgtactcttagcccagggtgct gagcaataatctgatgtaacctggagctgatcaataactgggtgctaaagaatacaacaacaagattagcaggtgctgactctgctcctctgatacc aggctgggtgctgctaatgccatttacctgtctccaagtggaagaccacttttgaccctaaagactaggtatgagccttccactcagaactctgtcat taaggtgccatgatgaacagcaagaagtatcctgtggcccactttatgaccagactctgaagccaaggtggccagctgctgactgagccataacctg agcctgtgctcctgggtcccagaacctgaaagctgagctggagacatggagcagcctgagccccctgtgttcaaggctattatggagaagctgg agatgagcaagtccagcccactgctgaccctgcccagaatcaaggtgaccacctctcagacatgctgagcatcatgaaaagctggagttcttggact ttcttatgacctgaaatctgtgtggcctgactgaggtatctgctcaggtgtcctcatgagcaccagactgtctggagctgactgagactggggtgga ggctgtgctgcttctgcaatctgtggcccaggacctgtggttttaggtgaggtcagcagccctctgttggctgtggggaccagcagcaaaatgctgt tgtcatgggaggggtgtatgaccagagcctgacatctagacctgagctctcagagggccaccgagctccagtgccacggcagggctgtctctg</p>	20 30 40

10

20

30

40

50

	<p>aaatagcccctgtgtaaggccagagagctctccatctccaagccctgctaaaggacacagcagccaggaaagtcctccctgggcccctagctgaag  gacagcctgctccctccgctctaccaggatggcctgtctctatggaaggcactgccccatcccaactaatctaggaaactgcttaaccactactgctc  atgaatgtactaaaggatgaggtgagctacataccaataatgatttcgatagttcaaatggtgaaatfagcaattctacatgattcagctaatcaatggat  accgactgtttcccacacaagtctcctgttcttaagcttactactgacagcctttcactctccacaatacattaaagatfagccatccaagcccctc  ggatgacaccagacctgagagctgaaagacctggatcctctagagctgaattcctgagcagggggatcagcctctactgctccttctagtggccagcat  ctgtgtttgcccctcccctgctccttaccctggaaggtgccactcccactgctccttctaataaaatgaggaaatgcafcacattgctgagtaggtg  tcattctattctgggggtggggcagcagcaagggggaggtgggaagacaatagagggcatgctggggatgagtgaggctctatggcttc  tgaggcagaagaaccagctggggctcgagatccactagggccgaggaacccctagtgatggagtgccactccctctctgctgctgctgctcga  ctgaggccggcgaccacaaagctgcccgcaccccggcttggcccggcgctcagtgagcgagcgagcgcgag</p>	10
39	<p>ctgctgctgctgctgctcactgagggcccccggcgaagcccggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgagagggagtgccaaactccatca  ctaggggttcctgctgctgactagctcagagcagacagaggttctgggctcacctgccccctccaaccctcagttccatctccagcagctg  ttgtgtgctgctcctgaagtcacactgaacaaactcagcctactatgctccataaatgggcaaacatgcaagcagaacacagcaaacacagccct  ccctgctgctgactggagctgggagcagagctcctgctgcccactgcccactccaacatccactgaccccttgaattcggtagagag  gagcagaggtgtcctggctggttagtagtgtagaggggtaccggggatctgctaccagtggaacagccactaaggattctcagtgagagcag  agggccagtaagtgactctccagagactgctgactacgcccacccctccactggacacagcagctgtgtgttctgagccaggtacaatgact  ccttctgtaagtgagtggaagctgtacactgcccaggcaagcgtccggcgagctagcgggcgactcagatccagccagtgacttagcccctg  ttgctctccgataactgggtgacttggftaafaccagcagcctccccgtgcccctctggatccactgctaaatagcagagagacagggccc  tctctcagctcagcaccactgactggcagagtaagatctgagaactcagggtagtgatggacccttgatgtttcttcccctctttc  tatgttaagttcatgcataggaaggggagaagtaacagggatcacatattgaccaaactcaggttaatttgcattgtaatttaaaaaatgcttctctttaa  tatactttttttatctatfcttaatacttccataatctcttcttccagggcaataatgatacaatgatacatgctcttggcaccatcctaaagaataacagtgata  attctgggtaagcaatagcaatattctgcatataaataattctgcatataaattgtaactgatgtaagaggttctatattgtaatagcagctacaatccagct  accattctgcttttttctggttgggataagctgattattctgagctcaagctagccctttgctaaactgctctacactcttctctcccacagctcctg  ggcaactgctggtctctgctgcccacttggcgaagcactagtgccacatggcctctagctgactctgctgactgctgctgctgctgctgctgct  ggggacagggccagctcctaaccaatgctacttctgctcctcagcaccctgagagcctgagggacaggggggagggcaaggtggccaccactgt  gatcttaagatgctgtttgagagccatcctggaggtgagcagcctgcccaccaccaacagcaccaccaactctgccaactaagatcactgccaacacca  ctgatgagcccaccaccagcccactactgagcccaccaccagcctactatccagcccaccagcccactaccagctgcccactgacagccctacc  agcccaccactggcagctctgcccctgggctgacccctgtgctgctgactggagaccattctactgagcctgctgctggggatgcccctggtgactct  ctctgaaagctgaccatgcttctctccatgaagaaggtgagactaacatggcttttagcccctcagcattgctagcctgctgaccaggtgctgctggg  ggctgggggagaactaagaccaactggaatctatctgagctaccccaaggactcactgctgctgaccagggcctgaagggttaccaccaaggg  ggtgactctgtagccagatctccacagccctgacctggccatcagggatactttgtgaatgccaagaccctgactcttctgcccaggggtgct  gagcaataattctgatgctaaccctggagctgatcaatcctgggtggcctaagaatacaacaagaatgagcagcctgctgactctctcctctgatacc  aggctggtgctgctgaaatccattactgctgccaagtggaagaccatttggaccctaagaagactagatggagcctttccactcaagaactctgctcat  taaggtgccatgatgaacagcaagaatctctggtcccactttattgaccagactctgaaggccaaggtggccagctgagctgagccataacctg  agcctggtgatcctgctgcccagaacctgaagcagagctggagacatggagcagcctgagcccctgctgtcaaggctattatggagaagctgg  agatgagcaagttccagcccactgctgaccctgcccagaatcaaggtgaccacctctcagagacatgctgagcatatggaaaagctgaggttttctgact  ttcttatgactgaatctgctgctgactgagatcctgactgctgaggtgctgctgagcagcaccagactgctgctgagctgactgagactgggggga  ggctgctgctgctctgcatctctgctggccagaccctgctggtttgaggtgagcagcctctctgttctgctgctggaccagcagcacaagttctctg  gttctatggcaggggtatgaccacagcctgacatctgacctgagctctcagagggcactgagctccagtgccatggcaggaaggtgttctctga  ataccccctgtgtaaggccagagagctctccatctccaagccctgctaaaggacacagcagccaggaaagtcctccctgggcccctagctgaagg</p>	20 30 40

10

20

30

40

50

	<p>acagcctgctccctctgtctctaccaggaatggcctgtcctatggaaggcactgccccatccaaactaatctaggaatcactgtctaaccactcactgtcat  gaatggtfactaaaggatgaggtgagctacacaaatagtgatfftgatagttcaaaatggfgaatagcaattctacatgattcagctaatcaatgagatac  gactgtttcccacacaagctcctgttctcttaagcttactcactgacagcccttactctccacaatacattaaagatatggccatcaccaagccccctaggat  gacaccagacctgagagctgaagacctggatcctctagagctgaaltcctgcagccaggggatcagcctctactgtccctctagtggccagccatctgt  tgtttgccctcccccttgccttcttaccctggaagggtccactcccactgtcccttcttaataaaatgaggaatgcatcacattgctgagtaggtgtcatt  ctattctggggggggggggggggggcaggacagcaagggggaggaltgggaagacaatagcaggcatgctggggatgagtgggctctatggctcttgag  gcagaagaaccagctggggctgagatccactaggccgcaggaaccctagtgatggaggtggccactcctctctgctgctgctgctcactgag  ggccggggcagcaaaaggctgcccagcggggctttgcccggggcctcagtgagcagcagcgcgcag</p>	10
40	<p>ctgctgctgctgctgctcactgagggcccggcgaagcccggcgccctcagtgagcagcagcgcgcagagagggagtggccaactccatca  ctagggggttctgcccctagtactaggctcagaggcacacagaggtttctgggctcacctgtccccctccaaccctcagttccatcctccagcagctg  ttgtgctgctcctctgaaagcaccactgacaaactcagcctactcatgtccctaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaaacacacagccct  ccctgctgctgacttggagctggggcagaggctcagagacctctgtggccatgccacctccaactccactgaccccttggaafttcgggtggagag  gagcagaggtgtctgctgctggtttaggtagtgtagaggggtaccggggatcttctaccagtggaacagccactaaggattctcagtgagagcag  agggccagctlaagtggtactctccagagactgctgactcagccacccccctccacttggacacagggacgctgtgtgttctgagccagggtacaatgact  cctttcgtaagtgcagtggaagctgtacactgcccaggcaaacgctcggggcagcgtaggcggcgcactcagatcccagccagtggacttagcccctg  ttgctcctccgataactggggtgacctgttaataatccaccagcctccccctgttccccctctggatccactgttaataacggagcagggagggccc  tgtctcctcagctcagccaccactgacctgggacagtgaaatagatcttgaactcagggtagtctatggacccttgaatttcttcccccttctt  tatggftaggtctgctataggaaggggagaaagtaacaggggtacacataatgaccaaatcagggtaatttgcatttgaatttfaaaaaatgcttcttctttaa  tatactttttgttattctattctaatcttccctaatcttcttctcagggcaataatgatacatgctatctgcttcttgcaccafftaagaataacagtata  atttctgggttaaggcaatattctgcataataatattctgcataaaatgtaactgatgtaagaggttcatattgtaatagcagctacaatccagct  accattctgcttttatttctggttgataaggctgattattctgagccaagctagcccttttctaactctgttctacactcttattcttccccacagctcctg  ggcaacctgctgtctctctgctggccccacttggcaaaagcactagtgccacatggcctctagcctgactctgctgactctgctgctgctgctggct  ggggacagggccagcttaacccttaacttctgctcctcctcagaccctgagagcctgacggacaggggggagggcaagggtggccaccactgt  gatcttaagatgctgttttggagcccactctggaggtgagcagcctcccaccaccaacagcaccaccaactctgccaactaagatcactgccaacacca  ctgatgagcccaccaccagcccactactgagcccaccaccagcctactatccagcccaccagcccactaccagctgcccactgacagccctacc  agcccaccactggcagcttctgcccctggcctgtgacctgtgctgacctggagagccattctactgagcctgtgctgggggatccctgtggactct  ctctgaagctgtaccatgcttctctgcatgaagaagggtggagactaacatggcttttagccctcagcattgctagcctgctgaccaggtgctgctggg  ggctggggagaactaagaccaactggaaatctatctgagctaccccaagcactcactgtgtgaccagggcctgaagggttaccaccaagggg  gggtacctctgtgagccagatctccacagccctgacctggccatcaggatatttggtaagccagcagaacctgtactctttagccccagggtgct  gagcaataattctgatgtaacctggagctgataacactgggtggtaagaatacaacaacaagattagcagcgtgctggactctgctcctctgatacc  aggctggtgctgctgaatccalltacctgtgccaagtgaagaccactltagccctaaagactaggtggagcclltccactcaagaactctgtcal  taagggtcccctgatgaaacagcaagaatctctgtggccactttatgaccagactctgaaagccaagggtggccagctgagctgagccataacctg  agcctggtgatcctgggtccccagaacctgaagcatagcctggaggacatgagcagcctctgagccctctgtgttcaaggctattatggagaagctgg  agatgagcaagttccagcccactctgctgacctgcccagaatcaagggtgaccactctcagacatgctgagcactatggaaaagctggagttcttact  ttcttatgacctgaaatctgtgtgctgactgaggatcctgactgagcaggtgctgcatgagcaccagactgtgctgagctgactgagctgggtgga  ggctgctgctgcttctgcatctctgtggccaggacctgctggtttgaggtgacagcagccttctggttctgctggtggaccagcagcaaaattctg  gttcatgggcaggggtatgacccagcctgacatctagaaatcaaccttggattacaaaattgtgaagattgactgtattcttaactatgttctcct  ttacgctatgtgatacgtcttfaatcccttgtatcatgctattgcttccctgtagcttcttcttctctctgataaaatcctggttagtcttccacggcg  gaaactcatgccctgcttcccctgctggacaggggctcggctgttggcactgacaatccgtgtgttctlagagctgaaftctgacggcagggg</p>	20
		30
		40

	<p>gatcagccttactgtgcttctagttgccagccatctgttttccccctcccccttgccttcttaccctggaaggtgccactcccactgtcttcttaataa  aatgaggaaattgcatcacattgtctgtagtggtgtcattctatcttgggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagca  ggcatgtggtggatgagtggtgctctatggctctgaggcagaagaaccagctggggctcgagatccactaggccgagaaaccctagtatgga  gttggccactccctctctgctgctcctcactgaggccggcgaccaaaaggtcggccgacgggggttggccggcgctcagtgagcg  agcgagccgagcag</p>
41	<p>ctgcgcctcgtcgtcactgaggcccccggcaaaagcccggcgccctcagtgagcgagcgagcgagagggagggtggcaactccatca  ctaggggttctcggcctgactactaggctcagaggcacagggatttctgggctaccctgccccctccaaccctcagttccatcctccagcagctg  tttgtgtgctcctctgaagtcacactgaacaaactcagcctactatgtccataaaatgggcaaacattgcaagcagaacacagcaaacacagccct  ccctgctgctgacttggagctggggcagaggtcagagacctctctggcccatgccacctccaacatccactgacccttggattctgtgagag  gagcagagggttctctggctgttttagtagtgtagaggggtaccggggcttctaccagtggaaacagccactaaggattctcagtgagagcag  agggccagctaaagtggtactctccagagactgtctgactcagccaccctccacttggacacagagcgtgtgtttctgagccaggtacaatgact  ccttctgtaagtgagtggaagctgtacactgcccaggcaaaagctccgggacagctagggcgactcagatcccagccagtgacttagccctg  ttgtctctccgataactggggtagcttggtaataatcaccagcagcccccgttgcctctgactccactgctaaatagcagagagagggccc  tgtctctcagctcagccaccactgactgggacagtgaatagatctgagaactcagggtgagctatggaccctgatgtttcttcccccttcttc  fatggttaagttcatgcatagaaggggagaagtaacagggatcacafatgaccaaatcagggttaatttgcattgtaatttaaaaaatgcttcttcttaa  fatactttttgttatctatttctaatacttcccaatacttcttccaggcaataatgatacaatgtatcatgctcttggaccattctaagaataacagtata  atftctgggttaagcaatagcaatattctgcatataatattctgcatataaattgtaactgatgtaagaggttcatattgctaatagcagctacaatccagct  accattctgcttttctggttgggataagctggtatattctgagtcaggctagcccttttgcataatctgttcafacctcttattctcccacagctctg  ggcaacctgctggtctctgctgcccacttggcaaaagcactagtcccaatggcctctagctgactctgctgctgctgctgctgctgctgctg  ggggacagggccagcttaacccaatgctacttctagctcctctcaggacctgagagcctgcaggacagggggagggcaaggtggccaccactgt  gatctctaagctgtgttggagccatctggaggtgagcagctgccaccaccaacagcaccaccaactctgccaactaagatcactgccaacacca  ctgatgagcccaccaccagcccactactgagcccaccaccagcctactatccagcccaccagcccactaccagctgcccactgacagccctacc  agcccaccactggcagcttctccctggcctgtgacctgtgctctgacctggagagccattctactgagctgtgctggggatgcccctgtggtgacttct  ctctgagctgtaccatgcttctctgccaagaaggtggagactaacatggcttttagcccctcagcattgctagcctgctgaccaggtgctgctggtg  ggctggggagaactaagaccaacctggaatctatctgagctacccaaggacttccactgtgtgaccaggccctgaagggcttaccaccaaggg  ggtgacctctgtgagccagatctccacagccctgacctggccatcagggatactttgtgaaatgcaagcagaacctgtactctttagcccagggtgct  gagcaataattctgatgtaacctggagctgataactctgggtgtaagaatacaacaacaagatgagcagctgctggactctgcttctgatacc  aggctggtgctgctgaatgacattacctgtctgccaagtggaagaccactttgacctaaagaagactagatgagccttccacttcaagaactgtgcat  taaggtgcccagatgaacagcaagaagtatctgtggcccactttattgaccagactctgaagccaaggtggccagctgcaagctgagccataacctg  agcctgtgatcctggtgcccagaacctgaaagcagctgagggagatgagcagcctctgagcccctgtgttcaaggctatfatgagaagctgg  agalgagcaagttccagcccactctgctgaccctgcccagaatcaaggtgaccacctctcagagatgctgagcatcatggaaaagctggagttcttact  ttcttatgacctgaatctgtgtgacctgactgaggatcctgatctgaggtgtctgcatgagcaccagactgtgctgagctgactgagactgggggtgga  ggctgctgctgcttctgcatctctgtggccaggacctgctgtgttggaggtcagcagcccctctgtttgtgctgtggaccagcagcaaaagttctg  tgtatgaggcaggggtatgaccccagagcctgacatctagaatcaacctctggattacaaaattgtgaaagattgactgtattcttaactatgtgctcct  ttatgctatgtgataatgctgttaatgccccttctatcatgctattctctgtatgcttctctctctctctgtataaatcctggttagttcttccatggtgga  actcattctgctgcttccctgctgctgacaggggctgctgttgggactgacaattctgtggttcttagagctgaattctgcaagcccaggggagc  agcctctactgtgcttctagtggccagccatctgttttggcccccccccttgccttctgacctggaaggtgccactcccactgcttcttaataaaatg  aggaaattgcatcattgtctgagtaggtgtcattctatcttgggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcagggc  atgctggggatgagtggtgctctatgcttctgaggcagaagaaccagctggggctcgagatccactaggccgaggaaccctagtatgaggtg</p>

10

20

30

40





	<p>gaaccctagtgatggagtggccactccctctctcgcgctcgtcgtcactgagccggcgaccaaaggctcccagacccgggcttggccgg gcgccctcagtgagcgagcgagcgcgag</p>
44	<p>ctgcgctcgtcgtcgtcactgagcccccggcgaagcccggcgccctcagtgagcgagcgagcgagagagggagtgccaactccatca ctaggggttctcgcgctactaggtcagagggcacacagaggttctgggctcacctgcccccctccaacccctcagttcccactccagcagctg ttgtgtctgctcctctgaagtcacactgaacaaactcagcctactcatgcccctaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaaacacacagccct cctgctcctgctgacctggagctggggcagaggtcagagacctctctggcccctgccacctccaacatccactcgaccttggaaattcgggtgagag gagcagaggggttctcgtgctggtggtggtgagaggggtaccgggctctgctaccagtggaaacagccactaaggattctgagctgagagcag agggccagctaaagtgactctcccagagactgctgactcacgcccccctccacctggacacagagacgctgtggttctgagccaggtacaatgact ccttctgtaagtcagtggaagctgtacactgcccaggcaaacgctccggcgagctgagggcgactcagatccagccagctggacttagccctg ttgtcctccgataactggggtgaccttggtaataatccagcagcctccccctggcccctctggatccactgcttaatacggagcaggacagggccc tgtctcctcagctcagccaccactgacctggcagctgaatagatctgagaactcagggtgagcttgggacctgtgtttcttcccctcttctt ttggttaagttctgtataggaagggagaagtaacagggtagacatattgacaaaacagggtaatttgcatttgaattttaaattgcttcttctta atacttttctt ttctgggttaagcaatagcaatattctgcatataaattctgcatataaattgtaactgtgtgaagaggttcatattgctaatagcagctacaatccagctac cattctgctt caacctgctgctcctcgtgcccactcttggcaaacactagtgccacctgagcctctagctgactctgctgactctgctgctcctgctgctgctg ggacagggccagctcaacccaatgctactcttagctcctcagaccctgagagcctgacagcaggggggagggcaagggtggccaccactgtga tcttaagatgctgttctgagcccatctggaggtgagcagcctgccaccaccaacagcaccaccaactctgccaactaagatcactgccaacaccact gatgagcccaccaccagcccactgagcccaccaccagcctactaccagcccaccagcccactaccagctgccactgacagccctacca gcccaccactggcagctctgcccctggcctgtagccctgtgctcctgacctggagaccattctactgagcctgtgctgggggatccctgtgactctc tctgaagctgtaccatcttctctgccaatgaagaaggtggagactaacatgctttagccccttcagcattgctgagcctgctgaccaggtgctgctggg gctggggagaacactaagaccaactggaatctatctgagctacccaaggaacttccctgtgtgaccagccctgaaggcttaccaccaagggg gtgacctctgtgagccagatctccacagccctgacctggccatcaggatacttttgaatccagcagaacctgtactcttagcccagggctgta gcaataatctgatcctaacctggagctgatcaaacctgggtggtaagaalaccaacaacaagattagcaggtgctgactctctgcttctgataccag gctggtgctgctgaatgccatttctgctcgaagtggaaaccactttgaccctaagaagactagatggagccttccactcaagaactctgctatta aggtgccatgatgaacagcaagaatctctgctggcccactttattgaccagactctgaaggccaaggtggccagctgacagctgagccataactgag cctggtgatcctggtgcccagaacctgaagcagatagctggagacatggagcaggtctgagcccctctgttcaaggctattagagaagctggag atgagcaagttccagcccactctgctgacctgcccagaatcaaggtgaccacctctcagacatgctgagcatatgaaaagctggagttcttactttt cttatgacctgaatctgtgtgcccactgagatcctgctgaggtgctgccaatgagcaccagactgtgctgagctgactgagactgggggtgag gctgctgctgcttctgccaatctgtggccagaccctgctggtgtttaggtgctgagcagcccctctgttctgctgtggaccagcagcaaatctctgt gtcatggcaggggtgatgaccagagcctgacatctagagctgaattctctgagccaggggatcagcctctactgtccttctagtggccacatct gtgttttccccctcccctgcttctgacctggaaggtgccactcccactgctcttcttaataaaatgaggaattgcatcattgtctgagtaggtctc attctatctgggggtgggtggggcagacagcaagggggaggattgggaaacaatagcaggtctggggatgagctgggctctatggctctg aggcagaagaaccagctgggctcagatccactagggccgaggaacccctagtgatggagttggccactccctctctcgcgctcgtcgtcact gagggccggcgaccaaaggctcccagcggggcttggccggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgag</p>
55	<p>cctgagcagctcgcgctcgtcgtcactgagcccccggcgaagcccggcgccctcagtgagcgagcgagcgagagggagtg ccaactccatcactaggggtctcgcgctagtaggtcagagggcacacagaggttctgggctcacctgccccctccaacccctcagttccatc ctccagcagctgttctgctgctcctgaagtccacactgaacaaactcagcctactcatgtccctaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaa</p>

10

20

30

40

	<p>acacacagccctccctgctgacctggagctggggcagaggtcagagacctctctgggccatgccacctccaacatccactcgacccttggaaatt  tcggtgagagagcagagaggttctctgctgctgttttaggtagtgtagaggggtaccggggatcttctaccagtggaaacagccactaaggattctgc  agtgagagcagagggccagctaaagtgtactctccagagactgtctgactcagccacccccctccacttggacacaggacgtgtgtttctgagcca  ggtacaatgactccttctgtaagtgcagtggaagctgtactctcccaggcaaacgctccggcagcgtagggggcactcagatcccagccagctgg  acttagccctgttctcctccgataactggggtagcttggtaataatccaccagcagctcccccttggccctctggatccactgttaaatcggacga  ggacagggccctgtctcctcagctcagccaccactgacctgggacagtgatagatcttgaactcagggtagtctatggacccttgatgtttc  ttccccttctttctatggttaagtcatgtcataggaaggggagaagtaaacagggtacacataattgacaaatcagggttaatttgcatttgaatttaaaaaat  gctttctctttaaataactttttgtttatcttatttlaatactttccctaactcttcttctcaggcacaataatgatacaatgtatcatccctcttgcaccattctaaag  aataacagtgataaattctgggttaagcaatagcaatattctgcatataaaatcttctgcatataaattgtaactgatgtaagaggttcatattgtaatagcag  ctacaatccagctaccattctgctttatttctggtgggataagctggtattctgagtcacaagctaggccctttgtaacttctgttcatacctcttattctctc  ccacagctcctggcaactgctgtctctctctgcccacatcttggcaagcactagtcaccatggcctctaggctgactctgctgactctgctgct  cctgctgctgctgggacagggccagcttaaccccaatgctacttctgctcctctcaggaccctgagagcctgagcaggacaggggggagggcaaggt  ggccaccactgtgatcttaagatgctgttgggagcccaactctggaggtgagcagcctgcccaccaccaacagcaccaccaactctgccactaatgatca  ctgcaacaccactgatgagcccaccaccagcccactagcaccaccaccagcctactatccagcccaccagcccactaccagctgccactg  acagccctaccagcccaccactggcagcttctgcccgggctgtgacctgtctctgacctggagagccattctactgaggtgtgtctgggggatgccc  ctgggtgactctctgtaagctgtaccatgcttctgccaatgaagaaggtggagactaacatgcttttagcccctcagcattgctagcctgctgaccca  ggtgctgtctggggctgggagaactaaagaccaactggaatctatctgagctaccccaaggactcacctgtgtgcaccagggcctgaagggtctc  accaccaaggggtgacctgtgagccagatctccacagccctgacctggccatcagggatacttttggatgccaagcagaacccctgactcttctagc  cccagggctgctgagcaataatctgatctaactggagctgatcaatctgggtgctaaagaatacaacaagaattagcaggctgctgactctctg  ccttctgataccagctggtgctgtaatgccattactgctgccaagtgaagaccactttgacctaaagaactagatggagcctttccactcaaa  gaaactctgcataggtgcccagatgaaacagaagaagtaactctgtggcccacttattgaccagactctgaaggccaaggtggccagctgagctga  gccataactgagcctggtgatctggtgcccagaacctgaagcataggtgaggacatggagcaggtctgagcccctctgtgtcaaggctattatg  gagaagctggagatgagcaagttccagcccactctgctgacctgcccagaatcaaggtgaccacctctcaggacatgctgagcatcatgaaaaagctg  gagttcttctgactttctatgacctgaatctgtgtgcccctgactgaggaactctgactgaggtgtctgcatgagcaccagactgtctggagctgactgag  actgggggtggaggtgctgctgcttctccatctctgtggccaggacctgctgggttggaggtgagcagcccttctgttctgtgtggaccagcag  cacaagttctgtgtctatgagcagggtgatgaccagagcctgacatctagactccataaagtaggaaacactacacattccataaagtaggaaaca  ctacaaccagttccataaagtaggaaacactacatcactccataaagtaggaaacactacacttagagctgaattctctgacagccaggggatcagcctcta  ctgtccttctagtgtccagccatctgttcttcccctcccccttgccttctgacctggaagggtgcccactcccactgtccttccataaaaatgaggaaatt  gcatcacatgtctgagtaggtgtcattctatctgggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggttgggaagacaatagcaggtcagctggg  gatgagctgggctctatgcttctgagcagaaaagaaccagctgggctcagatccactagggccgaggaacccctagtgatggagttggccactcc  ctctctgctgctcctgctcactgagggccggcgaccaaaggtcggccgacggcggccttggccggggcggcctcagtgagcagcagcagcgcg  ag</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p>
56	<p>cctgagggcagctgcgctgctgctcactgagggcccccgggcaagcccgggctcagtgagcagcagcagcagagggaggtgg  ccaactcactcactaggggttctgctgagcctagtaggctcagagggcacacagaggttctgggctaccctgccccctccaaccctcagttccactctc  cagcagctgttctgctgctcctgtaagtcacactgaacaaactcagcctactcatgtccctaaaatggcaaacattgcaagcagcaaacagcaaac  cacagccctccctgctgacttggagctggggcagaggtcagagacctctgtggccatgccactccaacatcactcagcccttggatttctg  gtggagaggagcagaggttctgctggcgtgttttaggtatgtgagaggggtaccggggatcttctaccagtggaaacagccactaaggattctgact  gagagcagagggccagctaaagtgtactctccagagactgtctgactcagccacccccctccacttggacacaggacgtgtgttctgagccaggt  acaatgactccttctgtaagtgcagtggaagctgtactctcccaggcaaacgctccggcagcgttagggggcactcagatcccagccagtgagct</p>	<p>40</p>

10

20

30

40



	<p>aggaggagaggagggaattcgctaagaggactggggcctgagacggaatggggggcggcccccggggggggtggggccctgggctcccag  gggtgggagctggctccgaggtgctggctccgaggtccgctgacgtccgcccagatggcctctaggtgctgactctgctgctctctgctg  ctggctggggacaggggccagctctaaccaatgctactctgactctctcaggacctgagagcctgaggacaggggggagggcaaggtggccac  cactgtgatctctaagatgctgtttggagccatcctggaggtgagcagcctgcccaccaccaacagcaccaccaactctgcccactaagatcactgcca  acaccactgatgagcccaccaccagcccactactgagcccaccaccagcctactatccagcccaccagcccactaccagctgcccactgacagc  cctaccagcccaccactggcagcttctgcccctggcctgtagacctgtagctctgacctggagagcacttactgaggctgctgctggggatgcccctgg  ggacttctctgaagctgtaccatgcttctctccatgaagaaggtggagactaacatggcttttagccccttcagcattgctagcctgctgaccagggtc  tctgggggctgggggagaactaaagacaaactggaatctatcctgagctaccccaggactcactctgtgaccaggccctgaaggcttaccac  caagggggtgacctctgtagccagatctccacagccctgacctggccatcaggatactttgtaatccagcagaacctgtactctctagcccag  gggtgctgagcaataattctgatgtaacctggagctgatcaatacctgggtggtaagaataaccaacaagattagcaggctgctgactctgcttct  gataccagctgctgctgctgaatgcccattactgctgccaagtggaaagaccactttgacctaaagactagatggagccttccacttcaagaact  ctgctatgaaggtgcccctgatgaacaagaagatctctgctggcccactttattgaccagactctgaagccaagggtggccagctgagctgagccat  aacctgagcctggtgatcctgggtgcccagaacctgaagcatagctgctggagacatggagcaggcctgtagcccctctgtttcaaggctattatggaga  agctggagatgagcaagttccagcccactctgctgacctgcccagaatcaaggtgaccacctctcagacatgctgagcatcatgaaaaagctggagtt  ctttgactttctatgacctgaatctgctggcctgactgagatcctgatctcagggtctgctccatgagcaccagactgctgctggagctgactgagactg  gggtggaggctgctgcttctccatctctgctggccagacctgctggtttgaggtgagcagcccctctctgtttgctgctgggaccagcagcaca  agttctctgtgttcatggcagggtgtatgcccagagcctgacatctagagctgaatctctgagccaggggatcagcctctactgtgcttctagtgtc  cagccatctgtgtttgcccctccccctgcttctgacctggaaaggtgccaactcccactgcttcttaataaaatgaggaaattgcatcattgctga  gtaggtgctatctattctgggggggtgggtggggcagacagcaagggggagaltgggaagacaatagcaggcatgctggggatgagtgggctct  atgcttctgaggcagaagaaccagctggggctcagatccactaggggccgaggaacctctagtgatggagttggccactccctctctgctgctgctg  ctgctcactgagccggcgaccaaaaggtcggcggcggcctgctggggcggcctcagtgagcagcagcggcgag</p>	<p>10</p> <p>20</p>
<p>60</p>	<p>cctgagcagctgctgctgctcactgagcccggggcaagcccggggcggcctcagtgagcagcagcgcgagagagggaggtgg  ccaactccactactagggttctgctgctgctgactaggtcagaggcacacagagtttctgggctcacctgccccctccaacctcagttcccatc  ctccagcagctgtttgtgctgctcctctgaagtcacactgaacaaactcagcctactcatgtccctaaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaa  acacacagccctccctgctgctgactgagctggggcagaggtcagagacctctctggcccattgccacctccaacatccactgacccttggaaft  tcgggtgagagagcagaggttctcctgctgctggttaggtgtagtgtagaggggtaccggggatcttctaccagtggaaacagccaataagattctg  agtgagagcagagggccagctaaagtgactctccagagactgctgactcacgcccccctccacttggacacagagcgtggtttctgagcca  ggtaacatgactctttcgtaagtgagtggaagctgtactctccagcgaagcgtccgggagcgtaggggggactcagatccagccaagtg  acttagcccctgtttgctctccgataactgggtgacctggttaataatcaccagcagcctccccctgtgcccctctgactccttaataacggacga  ggacagggccctgctcctcagctcagcaccaccactgacctgggacagtgaaatagctttaggaataacagggtgagcaatttcaaaaaagttcat  tctttaaaaactcgagacacatfttgtacatgctgttttattgttactcatgaagacgggggaagctttggtgtgtaaaagctgagaactgcaccaa  gcttcccgttccccaccctaccaggggalttggctaaatcctggcctggcccacaagaagaccaagcggctcagtccttccctccctcctgatt  acaggaactcacaccagcgaatcttcttaattgtaactggcagtgctccggggcagccaatagctaagactccccccccgaccccaccctccc  tgacctgggggactctactcagctgcactggagctgctggtgaccagaagttggagtaggtttgctgctgggaggggtggggagtaggtgga  aagcatgagtgaaaggtctaggaggggtctcctcacccccctcctgctggcctgactcggggctctatagccttctccactgggact  ctgctcctcctaccagcccctcccctcagcctggtgtgctgagccccagacctcccctcccacgctctgctcctattgtttggttaagca  ggaccccctcccctcccaccctcccctcctgactgaacagatggacagagaccggggccacggggagaggaaaggccagccggtgcccggaa  agggaagcgtttgggaaacaaaacagaggagagccagggagaaggtggcccagggaggaggagggaattcctaagagggactgg  ggcctgagacgggaatggggggcggcccccggcgggggtggggcccctggctcccaggtggagctgctccgagctgctgctccgaggt</p>	<p>30</p> <p>40</p>

10

20

30

40

50

	<p>ccgctgacgtcgcgcccagatggcctctaggctgactctgctgactctgctgctgctgctgctgctggggacagggccagcttaacccaatgctact  tctagctcctctcagaccctgagagcctgcaggacagggggaggcaaggtggccaccactgtgatctaaagatgctgtttgtagccatctgg  aggtagagcagcctgcccaccaccaacagcaccaccaactctgccactaagatcactgccaaccactgatgagcccaccaccagcccactactgag  cccaccaccagcctactatccagcccaccagcccactaccagctgcccactgacagccctaccagcccaccactggcagcttctgcccctggcct  gtgacctgtgctctgacctggagaccattctactgaggctgtgctgggggatgcccctgggtgactctctctgaaactgtaccatgcttctctgcatgaa  gaaggtgtagactaacatgcttttagcccctcagcattgctagcctgctgaccagggtgctgctggggctgggggagaaactaagaccaacctggaa  tctatctgtagctaccccaaggacttccctgtgtgaccagcccctgaaggcctcaccaccaaggggggacccctgtgagccagatctccacagccc  tgacctggccatcaggatactttgtgaatgccagcagaacctgtactctctagcccagggtgctgagcaataatctgatgtaacctggagctgac  aatactgggtgctaaataaccaacaacaagattagcaggctgctgactctctgcttctgataccaggctgctgctgctgaatgccattacctgtctg  ccaagtgaagaccctttgaccctaagaagactagtagtgagccttccactcaagaactctgcttaaggtgccatgatgaacagcaagaagtatc  ctgtggcccactttatgaccagactctgaaggccaaggtggccagctgacagctgagccataacctgacctggtgatctctgctggcccagaacctgaa  gcalaggtgtaggacatgtagcagcctgtagcccctctgttcaaggctataltgagaagctggagatgagcaagttccagcccactctgctgacc  ctgccagaatcaaggtagccacctctcaggacatctgagcatcatgaaaagcctggagtcttctgactttcttatgacctgaatctgtgctggcctgactga  ggatctgatctcaggtgtctgcatcagcaccagactgtgctggagctgactgagactgggggtggaggctgctgctgcttctgcatctctgtggcca  ggacctgctgctgtttgaggtgagcagcctctctgtttgtgctggtggaccagcagcaagttctgttcatggcagggtgtatgaccaccagag  cctgacatctagagctgaatctctgacccaggggatcagcctctactgtccttctagttccagccatctgttctgcccctcccctgctcctctgac  cctggaaggtgccactcccactgcttcttaataaaaatgaggaattgcatcacatgtctgagtaggtgctcattctatctgggggtgggggtggggcag  gacagcaagggggaggtggaagacaatagcaggcatctggggatgagctggtctctatgcttctgagccagaaaagaccagctgggctcga  gatccactagggccgagcaaccctagtgtgaggtggccactccctctctgctgctgctgctgactgagccggcgaccaaaggtcggcccga  cgcccggcttggcccggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgag</p>	<p>10 20 30 40</p>
<p>61</p>	<p>cctgcaggcagctgcgctgctgctgctgactgagcccggggcaaaagcccggggcctcagtgagcgcgagcgcgagagggaggtgg  ccaactccactactagggtctgctgctgctgactgagcctcagagcagcagcagcgcgagcgcgagagggaggtgg  ctccagcagctgtttgtgctgctgctgctgaggtccacactgaaacaaactcagcctactatgctccctaaaatggcaaacattgcaagcagaaacagcaa  acacacagccctcctgctgctgactgagctggggcagaggtcagagacctctctggcccattgccactccaactcagacccttggaaft  tcggfagagagagcagaggtgtcctgctgctgtttgtaggtgtagaggggtaccggggatctgtctaccagtggaacagccactaaggatctgc  agttagagcagagggccagtaagtgtactctccagagactgtctgactcagcccccctccacttgacacagcagctgtggttctgagcca  ggtacaatgactccttggtaagtgcagtgaagctgtactgcccaggcaagcgtccgggcagcgtagggcggcagactcagatcccagccagtg  acttagccccgtttgctctccgalaactggggtagcttggtaataatcaccagcagcctcccctgctgcccctggtaccactgcttaataacggacga  ggacagggcctgtctcctcagctcagccaccactgacctgggacagtgaatagatctgaggaataacggaggtgagcaattccaagaagttcat  tctttaaactcggagcacatftgtgtacatgctgtttttattgtactcatgaagacgcccggggaagcttgggtgtgtaaagctgagaactgaccccaa  gcttcccgttcaaccacccaccaggggattgggctaaatctggcctgcccacaaagaagaccaagcggctagctccattccgtccatctgatt  acaggaaactcaccagcagatcaatcttcttaattgttaactggcaggttcccggccagcacaatagctaagactgcccccccgcacccaccctccc  tgacctgggggactctactctgagaactcagggtagtctatggaccctgatgtttcttcccctcttctatggttaagttcatgctataggaagg  gagaagtacaaggttacacatattgaccaaatcaggttaatttgcattgttaatttaaaaaatgcttctctttaaataactttttgtatcttatttacttt  ccataatcttcttccagggcaataatgatacaatgtatcatgctcttgcaccattctaaagaataacagtgataatttctgggtaaggaatagcaatatt  ctgcatataaataattctgcatataaattgtaactgatgtaagaggttcatattgctaatagcagctacaatccagctaccattctgctttattttctggtggata  aggctggattattctgagccaagctagccctttgctaaactgttctacactcttcttcccacagctcctgggcaacctgctgctctctctgctgccc  atcactttggcaagcactagtccaccatggcctctaggctgactctgctgactctgctgctgctgctgctggggacagggccagcttaaccccaa  tgctactctgactctcctcagaccctgagagcctgcaggacagggggaggcaaggtggccaccactgtgatcttaagatgctgtttgtagccca</p>	<p>30 40</p>

	<p>tcctggaggtgagcagcctgccaccaccaacagcaccaccaactctgccactaagatcactgccaacaccactgatgagcccaccaccagcccacta  ctgagcccaccaccagcctactatccagcccaccagcccactaccagctgccactgacagccctaccagcccaccactggcagcttctccctg  ggcctgtgacacctgtctctgacctggagagccattctactgagcgtgtctgggggatccctggtggacltctctgaaagctgtaccatgttctctgcc  atgaagaaggtggagactaacatggcttttagcccctcagcattgctagcctgctgaccaggtgctgctggggctggggagaaactaagaccaacc  tggaaatctatcctgagctacccaaggacttcacctgtgtgaccagggcctgaagggtcaccaccaagggggtgacctctgagccagatctccac  agccctgacctggccatcagggafacttttgaatgccagcagaacctgtactcttagccccagggtgctgagcaataattctgatcaacctggagc  tgaatcaatcctgggtgctaagaataccaacaacaagattagcagggctgctgactctctgcttctgataaccaggctggtgctgctgaatgccattact  gtctgccaagtggagaccactttgaccctaagaagactagatggagcctttccactcaagaactctgtcattaaagggtgccatgatgaacagcaagaa  gtatcctgtgcccactttattgaccagactctgaaggccaaggtggccagctgcaagctgagccataacctgagcctggtgatcctggtgcccagaacc  tgaagcatagctggaggacatggagcagcctctgagcccctgtgttcaaggctattatggagaagctgagatgagcaagtccagcccactctgctg  acctgcccagaatcaaggtgaccacctctcagacatctgagcatcatggaaaagctggagttctttgacttttctatgacctgaatctgtgtgctgac  tggagatcctgatctgaggtgtctgcatcagcaccagactgtctggagctgactgagactgggggtggaggctgctgcttctgacctctctgtggc  caggacctgctggtgtgaggtgacagcaccctctctgttctgtgctggaccagcagcaagttcctgtgtcatggggcagggtgtatgcccag  agcctgacatctagagtgtaactctctcagccaggggatcagcctctactgtcctctagtggccagccatctgtgtttgccctccccctgctctctg  acctggaaggtgccactcccactgtcttctcaataaaatgaggaaatgcatcattgtctgagtaggtctattctatctgggggtgggggtggggc  aggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcagcagctgctgggatgagctgggctctatgcttctgagcagaaaagaaccagctggggctc  gagatccactagggccgaggaacctatgtatggagttggccactccctctctgctgctgctgctcactgagggccggcgacaaaaggtcggcc  gacggccgggctttgccggggcggcclcagtgagcagcagcagcgcag</p>	10
62	<p>cctgacgagcagctgcgctgctgctcactgagggccgggcaaagcccggggcctcagtgagcagcagcgcgcagagagggaggtgg  ccaactccaactaggggttctgctggcctagtagctcagaggcacacagaggtttctgggctaccctgccccctccaacccctcagttcccatc  ctccagcagctgtttgtgtgctgctcctgaagtcacactgaacaaactcagcctactatgtccctaaaatgggcaaacattgcaagcagaaacagcaa  acacacagccctccctcctgctgaccttggagctggggcagaggtcagagacctctgggccatgccacctccaacatccactgacctctggaatt  tcggtggagagggagcagaggtgtcctgctgctgtttaggtgtgagaggggtaccggggtctgctaccagtggaacagccactaaggtattctgc  agtgagagcagagggccagtaagtgtactctcccagagactgtctgactcacccccctccacttggacacagcagcctgtggttctgagcca  ggtacaatgactccttgglaagtcagtggaagctgtacactgcccaggaagcgtccgggagcagctagggggcagactcagatccagccagtg  acttagccccgtttgctcctccgataactgggtgacctgtgtaataatcaccagcagcctccccgttggccctctgagatccactgtaataatcagcag  ggacagggccctgctcctcagctcagccaccactgacctgggacagtgaaatagatcttgaactcaggggtgagctatggacctgatgtttc  ttcccccttttctatggttaagttcatgtcataggaaggggagaaacaggggtacacatattgacaaaatcagggtaattttgacatttfaaaaaat  gctttcttttfaataactttttgtttatcttatttcaatacttccctaactctttcttccaggcgaataatgatacaatgtatcatgctcttggaccattcaaa  aataacagtgalaattctgggttaagcaatagcaatattctgcatataaataattctgcatataaattglaactgatglaagggttcatattgclaatagcag  ctacaatccagctaccattctgttttatttctgtttgggataaggtggtgacttctgaagctgagcccttttctaattctgtcatacctcttattctctc  ccacagctcctggcaacctgctggtctctctgctgcccatacctttggcaagcactagtagggaccgcagctcagctacagcagatcagccacc  atggccttaggctgactctgctgactctgctgctgctgctgctgctggggacagggccagcttaacccaatgctacttctagctcctctcagaccctg  agagcctgcaggacaggggggagggcaaggtggccaccactgtatcttaagatgctgtttgtgagccatcctggaggtgagcagcctgcccacc  accaacagcaccaccaactctgccaactaagatcactgccaacaccactgatgagcccaccaaccagcccactactgagcccaccaaccagcctactatc  cagcccaccagcccactaccagctgcccactgacagccctaccagcccaccactggcagcttctgcccctgggctgtgacctgtgctctgacctgg  agagccattctactgagcgtgtctgggggatccccgtgtgacttctctgaagctgtaccatgcttctctccatgaagaaggtggagactaacatggc  tttagccccctcagcattgctgctgctgacctgctgctgctggggctgctgggggagaaactaagacaaacctggaatctatctgactacccaagg  acttcactgtgtcaccagggcctgaaggcttaccaccaaggggtgacctctgtgagccagatctccacagccctgacctgcccagggatact</p>	20 30 40

10

20

30

40

50



	<p>gagttcttctgactttctatgacctgaatctgtgtgacctgactgagatcctgatctgcagggtcttccatgagcaccagactgtctgagctgactgag  actgggggtggaggctgctgctctctgacctctctgtggccaggacctgctggtgttggagggtgagcagccctctgttctgctgtggaccagcag  cacaagtctctgtgttcatggtgaggggtatgaccocagagcctgacatctagagcttccctctcactctgctctcagagacctggctatgagccctcg  gggacaggatacaaaagttagtgaggctctatgcccagagaagctgagatatggcataataataggcatctaataatgcttaagagggtggaatctagagctgaa  ttctgacgccagggggatcagcctctactgtgcttctagtgtccagccatctgttggccctcccccttgccttcttgaccctggaaggtgccactccc  actgctccttccataaaaatgaggaatgcatcacattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggat  tgggaagacaatagcaggcatgctggggatgagtggtgctctatgcttctgaggcagaagaaccagctgggggtcagatccactagggccgcagg  aaccctagtgtgaggtggccactccctctctgcgcgctcgtcctcactgaggccgggcgaccaaaggctcccagcccgggcttggcccggg  cggcctcagtgagcagcgagcgcgcgag</p>	10
64	<p>cctgcaggcagctgcgcctcgtcgtcactgagcccccggcgaagcccggcgccctcagtgagcagcagcgcgcagagagggagtg  ccaactccatactaggggttctgctgccttagtactagctcagagggcacacaggagtcttctgggtcaccctgccccctccaacctcagttccatc  ctccagcagctgttgtgtgctgctctgaagtcacactgaaacaaatcagcctactcatgtcccaaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaa  acacacagcccctcctgctgaccttggagctggggcagaggtcagagacctctctggccatgcccactccaacatccactgaccccttggaaft  tcggteggagaggagcagaggttctctggcgtggttagttagtgtagagaggggtaccggggatcttctaccagtggaacagccactaagattctgc  agtgagagcagagggccagcclaagtggtacttccagagactgtctgactcacgccccctccacttggacacagggactgtgtgttctgagcca  ggtacaatgactccttcggttaagtgcagtggaagctgtacactgcccaggcaagcgtccggcagcgtagggggcagctcagatcccagcagtg  acttagccccctgttctctccgataactgggggtgaccttggtaataatcaccagcagcctccccctggccccctctggatccactgctaaatagcagca  ggacagggcccctgtctcctcagctcagcaccaccactgacctgggacagtgaaatagatctgagaactcaggggtgagctatgtagccctgatgttfc  ttcccccttcttctatggttaagttcatgtcataggaaggggagaagtaaacagggtacacatattgacaaatcagggtaatttgcatttgaatttataaaat  gcttctctttaaataacttttttttattcttatttctaactttccctaactcttcttctcagggcaataatgatacaatgatcatgctcttgcaccattctaaag  aataacagtgataattctgggttaagcaatagcaatattctgcataataatattctgcataataattgtaactgatgaagaggttctaatatgcaatagcag  ctacaatccagclaccattctgctttatttctggtgggalaaggctggtatttctgagctcaagctagggcccttggctaaatcttctacatctcttctc  ccacagctcctgggcaacctgctgctctctctgcccacacttggcgaagcactagtagggaccgagcctcagctacagcagatcagccacc  atggcctcagcgtgactctgctgactctgctctctgctgctgctgggacagggccagcttaaccccaatgctacttctgctcctctcagggacctg  agagcctgcaggacagggggggggcaaggtggccaccactgtgatcttaagatgctgtttgtggagcccactctggagggtgagcagcctgcccacc  accaacagcaccaccaactctgcccactaagatcactgccaacaccactgatgagccccaccagcccactactgagccccaccagccactactatc  cagcccaccagcccactaccagctcccactgacagccctaccagcccaccactggcagcttctgcccctgggctgtgacctgtgctctgacctgg  agagccattctactgagcgtgctggtgggatccctggtggacttctctgaagctgtaccatgcttctctccatgaagaaggtgagactaaatgagc  ttttagcccctcagcattgctagcctgctgacccaggtgctgctggtggggctgggggagaacactaagaccaacctggaaatctatcctgagctacccaagg  acttacctgtgtgaccagcccctgaagggtcaccaccaagggggtgacctctgtgagccagatctccacagcccctgacctggccatcaggggatact  ttgtgaaatccagcagaacctgtacttcttagccccagggtgctgagcaataatctgafgtaacctggagctgataaacctgggtgctaaagaata  ccaacaacaagattagcaggctgctgactctctgcttctgataaccaggctggtgctgctgaaatgcaatfaccctgctgccaagtggaaagaccactttga  ccctaagaagactagatggagccttccacttcaagaactctgcttaaggtgccatgatgaacagcaagaagtatcctgtggcccactttattgaccag  actctgaagccaaggtggccagctgagctgagccataacctgagcctggtgacctgtgcccagaacctgaagcataggtgagggacatgga  gcaggctctgagcccctgtgttcaaggctattatggagaagctggagatgagcaagttccagcccactctgctgacctgcccagaatcaagggtgacca  cctctcaggacatgctgagcatcatggaaaagctggagtctttgactttctatgacctgaaatctgtgtgctgactgaggtatctgactgtcaggtgtctg  ccatgacgaccagactgtgctgagctgactgagactggggtggaggctgctgctgcttctccatctctgtgcccaggacctgctgtgttggagggtg  cagcagccccttctgttgtgctgtggaccagcagcacaagtctcctgtgttcatgggaggggtgtatgaccccagagcctgacatctagagcttctcttc  actctgctctcagagacctggctatgagccctcggggcagggatacaaaagttagtgaggctctatgcccagagaagctgagatatggcataataataggca</p>	20 30 40

10

20

30

40

50

	<p>tctaataaafgcttaagagggtggaatctagagctgaattcctgcagccaggggafccctctactgtgccttctagtccagccatctgttttggccctc  ccccttgccttcttgaccctggaaggtgccactcccactgtccttcttaataaaatgaggaaattgcatcacattgtctgagtaggtgtcattctattctgggg  ggtgggggtgggacagacagcaagggggaggtgggaaagacaatagcagggatgctgggatgcatgggtctatggcttctgagcagaaaga  accagctgggctgagatccactagggccgaggaacccctagtgatggagttggccactccctctctcgcgctcgtcactgagccggggcg  accaaaaggtcggccgacgcccgggctttcccgggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgag</p>
65	<p>cctgcaggcagctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgcccgggcaaagcccggcgccctcagtgagcagcagcgcgagagaggagtg  ccaactccatcactaggggttctgcccctagtactagcctcagaggcacacagaggtttctgggctcaccctgccccctccaacccctcagttccatc  ctccagcagctgtttgtgctgctccttgaagtcacactgaacaaactcagcctactatgtccctaaaatgggcaaacttgcaagcagcaaacagcaa  acacacagccctccctgctgctgacttggagctggggcagaggtcagagacctctctggccatgccactccaacatccactgacccttgaatt  tcggtggagaggagcagaggttctctgctggtttaggtagtgtagaggggaccggggtatctgtaccagtgaacagccactaagattctgc  agtgagagcagagggccagctaagtgtactctccagagactgtctgactcaccccccctccacttgacacagagcgtgtgtttctgagcca  ggtacaatgactccttctgtaagtgagtggaagctgtacactgccaggcaaagcgtccgggagcgtagggcgagcactcagatccagccagtg  acttagcccctgtttgctctccgataactggggtgactgtgtaataatcaccagcagcctccccgftgcccctctgacactgcttaaataggacga  ggacagggccctgtctcctcagctcagccaccactgacctgggacagtgatgatcttgggacgtcccagctgggctcctttaaagcacca  cactctcattctcccaaggtgggctccagactaggtggggcagcagaaggtccccctctacattgtccttggctcaggagccaacttagaaaagc  atttccaaatgctgaagccagcggagcagagattttctgtgctgagaataatcagacatccagaggggtggaaggagcctccagggcacacatgaga  tgtggcaggggtaggctgtccgtttaaagctaaagctttagacatgaactcacagggatttcagtcagggtcatctgccatgtggcccagcagggccat  cctgaggaatgaccggtatagcagagctggtgtaagagctgcccactccacacctccagcagcccaggtgccatcacggggtcccactg  gcatctctgcagctgacttcccccaatgctgagggagcagagctgatctagaccctgtccattgccaaggcacagcaaacctctctgttccataggttac  acaactgggataaagaccgggatgaagaaaccaccggcatccaggaactgtcttagaccagttttaggggaaatgacctgcagggacttcccag  ggaccacatccagcttttctccctcccaagagaccagcaaggtctgagaacttcaggtgagctctatgggacctgatgttttcttccctctttctatg  gftaagttcatgcatagaaggggagaagtaacagggtaacataatgaccaatcagggtaattttgatttgaatttaaaaaatgtttctctttaata  ctttttttatcttatttaactttccctaactcttcttctcagggcaataatgatacaatgtatcatgcctcttgcaccattctaaagaataacagtataat  ctgggttaaggcaatagcaatatttctcatataaatttctcatataaattgtaactgatgtaagaggttccatattgctaataagcagctacaatccagctacc  attctgtttatttctggttgggataaggtgatttctgagtcacaagctagccctttgctaacttcttatacctcttattcttcccagcctctgggc  aacctgctgtctctctgctgcccactcatttggcaagcactagtgagggaccgagctcagctacacagatcagccaccatggcctctaggctg  actctgctgactgctgctcctgctgctgctgggacagggccagctcaaccccaatgctacttctagctcctcagaccctgagagcctgagcagc  aggggggagggcaaggtggccaccactgtgatcttaagatgctgttttggagccatcctggaggtgagcagcctgcccaccaccaacagcaccac  caactctgccaactaagatcactgccaacaccactgatgagcccaccaccagcccactactgagcccaccaccagcctactaccagcccaccagcc  cactaccagctgcccactgacagccctaccagcccaccactggcagcttctccctggcctgtgacctgtctgacctggagagccattctactg  aggctgtctggtgggatccctggtgacttctctgaagctgtaccatgcttctctgcaatgaaaggtggagactaacatggcttttagcccctttag  cattgtagcctgctgaccaggtgctgctggggctggggagaactaagaccaactggaatctatcctgagctacccaaggacttcaactgtgtgc  accagggcctgaaaggttaccaccaaggggtgacctgtgagccagatctccacagccctgacctggccatcagggatacttttgaatgccag  cagaaccctgactctctagcccaggtgctgagcaataatctgatgtaacctgagctgatcaatacctgggtgtaagaataccaacaagaat  agcaggtgctgactctcctctgataaccagctggtgctgctgaatccattacctgtctgccaagtgaagaccacttttagccctaaagacta  ggatggagcctttcacttcaagaactctgtcatgaaggtcccatgatgaacagcaagaagtatcctgtggcccacttttagaccagactctgaaggccaa  ggtgggcccagctgagctgagccataacctgagcctgtgatcctgtgctcccagaacctgaagcagctggagacatggagcaggtctgagcc  cctctgttcaaggctattatggagaagctggagatgagcaagttccagcccactctgctgacctgcccagaatcaaggtgaccacctctcagacatg  ctgagcatcaggaagctggaggttcttactttctatgacctgaatctgtgtggcctgactgaggatcctgactcaggtctgctgcatcagcacca</p>

10

20

30

40

	<p>gactgtgclggagctgactgagactgggggtggaggctgctgctctctccatctctgfgccaggaccctgctgggtfagggtgagcagccctctct  gtttgtctgctgggaccagcagcacaagttcctgtgttcctgtggcagggtgtatgacccagagcctgacatctagagctgaattcctgagccaggggg  atcacctctactgtccctctagttgcccagccatctgtttgcccctccccctfgecttctctgacccctggaaggctccactctctcttcaataaa  atgaggaaattgcatcacattgctgagtaggtgtcattctatctggggggtggggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcag  gcatgtctgggatgagtggtctctatggctctgaggcagaaagaaccagctggggctcagatccactagggccgaggaaccctagtgtggagt  tggccactccccctctgctgctgctgctcactgagccgggacaaaagctgcccgcacccgggctttgcccgggctgagcagcag  cgagcgcgcag</p>	
66	<p>cctgcaggcagctgctgctgctgctcactgagccggcccgggcaaagcccggcggcctcagtgagcagcgagcgcagagagggagtgg  ccaactccactactagggttctgctgcttagctgcaaaagtcaacacaagcctcaccctgtgtccatgttatgtgtatgctgtgccccgcat  gccactggagcaggactcagctacctcctctcacaaagcctctgctgtttgggaagattggcatgacatcagccaagctctggcctgtctctttt  ccctgcaaaagcaacacaagcctcaccctgtgtccatgttatgtgtatgctgtgccccgcatgccactggagcagggactccagtgacct  tctgtcacaagcctctgctgtttgggaaagattggcatgacatcagccaagcctgctgtctcttttccctagtagtaggctcagagcacaagagt  ttctgggtcaccctgccccctcaacccctcagttccactccagcagctgtttgtgtgctgctctgaagtcacactgaacaaactcagcctactcat  giccclaaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacacagcaaacacagccctcctgctgaccltggagctggggcagaggctcagagacctct  ggggccatgccactccaacatccactgacccctggaattcgtgtgagaggagcagagggtgctgctgtgtttaggtgtagtgagaggggtacc  cgggactctgtaccagtgaaacagccaactaagattctgactgagagcagagggccagtaagtgtacttcccagagactgtctgactcacgcca  ccccctccactgtgacacagcagctgtgtgtctgagccaggtacaatgactccttctgaagtgcaagctgtacactgccagcacaagcgt  ccgggcagcgtagcggggcactgacatccagccagtggaactgccccctgttctcctccgataactggggtgaccltggtaataaccaggcagc  ctccccctggccccctggatccactgctaaatcagcagggagccctgtctcctcagctcagccaccactgacctggagcagtgaaatag  atcttgagaactcaggggtgagctatggaccctgtatgtttcttccctcttctatgttgaagttcatgctataggaaggagaaagtaacagggtaca  cataatgaccaaatcagggtattttgcattgtaatttaaaaaatgcttcttcttataatactttttgttatcttatttcaataacttccctaatcttcttctcagg  gcaataatgafacaatgtatcatgctcttggaccattctaaagaataacagtgataaattctgggttaaggcaatagcaatattctgcatataaataatctgca  tataaattgtaactgatgtaaggtttcataatagcagctacaatccagctaccattctctttatttctggttgggataaggctggaattattctgagtc  caagctaggccctttgctaactgttcafaactctattctccccacagctcctgggcaacctgctgctctgctggtgccatcatttggcaaaact  agtgccacctggcctctaggctgactctgctgactctgctgctctgctgctggggacagggccagcttaacccaatgctactctgactcctctc  aggacctgagagcctgagcagagggggggagggcaaggtgcccactctgactcctaagatctgtttgtgagcccactctgagtgagcagc  ctgcccaccaccaagcaccaccaactctgccactaagatcactgccaacactctgatgagcccaccaccagcccactactgagcccaccaccag  cctactatccagcccccagccactaccagctgccactgacagccctaccagcccaccactgagccttctgccccctggcctgtgacctgtgct  ctgacctggagagcacttactgagcgtgtgctggggatccctgtggaactctctgaagctgtaccatgcttctctgcatgaagaaggtggaga  ctaacatgcttttagccctttagcattgctagcctgctgaccaggtgctgctggggctgaggagaacactaagacaaactggaatctatctgagct  accacaaggactcactgtgtgaccagccctgaagggtcaccaccaagggggtgacctctgtgagccagatctccacagcccctgacctgccat  cagggatactttgtgaatccagcagaaccctgtactctctagcccagggctgctgagcaataattctgatgctaactggagctgatcaataactgggtg  gctaagaatacaacaagaagattagcagctgctgactctctctctgataccagctgtgctgctgtaagcattactctgccaagtgggaaga  ccactttgacctaaagaactaggtgagcctttccactcaagaactctgctattaggtcccactgatgaacagaagaaglatcctgtggcccacttt  attgaccagactctgaaggccaaggtggggccagctgagctgagccataactgagcctgtgtgctgctgtcccagaacctgaagcatagctggag  gacatgagcagcctctgagccccctgtgtfcaaggctattatggagaagctgagatgagcaagttccagcccactctgctgacctgtcccagaatcaa  gggtgaccactctcaggacatgtgagcatcatgaaagctggagttcttacttttctatgacctgaatctgtgtgcccactgagggatcctgatctca  ggtgtctgcatgagcaccagactgtgtggagctgactgagactgggggtgagggctgctgctctctgcccactctgtggccagacctgtgtgtt  tgagggtcagcagcccctctgtttgtgctgtgggaccagcagcacaagttcctgtgtcatggtggcagggtgtatgacccagagcctgacatctagagct</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>

	<p>gaatfcctgcagccaggggatcagcctctactgtgcttctagtgtccagccatctgttfttgcctcccccttgccttcttgaccctggaaggtgccact  cccactgtccttcttaataaaatgaggaaattgcatcacattgtctgtagtggtgcatcttcttctgggggggtgggggtggggcaggacagcaagggggag  gattgggagaacaatagcaggcatctgggatgctgctgctctatggcttctgaggcagaagaaccagctggggctcagatccactagggccgc  aggaaccctagtgtgaggtggccactccctctctgctgctgctgctcactgaggccggcgaccaaaaggtcggcgacccgggctttgcc  ggcgccctcagtgcagcagcgagcgcgag</p>
67	<p>cctgcagcagctgcgctgctgctcactgaggccgcccgggcaaaagcccggggcgccctcagtgcgagcgcagcgcagagagggagtgg  ccaactccactaggggtcctgctggcctagtactaggtcagagcacacaggagtttctgggtcaccttccccctccaaccctcagttccatc  ctccagcagctgttctgtgctgctctgaagtcacactgaacaaactcagcctactcatgtccctaaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaa  acacacagccctccctgctgctgacttggagctggggcagaggtcagagacctctctggcccatgccactccaactccactgacccttggaaft  tcgggtgagagcagaggtgtctctggctgtgtagtgtagaggggtaccggggatcttctaccagtggaaacgccaactaaggttctgc  agtgcagcagagggccagtaagtgtactctccagagactgtctgactcacgcccccctccacttggacacaggagcgtgtgttctgagcca  ggtacaatgactccttctgtaagtgcagtggaagctgtacactgcccaggcaaacggtccggcgagcgtaggcggcgactcagatcccagccagtgg  actlagccccgttctctccgataactgggggtgaccttggtaataatcaccagcagcctcccccttgcctctggalccactgcttaatacggacga  ggacagggccctgtctccagctcaggcaccaccactgacctgggacagtgaatagatcttgagaactcagggtagtctatgggaccttcatgtttc  ttccccctttctatgttaagttcatgtcataggaaggggagaagtaacagggtacacatatgacaaaatcagggtaatttgcatttgaatttaaaaaat  gctttcttcttaataatactttttgtttatcttcttaataacttcccaatcttcttccagggcaataatgafacaatgatcatgctcttggcaccattctaaag  aataacagtataattctgggttaagcaataatattctgcataaaatattctgcataaaattgtaactgatgtaagaggttcatattgtaatagcag  ctacaatccagctaccattctgttttatttctgttgggataaggctggattatctgagtcaggctagggccttttctaatcttggatcaccttctctc  ccacagctcctgggcaacctgctgctctctgctggcccactcttggcaaacactagtgccaccatggcctctaggtgactctgctgactctgctgct  cctgctgctgctgggacagggccagctctaacccccatgactctgactcctctcaggaccctgagagcctgcaggacagggggagggcaaggt  ggccaccactgtgatcttaagatgctgttgggagccatcctggaggtgagcagcctgcccaccaccaacagcaccaccaactctgccaactaagatca  ctgccaacaccactgatgagccaccaccagcccactactgagccaccaccagcctactatccagcccaccagcccactaccagctgcccactg  acagccctaccagcccaccactggcagcttctgcccctggcctgtgacctgtgctctgacctggagagccattctactgaggctgctgggggatgcc  ctggtggactctctctgaagctgtaccatcttctctgcatgaagaaggtggagactaacatggcttttagcccctcagcattgctagcctgctgacca  ggtgctgctggggctgggagaacactaagaccaacctggaatctatctgagctacccaaggacttcacctgtgctcaccaggccctgaaggcttc  accaccaaggggtgacctctgtgagccagatctccacagcctgacctggccatcagggatacttttgaatgcccagcagaacctgtactctctagc  cccagggtgctgagcaataattctgatgtaacctggagctgatcaatctgggtgtaagaataccaacaagaatagcaggctgctgactctctg  cctctgataccagcctgtgctgctgaatgacattacctgctgccaagtgaagaccactttgacctagaagaagactaggtggagccttccactcaa  gaactctgtaataaggtcccctgatgaaacagcaagaagtaacctgtggcccactttatgaccagactctgaagccaaggtgggacagctgagctga  gccataacctgagcctgtgatcctgtgccccagaacctgaagcagcctgaggacatggagcagcctctgagcccctctgttcaaggctattatg  gagaagctggagatgagcaagttccagcccactctgctgacctgcccagaatcaaggtgaccacctcagacatgctgagcatcatgaaaagctg  gagttcttgactttcttatgacctgaatctgtgacctgactgagatctgctgaggtgtctgcatgcagcaccagactgtctgagctgactgag  actgggggtgagggctgctgctcttctgcaactctgctggccaggacctgctggtgttggaggtgagcagccctctglttggctgtgggaccagcag  cacaagttcctgtgtcatggcaggggtgatgacctcagagcctgacatctagagcactctgagcaggtctagaattcctgagcccaggggatcag  cctctactgtgcttctagtgtccagccatctgtgttggcccctcccccttgccttcttgcacctggaaggtgcccactcccactgtccttcttaataaaatgag  gaaattgcatcacattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcagggcatg  ctggggatgcagtgggctctatggcttctgagcagaaaagaaccagctggggctcgagatccactagggccgaggaaaccctagtgtgaggtggcc</p>

10

20

30

40

	actccctctctfctcgcctcctcgtcactgagccggcgaccaaaggctgcccagcccggtcttgcggggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgagaggagtg	
68	<p>cctgcaggcagctgctcgtcctcgtcactgagccggcgcaaagccggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgagaggagtg</p> <p>ccaactccatcactagggttctcggcctagtactaggctcagagggcacacagaggttctgggctcacctgccccctccaacccctcagttccatc</p> <p>ctccagcagctgtttgtgtgctcctctgaagtccacactgaacaaactcagcctactcatgtccctaaaatggcacaacattgcaagcagcaaacagcaa</p> <p>acacacagccctccctcctgctgaccttggagctggggcagaggtcagagacctctctggccatgcccactccaacatccactcagcccttggaaft</p> <p>tcggtgagagaggagcagaggttctcctgctggttttaggtgtagtgtagaggggacccggggtacttctaccagtggaaacagccctaaggatctgc</p> <p>agtgagagcagaggccagctaagtgttactctcccagagactgctgactcacgccccccctccacttggacacagacgctgtggttctgagcca</p> <p>ggtacaatgactcttctgtaagtgcagtggaagctgtacactgcccaggcaaagcgtccgggagcgtagggggcagactcagatccagccagtg</p> <p>acttagcccctgttctcctccgataactgggtgaccttggtaattaccagcagcctccccgttgcctctggatccactgttaatacggacga</p> <p>ggacagggccctgtcctcagcctcagccaccactgacctgggacagtgaaatagatctgagaactcagggtgagctatgggacctgtatgtttc</p> <p>ttccccttttctatgtaagtcatgcataggaaggggagaagtaacaggggtacacataatgacaaatcagggttaatttgcatttgaatttaaaaaat</p> <p>gcttctcttfaataacttttgtttatctatfttfaatacttccctaatcttcttcttcagggcaataatgatacaatgtatcatgectcttgcaccattfaaag</p> <p>aatacagtgataatttctgggtaaggcaatattctgcatataaatttctgcatataaattgtaactgatgaagggttctatattgtaataagcag</p> <p>ctacaatccagctaccattctgttttcttctggtgggataagctggtattctgagtgcaagctaggccctttgtaactgttctacactcttattctc</p> <p>ccacagctcctgggcaacctgctgtctctctgctggccatcttggcaaaagcactagtgccaccatggcctctaggctgactctgctgct</p> <p>cctgctgctggctgggacagggccagcttaacccaatgctacttctagctcctctcaggacctgagagcctgacaggggggagggcaaggt</p> <p>ggccaccactgctatctaaagctgttggggagccatctcggagtgagcagcctgcccaccaccaacagcaccaccaactctgccactaagatca</p> <p>ctgccaacaccactgatgagcccaccaccagcccactactgagcccaccaccagcctactatccagcccaccagcccactaccagctgccactg</p> <p>acagccctaccagcccaccactggcagcttctccctggcctgtgacctgtgctgacctggagagccattctactgagcgtgtgctggggatgcc</p> <p>ctggtgacttctctgaagctgtaccatcttctgccaatgaagaagtgagactaaatgctttagcccctcagattgctagcctgctgacca</p> <p>gggtgctgctggggctggggagaaactaaagcaacctggaatctctgagctacccaaggactcacctgtgtgaccagggcctgaaggcttc</p> <p>accaccaagggggtgacctctgtgagccaacttccacagccctgacctggccatcagggatacttctggaatgccaagcaaacctgactctctagc</p> <p>cccagggctgctgagcaataatctgatctaacctggagctgatcaatctgggtgctaagaataccaacaagaattagcaggtgctgactctctg</p> <p>cttctgataccaggctgtgtctgtaatgcatltaacctgtcgaagtggaagaccactlltagccctaagaagactaggatggagccttccactlcaa</p> <p>gaactctgcatagggctcccctgatgaacgcaagaagtatcctgtggcccactttatgaccagactctgaaggccaaggtgggcccagctgagctga</p> <p>gccataacctgagcctgtgatcctggtgccccagaaacctgaagcalagcgtggagacalggagcagctctgagccctctgttcaaggctattatg</p> <p>gagaagctggagatgagcaagttccagcccactctgctgacctggccagaatcaaggtgaccacctctcaggacatgctgagcatcatgaaaaagctg</p> <p>gagttctttgactttctatgacctgaatctgtgtggcctgactgagatcctgactcaggtgtctgccaatgagcaccagactgtgctggagctgactgag</p> <p>actgggtggaggctgctgcttctgacctctgtgcccaggacctgctggttggaggtgagcagcccttctgttctgtgtggaccagcag</p> <p>cacaagttcctgtgtlcatgggaggggtgtatgaccccagagcctgacatctagagcacctctgagcaggaagtctctgagaagataaacctgcaga</p> <p>gtggtctagaattctgagccaggggatcagcctctactgtgcttctagttgcccagcactctgttggcccctcccccttgccttctgacctggaag</p> <p>gtccactcccactgtccttcttaaaaaatgaggaaatgcatcacatgtctgagtaggtgtcattctatctgggggtggggtggggcaggacagcaa</p> <p>gggggaggttgggaagacaatagcagcagctgctgggatgagtggtctctatggcttctgagcagaaagaaccagctgggctcagatccacta</p> <p>gggccgaggaacccctagtatgaggtggccactccctctctgctgctcctcctcactgagccggcgaccaaaggctgcccagcccgg</p> <p>gctttgcccggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgag</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
69	<p>cctgcaggcagctgctcgtcctcgtcactgagccggcgcaaagccggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgagaggagtg</p> <p>ccaactccatcactagggttctcggcctagtactaggctcagagggcacacagaggttctgggctcacctgccccctccaacccctcagttccatc</p>	40

10

20

30

40

	<p>ctccagcagctgtttgtgtgctgcctctgaagtcacactgaacaaactcagcctactcatgtccfataaatgggcaaacatgcaagcagcaaacagcaa  acacacagccctccctgctgctgacctggagctggggcagaggtcagagacctctctggccatgccactccaacatccactcgacccctggaaft  tcggggagagagcagaggtgctgctgctggttttaggtgtgagaggggaccgggatctgctaccagtgaacagccactaagattctgc  agtgagagcagaggccagctaagtgtactctcccagagactgtctgactcacgcccccctccacttgacacagggacgtgtgtttctgagcca  ggtacaatgactccttcggtaagtgcagtggaagctgtacctgccaggcaaacgctccgggagcgtagcggcgactcagatcccagccagtg  actlagccctgtttgctctccgataactggggtgacctgtgtaataatccaccagcagcctccccgttgcctctgctaccactgttaataacggacga  ggacagggccctgtctcctcagctcagccaccactgacctgggacagtgaatagatcttgagaactcaggggtgactatfaggccctgtatgtttc  ttccctctttctatggttaagttcatgcataggaaggggagaagtaacaggggtacacataatgaccaaatcagggttaatttgcatttgaatttataaaat  gctttcttttaataactttttgtttatcttatttctaatacttccctaatacttcttcttcaggccaataatgataaatgtatcatgctctttgaccacttctaaag  aataacagtataattctgggtaagcaataatfctgcataataatfctgcataataatgtaactgtatgaagggttctatfctgaatagcag  ctacaatccagctaccattctgttttatttctggttggataaggctggtatttctgagccaagctaggccctttgtaacttctgtcataccttattctctc  ccacagctcctgggcaacctgctgctctctgctggccatcactttggaaaagcactagtccaccatggcctctaggctgactctgctgactctgctgct  cctgctgctggcgggacagggccagctctaaccccaatgctacttctagctcctctcagaccctgagagcctgagacaggggggaggccaaggt  ggccaccactgtatcttaagatgctgtttgtggagccatcctggaggtgagcagcctgccaccaccaacagcaccaccaactctgcccactaagatca  ctgcaaacaccactgatgagccaccaccagcccactactgagcccaccaccagcctactatccagcccaccagcccactaccagctgcccactg  acagccctaccagcccaccactggcagctctgcccctggcctgtgacctgtctgacctggagagccatttactagggctgtctgggggatgccc  ctggtgacttctctgaagctgtaccatcttctctgcatgaagaaggtggagactaacatggcttttagcccctcagcattgctagcctgctgacctg  ggtgctgctggggctgggggagaacactaagcaaacctggaatctatctgagctaccccaaggactcacctgtgtgaccagggccctgaagggtctc  accaccaagggggtgacctgtgagccagatctccacagccctgacctggccatcagggatactttgtgaatgcccagcagaacctgtactctctagc  cccagggctgagcaataatctgatgtaacctggagctgatcaactctgggtgctaaagaatacaacaagaattagcaggtctgctgactctctg  cctctgataccaggtgctgctgctgctgaatgccattctgctgccaagtgaagaccactttgacctaaagaagactagatgagccttccactca  gaactctgcattaaaggtcccatgatgaacagcaagaagtatcctgtggccactttattgaccagctgaagccaaggtggccagctgagctga  gccalaacctgagcctggtgatcctggtgccccagaacctgaagcataggtggaggacatggagcaggtctgagcccctctgtgtcaaggctaltatg  gagaagctggagatgcaagttccagcccactctgctgacctgccagaatcaaggtgaccacctctcaggacatgctgagcatatgaaaaagctg  gagttcttactttctatgacctgaatctgtgtgcccactgagggatcctgactgaggtgctgcccagcagcaccagactgtgctgagctgactgag  actggggtggaggtgctgctgcttctgcatctctgtggccagacctgctggtgtttgaggtgagcagccctctctgtttgtgctgtggaccagcag  cacaagttctgtttatgagggcaggtgtatgaccccagacctgacatctagagcactctgagcaggtctagaattcctgagccaggggatcag  cctctactgtccttctagtggccatctgtgtttgccccctcccccttgcctcctgacctggaaggtgccactcccactgtccttctaataaaatgag  gaaattgcatcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggtggggggggcagcagcaagggggaggttgggaagacaatagcaggcatg  ctggggatgagctgctctatgcttctgagcagaaagaaccagctgggctcagatccactagggccaggaacccctagtgatgagttggcc  actccctctgctgctgctgctgctcactgagccggcgaccaaaaggtgcccagcgggctttgcccggcgccctcagtgagcagcagcag  cgccag</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p>
110	<p>atggctagcagactgactctgctgacctgctgctgctgctgctgctggggacagggccagcagcaaccctaatgctaccttagctctagccaggacc  ctgagagcctgagcagataggggggagggcaaggtggccaccactgtgatcagcaagatgctgtttgtgagcctactctggaggtgagcagcctgcc  accaccaactctactaccaactctgctaccaagatcactgccaataccactgatgaaccaccactcagcccactactgagcccaccaccagcccacat  tcagcccactcagcccactaccagctgctactgacttcccaccagcccaccactggcagcttctccctggcctgtgacctgtgctctgacctg  agagccattctactgaggtgctgctggggatcccctggtgattcagcctgaagctgtaccatgcttctgcccataagaaggtggagaccaatg  gcttctctccctcagcattgcccagcctgctgacctgggtgctgctgggggaggggagaacccaagaccaacctggagagcatcctgtcttaccceaa  ggacttacctgtgtgatcagccctgaagggcttactactaaggggtgacctgtgtctcagatfctccacagccctgacctggctattaggacact</p>	<p>40</p>

10

20

30

40

	<p>tttgtaatgcttctagaccctgtacagcagctctcccagggctgctgagcaacaactctgatgccaacctggagctgattaacacttgggtggccaagaac  actaacaataagatcagcaggctgctggacagcctgcccctctgacaccaggctggtgctgctgaatgccatctacctgtctgccaagtggagactactttf  gatcctaagaagaccaggatggagcccttccacttcaagaactctgfatcaaggtgccatgatgaattctaagaagtaccctgtgctcacttcattgacc  agaccctgaaggccaaggtggccagctgcagctgagccacaacctgagcctggtgattctggtgccccagaacctgaagcacaggctggagacatg  gagcaggccctgagcccctctgtgttcaaggccatcatggagaagctggagatgagcaagttccagcctactctgctgactctgccagatcaaggtga  ccactagccaggacatgctgagcattatggagaagctggagttcttactttctatgatctgaacctgtgtggcctgactgaggaccctgacctgcagggtg  tctgcatgagcaccagactgtgctggagctgactgagactgggggtggaggctgctgctgctcctctgcatctctgtggctaggaccctgctggtgttggag  gtgcagcagccctctctgttctgctgtgaggaccagcagcaagaagttcctgttctatggcagggtgtatgafcccagggttga</p>	10
119	<p>atggcctctaggctgactctgctgactctgctgctgctgctgctgggacagggccagctctaacceaatgctacttctagctcctctcaggaccctg  agagcctgacagcaggggggagggcaaggtggccaccactgtgatcttaagatgctgtttgtggagccatctggaggtgagcagcctgccacc  accaacagcaccaccaactctgccactaagatcactccaacaccactgatgagccaccaccagcccactactgagccaccaccagcctactatc  cagcccaccagcccactaccagctgccactgacagccctaccagcccaccactggcagcttctgcccctggcctgtgacctgtgctctgacctgg  agagccattctactgagctgtgctggggatgcccctggtgacttctctgaagctgtaccatgcttctctgcatgaagaaggtggagactaacatggc  tttagcccctcagcattgctgacctgctgaccaggtgctgctggggctggggagaactaagaccaacctggaatctatctgagctacccaagg  acttcacctgtgtgaccagggccctgaagggcttaccaccaagggggctgacctctgtgagccagatctccacagccctgacctggccatcaggatact  tttgaatgccagcagaacctgtacttctagccccagggctgctgagcaataaltctgatgtaacctggagctgcatcaaacctgggtggctaaaga  ccaacaacaagatgacagcctgctgactctgctcctctgataccagcctggtgctgctgctgaatgceattacctgtctgccaagtggagaccactttga  ccctaagaagactaggtggagccttccacttcaagaactctgcttaaggtgccatgatgaacagcaagaagtatcctgtggcccacttattgaccag  actctgaaggccaaggtggccagctgcagctgagccataacctgagcctggtgatcctggtgccccagaacctgaagcatagctggaggacatgga  gcagcctctgagcccctctgttcaaggctattatggagaagctggagatgagcaagttccagcccactctgctgacctgcccagaatcaagggtgacca  cctctcaggacatgctgagcatatggaaggtggagttcttactttctatgacctgaatctgtgtgcccctgactgaggatcctgatctcaggtgtctg  ccatgagcaccagactgtgctggagctgactgagactgggggtggaggctgctgctgcttctgcatctctgtggcaggaccctgctggttggaggtg  cagcagccctctctgttctgctgtggaccagcagcaagaagttcctgttctatggcagggtgtatgafcccagggttga</p>	20
142	<p>atggctagcagactgactctgctgacctgctgctgctgctgctgggacagggccagcagcaaccctaagtctaccttagctctagccaggacc  ctgagagcctgacagatagggggagggcaaggtggccaccactgtgafcagcaagatgctgtttgtggagcctatctggagggtgagcagcctgcc  accaccaactctactaccaactctgctaccaagatcactccaataaccactgatgaaccaccactagcccactactgagcccaccaccagcccacat  tcagcccactcagcccactaccagctgctactgactctcccaccagcccaccactggcagcttctgcccctggcctgtgacctgtgctctgacctgg  agagccattctactgaggctgtgctggggatgcccctggtgattcagcctgaagctgtaccatgcttctgccaatgaagaaggtggagaccaatg  gccttctctccctcagcattgcccagcctgctgacctgggtgctgctggggctggggagaacaccaagaccaacctggagagcctctgtcttaccocaa  ggacttcacctgtgtgcatcagccctgaaggcttactactaaggggtgacctctgtgtctcagatttccacagccctgacctgctattaggacact  tttgaatgcttctagaccctgtacagcagctctcccagggctgctgagcaacaactctgatgccaacctggagctgattaacacttgggtggccaagaac  actaacaataagatcagcaggctgctggacagcctgcccctctgacaccaggctggtgctgctgaatgccatctacctgtctccaagtggagactactttf  gatcctaagaagaccaggatgagcccttccacttcaagaactctgfatcaaggtgccatgatgaattctaagaagtaccctgtgctcacttcattgacc  agaccctgaaggccaaggtggccagctgcagctgagccacaacctgagcctggtgattctggtgccccagaacctgaagcacaggctggagacatg  gagcaggccctgagcccctctgttcaaggccatcatggagaagctggagatgagcaagttccagcctactctgctgactctgccagatcaaggtga  ccactagccaggacatgctgagcattatggagaagctggagttcttactttctatgatctgaacctgtgtggcctgactgaggaccctgacctgcagggtg</p>	30

	tctgccatgcagcaccagactfgctggagctgactgagactgggtggaggctgctgctgcctctgccatctctgctggctaggacctgctggtgttgag gtagcagacccttctgtgtgctggtggaccagcagcacaagttccctgtctcatgggaggggtatgatcccagggtga	
181	NPNATSSSSQDPESLQDRGEGKVATTVISKMLFVEPILEVSSLPTTNSATKITANTTDEPTQP TTEPTTQPTIQPTQPTTQLPTDSPTQPTTGSFCPGPVTLCSDLESHSTEAVLGDALVDFSLKLYHAFS AMKKVETNMAFSPFSIASLLTQVLLGAGENTKTNLESILSYPKDFTCVHQALKGFTTKGVTSVSQI FHSPDLAIRDTFVNASRTLYSSSPRVLSNNSDANLELINTWVAKNTNNKISRLLDPSDTRLVLLN AIYLSAKWKTTFDPKKTRMEPFHFKNSVIKVPMMNSKKYPVAHFIDQTLKAKVGGQLQLSHNLSL VILVPQNLKHRLEDMEQALSPSVFKAIMEKLEMSKFQPTLLTLPRIKVTTSQDMLSIMEKLEFFDFS YDLNLCGLTEDPDLQVSAMQHQTIVLELTETGVEAAAASAVISVARTLLVFEVQQPFLFVLWDQQH KFPVFMGRVYDPRA	10
192	MASRLTLLTLLLLLAGDRASSNPATSSSSQDPESLQDRGEGKVATTVISKMLFVEPILEVSSLPT TNSATKITANTTDEPTTQPTTEPTTQPTIQPTQPTTQLPTDSPTQPTTGSFCPGPVTLCSDLESH STEAVLGDALVDFSLKLYHAFSAMKKVETNMAFSPFSIASLLTQVLLGAGENTKTNLESILSYPKD FTCVHQALKGFTTKGVTSVSQIFHSPDLAIRDTFVNASRTLYSSSPRVLSNNSDANLELINTWVAK NTNNKISRLLDPSDTRLVLLNAIYLSAKWKTTFDPKKTRMEPFHFKNSVIKVPMMNSKKYPVA HFIDQTLKAKVGGQLQLSHNLSL VILVPQNLKHRLEDMEQALSPSVFKAIMEKLEMSKFQPTLLTLP RIKVTTSQDMLSIMEKLEFFDFS YDLNLCGLTEDPDLQVSAMQHQTIVLELTETGVEAAAASAVISV ARTLLVFEVQQPFLFVLWDQQHKFPVFMGRVYDPRA	20
226	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDNDRGLVLPGYKYLGPFNGLDKG EPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADA EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKR VLEPLGLVESPVKTAPGKKRPVEPSPQRSPTSSTGIGKKGQPAKKRLNFGQTGDSSEVPDPPIGE PPAAPSGVGPNTMAAGGGAPMADNNEGADGVSSSGNWHCDSTWLGDRVITSTRTWALPTYN NHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYDFDNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGRPKRLNFKLF NIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNN GSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYNFEDVPFHSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRT QSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLN GRDSL VNPGVAMATHKDDEERFFPSSGVL MFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQ YGVVADNLQQQNAAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPMLGGFG LKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNY KSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL	30
229	cctcaggcagctgcgcctgctgctcactgaggccgcccgggcaaagccggggcctcagtgagcagcagcgcgcagagaggagtg ccaactccatcactagggttctgctgagcctagtaggctcagaggcacacaggagttctgggctcaccctgccccctccaacccctcagtcctc ctccagcagctgttctgctgctcctctgaagtcacactgaacaaactcagcctactcatgtccctaaaatgggcaaactgcaagcagcaaacagcaa acacacagccctccctgctgctgacctggagctggggcagaggtcagagacctctctggcccatgccacctccaactcagacccttgggaatt tcggfagagaggagcagaggtgtcctgctgctggttaggtagtgtagaggggtaccgggatctgctaccagtggaacagccactaaggattctgc agttagagcagagggccagctaagtgtagtctccagagactgtctgactcacgccaccctccacctggacacagcagcctgtgttctgagcca	40

ggtacaatgactctttcggtaagtgcagtggaagctgtacactgccaggcaaaagcgtccggcagcgtagcggggcactcagatcccagccagtgg  
 acttagccccgtttgctcctccgataactgggggaccttgtaataatcaccagcagcctccccgtgccctctggatccactgcttaataacggacga  
 ggacagggccctgtctcctcagctcagcaccaccactgacctgggacagtgaaatagatcctgagaactcagggtagctctttggaccctgttcttct  
 ttccccctttcttttggtaagtctctgcataggaaggggagaagtaacaggggtacacataatgacaaatcagggttaatfttcatttgaatttaaaatg  
 cttctcttttaataactttttgtttatcttattctaatacttccataactcttcttcttcaggggcaatattgatactgtatcttgcctcttgcaccatttaagaat  
 aacagtgataatfttgggtaagcaatagcaatattctgcatataaatttctgcatataaattgtaactgttgaaggtttcattatgctaatagcagctac  
 aatccagctaccattctgtttatfttctggttgggataaggctggtattatctgagccaagctagggcccttttgcctaacttcttatacttcttccca  
 cagctctgggcaacctgctggtctctctgctgcccactcttggcaagcactagtgccaccatggcctctaggctgactctgctgactctgctctct  
 gctgctggctgggacagggccagctctaaccatgctactctagctctcagaccctgagagccttcagacaggggggaggcaaggtgg  
 ccaccactgtgatcttaagatgctgtttgtgagcccactctggaggtgagcagcctgcccaccaccaacagcaccaccaactctgccactaagatcact  
 ggcaacaccactgatgagcccaccaccagcccactactgagcccaccaccagcctactaccagcccaccagcccactaccagctgcccactga  
 cagccctaccagcccaccactggcagcttctgcccctggcctgtgacctgtgctctgacctggagagccattctactaggctgtgctggtgggatgcc  
 tgggtgactctctgaaagctgtaccatgcttctctgcatgaagaaggtgagactaacatggcttttagccccttcagcattgctagcctgtgaccag  
 gtgctgctgggggctgggggagaacactaagaccaacctggaalctalctgagctaccccaggactcacctgtgtgaccaggccctgaagggttca  
 ccaccaaggggtgactctgtgagccagatctccacagccctgacctggccatcagggatacttttgaatgccagcagaacctgtactcttagcc  
 ccagggtgctgagcaataatctgatgtaacctggagctgatcaataactgggtgctagaataaccaacaagaattagcaggtctgctgactctctgc  
 cttctgataccaggctggtgctgctgaatgccattactctgccaagtgaagaccactttgaccctaagaagactaggatggaccttccactcaag  
 aactctgtcattaaggtgcccagatgaacagcaagaagtalctgtggcccactttatgaccagactctgaagccaaggtggggccagctcagctgagc  
 cataacctgagcctggtgatcctggtgccccagaacctgaagcataggtgagggacatggagcaggtctgagcccctctgttcaagctattatgga  
 gaagctggagatgagcaagttccagcccactctgctgacctgcccagaatcaaggtgaccacctctcagcagatgctgagcatatggaaaagctgga  
 gttctttagctttctatgacctgaatctgtgtggcctgactgaggatcctgatctcagggtgtctccatgacaccagactgtgctgagctgactgagact  
 ggggtggaggtgctgctcttctgccaactctgtggccaggacctgctggtgttggaggtgagcagcccctctctgttctgctgtggaccagcagcac  
 aagttctgttcatgggaggggtgatgcccagagcctgaagacttagagctgaattcctcagcccaggggatcagcctctactgtgcttctagtgtg  
 ccagccatctgttfttccccctccccctgcttctgacctggaaggtgcccactcccactgtcttctcaataaaatgaggaaatgcatcacattgtctg  
 agtaggtgctcattctatctgggggtgggggtggggcaggaacaggggggaggtgggaagacaatagcaggtatgctggggatgctgagggctc  
 tatgcttctgaggcagaaagaaccagctgggctcagatccactaggcccgaggaaccttagttaggtggcactcccctctctgctgctgctg  
 ctgctcactgagggcggggcaccaaaaggtcggccgacggccgggcttggcccggcggcctcagtgagcgagcgagcgcagctgctgctgagggg  
 gcccatgggagatgaccacctgtctcagtcgcaagccctgccaatgagctggtcagataagaccatgtgtctgctgtaactccaattgattgctagcatc  
 aataaaacttgccaactgttatatactggtattgatagttacaactaacatatttgaagcaattggaattaagaattcaatgcaatgatalcagggtcc  
 ttctctctggttagtattgggggaaattggacatctctcagctcagtaggctagttagggcaggtatgacatccacagcccctgggagagagatt  
 atgatgtagctagctgactcctgacaagactgcttctgagcttactacttctggtggatggctaagaataatggttgttctttaaagtgaagagc  
 attatfttccaacccctgaccaaaccttccaaggaagggcctaataatatttgcatttaagatattcaaaacttgggtttggaatggttggcctt  
 caggatcatagctataaaaatattagctatftggggatgagatgctgcttggcaaggacaagttcttaagacatcalgtggggaalaatggggaatg  
 ggaagcctatgctctgagtaagacatctgagttatctgtcaaacattttgttagctatgctaatgggagcctgttttcccttttaataatacattcacatc  
 gaattfatgctctcattgacaatgccagcccagaacaacagctcttacccttggtttcttcaaccttaacctcaatgtaaccattacctgccattcagtaa  
 aaccattattctcctacttaccaccaaggtgtacaataaagaggttctctcactcatatacaaaagcaaatcatttgttgtatgactagctgtatgcc  
 cacagatgtgttgcctagtcttctgctagctcattgactgggaacagatgggatgctcacttgggttttaattggttaactagctatgaaatgcaatcattc  
 aaataacttagagataatttttaaatgctgtccagactagctttagagccaggtgccattacacatgacaccttatttcttaattgaaatttatcatc  
 gagataggaataatagaggccttttcaagtgaaatattactatagctaaagccttagtgaacacctgcccctaaggaanaaagttctgtctata  
 catataataactftgcatgtatctgcccactgagatgtgtcctaatacaagaaaggtgaatctctgtagctagggtgacagggcaagagctgtacaggga

10

20

30

40

acctftaaagatagcttcaggccaagctgaggaaagtgaggactgggaaatgtaagacatttaaagattttcttaggtcaaaaatagaataag  
aaatagaccatttccctggacatttctgtaggtaataactgffgaactattggtaaatgcttatgctacaactaatatgtctgtttgagtttagcattgctcct  
gtcattccagaatgaaatggcaaaacatttaaatacagaactaaaaagggaacagggtataaaaggctcaatttagtcacatcatttcccttctcaccacc  
ccctftaaaccagatggttccaatgcatcaaatgcagatgttccgaaagaaagfttagtaactcaagcagacacctfatttcttcaagcagaaaaagac  
tatgagatgggtggttgggttctggagggaagataataatgatacacatttcaaactcattcatgacctactgcacacttatagttatgtacctgtt  
gtcttttctgtcaagcctagctaaatggaatgttcaagatcacatacatgcatgacacatacacatgcacatatgtcactccctatttcatcca  
catgaaactaagattactgatgtgacagattcaaacacttttattcttccaaaggcaagaagctgagctactttccagaatagttgaaagacctgtcaca  
cttctgcatgttttccacaccaccctccatccagttcttatgaatggtactggtttcaaaatatagataaattgagtgataaaaagcatttttagacaaaa  
tgaaacaggaaatgaaagaaaccagaatctctccatfctggtgaggccagctccacalgtcatggtlaactgtagggaggaaactagatattgattg  
cagatcagactgcagcaaacctgctgtactaagcatcaagagaaagcaagcaacagctggggctttagtgtagaaacattatatactagctttgaaat  
atgaaactgttttagcaggtcacctagaaaagaggttcaaagtctgcttatgataaaccttctctcagatgtttcttttatcttcaaattagccag  
ggtaggaaaataaagatcattggtgaagaaatctcaaaagaagaatagagagttcattcactgtagaatgaacagattgaacaaactagaat  
ggtagctgttaaaagaaaggtgtaggtgagctgttcaagagcccaaggggaagaaacttcttgtagactaaggggtgaaaggtgcaag  
caggcaagaccattctgacctcattaaagaaagcccttccaaccaacaactggtgtgtactcaggtgggagcaatggtgattga  
acaaatgtttgtcaaatgttactaaagagctgtctgactgggacagcagctagatagcccaattcagggagaggcattgttccactggcc  
agagatcagagcagcagcagcagcagctggtgactctgctccagctttgagacctcagagccatgtcactagcaggtatccctctgaggctactctcat  
ttctacctattccaggctttcacctcagcttccaggctggagccaagggccaagggcagcctcacctgttggtatgtagcttccaggagcccccta  
tggttcaggaaacagctctcctgccccatctgtttgctacctcctaaagccaaaggcactggtgggcccagccagcttcaaaatcacacaaggttagaa  
ggttctgacaggaaggcttagggccaatggaagaggtacttccctccagatgccaggtgatgggctcagagcctttagaacttgggaaa  
ggaagcagggtctctgaaagaaactcaggagtagaagaggaagctagagggtaaatgactacacaggaaacagaatgagttttcttagagttagt  
atatgcttagaggtgtagtaactaaacaagtctgaaatgacacaccacttagggagaagaaatgaaaccttgaatattagtaaaaaagggaactg  
caacccctgtattactagatagcttcatcaacagctcaaaacagacagattttataggttactgtgctactttaatacaaggcaggtgttgcagaactagt  
caggtcctgaaaaggatftacaaatgttagtggtccctctagttcacttccagcttcttctataaaggtgtagcaaggcacttctacaactgga  
actgaaactcctcaagtggaactagacattgagatggagaaaaatattcattgctcactgtaattatgcaaggaaatccagttgagataatggacttccctta  
tcaataataccagcgtcaatgggtcactgctttgctccatttgcctcaaaatcaagcagcctaagttgatafittaggaacaaaaggcagcttactaccagcc  
agaggggagtagaatggttaagagagagtggaagaatgaatgagccctctatctcactgctgctgaggtatagcaacagcagcccttagaggcct  
taggtctgtctcataatattcagttgaaaagggttgaagaaacctcctagaacaaatcagtagttttcttctttgagtaacatgtagcaaaaaaatttcatca  
ttaggtacagggaaacccctaaacttaatactcaagagtcagccagtgttctcaatglatctgctglatcccatgaagcaaaatgttccatcaga  
gaaactgactcaggggaaaaatacaagacctcaaatccaaaagaagcattcctcagatttgctaagcttaagcttccctgtctctcattgtgttg  
cttcaatgacgttataatggctttttgtttatgaccaaaaactaattcactgcaaaactataggtcaaagcaaccatagatgaccctgtagctg  
gagcattaaaggcggcggtgtggtgttacgagcagctgaccgctacactgcccagcccttagagcccgtcttctcttctcttctctctcgc  
cagctgcccgttctcccccgaagctcaaatcggggctccctttagggctcagatttagctttagcagcactgacccccaaaaactgatttgggtg  
atggttcagctagtgggccatgcccctgatagacggttttcccttggactgtggagtcacgcttcttaaatagtgactcttgtccaaactggaacaaact  
caactctatctgggctattctttgatttagactgcaggcatgcaagcttggcactggcctgttttacaactgctgactgggaaaacctggcgttacc  
caactaatcgccttgcagcacaatcccccttgcagctggcgtaatagcgaagagggcccagcagccttcccaacagttgcgagcctggaatgg  
cgaatgcgatttattcaaaaagcccctgcccctcaagtcagcgtaatgctctgcccagtttacaaccaatcaacttctgattgaaaaactcagag  
catcaaatgaaactgcaatttattatagcagattatcaatcaccattttgaaaaagccgttctgtaatgaggagaaaaactcaggagcagttccatag  
gatggcaagatctgggtatgctgctgatttccgactgtccaacatcaatacaacttatttcccctgtcaaaaataagttatcaagtgagaatcac  
catgagtgacactgaatccggtgagaatggcaaaagcttatgatttcttccagactgttcaacagccagccattacgctctcatcaaaaactcctgc  
atcaacaaaaccgtattcattgtgattgcctgagcgagacgaataatcgcgacgctgftaaaggacaattacaacaggaatggaatgcaaccggc

10

20

30

40

	<p>gcaggaactgccagcgcacacaataatfttccacgtgaatcagatattcttaatacctggaatgctgtttccggggatcgagtggtgagtaacat  gcatcatcaggagtagcggataaaatgcttgatggcggagagcataaaftccgtcagcagtttagctgacctcctatctgtaacatcattggcaacgc  tacctttgcatgtttcagaacaactctgcccgcacgggcttccatacaatcgatagattgctgcacctgattgcccacattatcgcgagccccattatacc  catataaatcagcatccatggtggaatftaatcggcgttcgagcaagacgtttccggtggaatggtcataacaccctgtattactgtttatgtaagcaga  cagttttatgtcatgatgataatftttatctgtgcaatgtaacatcagagatttgagacacaacgtgctttgttaataaatcgaacttttctgagtggaagg  atcagatcacgcatcttcccgaacagcagaccgttccgtggcaaaagttcaaaatcaccaactggccacctacaacaagctcctcatcaaccgt  ggctccccactttctggctgatgagggcgatcagcctgtgatgagtcagcaacaccttctcagaggcagacctctcagcggagtccactgagc  gtcagacccccgtagaaaagatcaaaggatcttctgagatctttttctgcgcgtaactctgctgtgcaaaaaaaaccaccctaccagcgggtgtt  gtttccggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtactggtctcagcagagcgcagatacaaaatctgttctctagttagccgtatgtagccac  cacttcaagaactctgtagaccgcctacatacctcgtctgtaactctgtaccagtgctgctgccaagtggcgataagctgtcttaccgggtggactc  aagacgatagttaccggataagcgcagcggctggcgtgaacgggggllcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacccaactgaga  tacctacagcgtgagctatgagaaagcccacgttcccgaaggagaaagcggacaggtatccggtaagcggcagggctcggaaacagagagcgc  acgaggagctccaggggaaacgcctgtatctttagctctcgggttccacctctgactgagcgtcgatftttgtagctcgtcaggggggc  ggagcctatgaaaaacgccagcaacgcggccttttacggtctcgtccttttgccttttgccttttgcctcatatgt</p>	10
232	<p>aatcaaatgctaccagctccagctcccagatccagagattgcaagacagaggcgaagggaaggtcgcaacaacagttatctcaagatgctattcg  tgaacccatctggaggtttccagcftgccgacaaccaactcaacaaccaatcagccaccaaaaalacagctaaataccactgatgaaccaccacacaaa  cccaccacagagcccaccaccaaccacatcaaccaccaaccaactaccagctcccacagattctcctaccagcccactactgggtccttct  gcccagacctgttactctctctgactggagagcattcaacagaggccgtgtgggggatgctttgtagatfttcccgaagctclaccacgcctclt  cagcaatgaagaaggtggagaccaacatgcccctttcccactcagcatcgcagcctccttaccaggtcctctcctgggctggggagaacacaaaaac  aaactggagagcatcctcttaccccaagacttcacctgttccaccagccctgaagggttcacgaccaaaaggtgacacctcagctctcagatttc  cacagcccagacctggccataaaggacactfttgatgctctcggacctgtacagcagcagcccagatcctaagcaacaacagtgacgccaac  ftggagctcatcaaacctgggtggccaagaacaccaacaagaatcagccgctgtagacagctcctccgatacccctgtctcctcaatgc  tatctacctgagtgccaagtggagaacaattgatccaagaaaaccagaatggaaaccttactcaaaaactcagttataaaagtcccctatgatgaat  agcaagaagtacctgtggcccatttaccacaaacttgaagccaaggtggggcagctgcagctctcccacaatctgagttgtgtagctgtgtaacc  cagaacctgaaacatgctctgaagacatggaacagcctcagcccctctgtttcaaggccatcatggagaaactggagatgtccaagtccagcccact  ctcctaactacccccgcataaagtacgaccagccagatgctcctaatcaggaatftggaattcttgattttcttatgaccttaacctgtgtggg  ctgacagagacctgtatctcaggttctcgalgcagcaccagacagtgctggaactgacagagactgggggtggaggcggctgcagcctccgccalc  tctgtggcccgcacctgtgcttftgaagtgacagacccttctctctgctctggaccagcagcaaaftccctgtctcatggggcagtatatg  accccaggccclga</p>	20 30
233	<p>aacctaatactactctagctctagccagacctgagagcctgcaggatagggggaggcgaaggtggccaccactgtgatcagcaagatgctgtttg  tgagcctatctggaggtagcagcctgcccaccaccaactctactaccaactctgctaccaagatcactccaataccactgatgaaccaccactcag  cccactactgagcccaccaccagcccacatcagcccactcagcccactaccagctgctactgactctcccaccagcccaccactggcagctttg  tctgtcccctgtgacctgtgctctgacctggagaccattctactgagcgtgctgtgggggatgcccctgtggactcagcctgaagctgtaccatgcttc  tctgcatgaaaggtggagaccaacatggcctcagccccctctctctctgctgacctggtgctgctggggctggggagaataactaagac  caacctggagagcattctgagctatccaaggacttcacctgtgtgaccagccctgaagggttactactaaagggtgacctgtgtctcagatctt  ccacagccctgacctggccatcaggacactttgtgaatccagcaggacctgtacagcagcagcccagagtgctgagcaataatctgatgctaact  tggagctgattaactgtgggtggccaagaacaccaacaagaatcttagctgctgattctctgcccctgacaccagcctggtgctgctgtaatcca  tctatctgctccaagtggaagaccactttgatccaagaagaccagatggagcccttccattcaagaactctgtgattaaggtcccctatgtaactct</p>	40

10

20

30

40

50

	<p>aagaagtatcctgtggccactfcattgatcagactctgaagccaagggtggggcagctgcagctgagccacaacctgagcctggatcctgggtgccc agaatctgaagcagagctggaggacatggagcagccctgagccctctgtgtcaaggccatcatggagaagctggagatgagcaagttccagccc acctctgactctgcccagaattaaggtagaccaccagccagacatctgagcatcatggagaagctggagttctttgactctcttatgacctgaacctgt gtggcctgactgagatcctgacctgaggtgtctgcatgcagaccagactgtctggagctgactgagactgggggtggaggctgtctgctgcctctgc catttctgtggccaggacctgctgggtttgaggtgcagcagccctctgtttgtgctgtggaccagcagcacaagttctgtttatgggcagggtgt atgacctagggtctga</p>
234	<p>aaccctaagccacctccagcagcagccaggacctgagagcctgcaggatagggggaggccaaggtggctactactgtgatcagcaagatgctgttt gtggagcctatctggaggtgagcagcctgccaccactaacttactactaattctgccactaagatcactgccaataaccactgatgagccaaccactcag cccaccactgagcccaccaccagcccaccattcagcccactcagcctaccaccagctgctactgacagccccactcagcccactactggtctttctg tcctggcctgtgactctgtctctgacctggaatcccacagcactgaggtgtgtggggatgacctggtgattcagcctgaaactgtaccatgctttc tctgcatgaagaaggtggagaccaatggccttcagcccttctctattgccagcctgctgactcaggtgtgtgctggggtgggagaataacaagac caacctggagttatctgagctatcccaggactcactgtgtgaccagccctgaaggggtaccaccaaggggtgacctctgtgtctgatcttt cacagcctgacctggccatcagggalactttgtgaatgccagcagacctgtacagcagcagccccagggtgctgagcaacaactctgatgccaac ctggagctgatcaacctgggtggccaagaaccaacaagaatcagcagctgtgacagcctgccctctgataccaggctgtgtctgctgtaac gccatcactctgtctgaagtgaagaccactttgacctaagaagaccaggatggagcccttcaactcaagaactctgtgatcaaggtgccatgatga actctagaataacctgtggcccactfcattgatcagacctgaagccaaggtgggccaagctgcagctgagccacaacctgagctgtgtgatcctggtg cctcagaacctgaagcacagctggagacatggagcagccctgagcccctgtgttcaaggcattatggagaagctggagatgagcaagttccag cctacctgtgacctgccagatcaaggtgactactagccaggatagctgagcactatggagaagctggagttttgattcagctatgacctgaacc tgtgtggcctgactgaggacctgacctgaggtgtctgcatgcagcatcagactgtgctggagctgactgagactgggggtggaggctgtctgcctct gccatctgtgtggccaggacctgtgtgtttgaggtgcagcagccctctctgtttgtgctgtggatcagcagcacaagttctgtttcatgggcagggt gtatgacccagggctga</p>
235	<p>aaccctaagctacccltagctctagccaggacctgagagcctgcaggatagggggaggccaaggtggccaccactgtgatcagcaagatgctgtttg tggagcctatctggaggtgagcagcctgccaccaccaacttactccaactctgtaccaagatcactgccaataaccactgatgaaccaccactcag cccactactgagcccaccaaccagcccaccattcagcccactcagcccactaccagctgcctactgactctcccaccagcccaccactgggagcttct gtccaggcccctgactctgttctgacctggagagccacagcactgaagctgtgctggggatgctgtgtggactcagcctgaagctgtaccatgct tctctgcatgaagaaggtggaaaccaacatggcctttagccccttcagcattgctagcctgctgactcaggtgtgctggggctgggagaactaag actaacctggagttatctgtttatccaaggacttcacctgtgtgcatcagcccctgaaggggtaccaccaaggggtcacctctgtgagccagatct ttcacagcccctgatctggccatcagggacacctttgtaatgctctagcactgtatcagcagcagccccagggtgctgagcaacaactctgatgccaac ctggagctgalcaacctgggtggccaagaactaacaacaagaatcagcagcctgtgacagcctgcccltgacactagcctgggtgtgtgctgaa ccatctatctgtctccaagtgaagaccactttgacccaagaagactaggatggagcccttcaatttaagaactctgtgatcaaggtgccatgatgaa cagcaagaataacctgtggcccattfcattgaccagctctgaaggctaaaggtggccaagctgagctgagccacaacctgagcctgggtgatcctgtg ccacagaatctgaagcacagctggagacatggagcagcctctgtctccctgtgttcaaggccatcatggagaagctggagttttgactttctatgacctgaacctgtg cacctgtgacctgccagatcaaggtgaccactctcaggacatgctgctatcatggagaagctggagttttgactttctatgacctgaacctgtg tggcctgactgaggacctgatctgaggtgtctgcatgcagcaccagactgtgtgagctgactgagactgggggtggaggctgtgtgtctgtctgcca tttctgtgcttagactctgtgtgtttgaggtgcagcagccctctgtttgtgctgtggaccagcagcacaagttccctgtttcatgggcagggtgat gatcccagggctga</p>

10

20

30

40

236	<p>aaccctaagtctaccttagctctagccaggacctgagagcctgcaggatagggggagggaagggtggccaccactgtgatcagcaagatgctgtttg      tggagcctatcctggaggtgagcagcctgccaccaccaacttactaccaactctgtaccaagatcactgccaataaccactgatgaaccaccactcag      cccactactgagcccaccaccagcccaccattcagcccactcagcccactaccagctgcctactgacttcccaccagcccaccactggcagcttct      gccctgggctctgaccctgtctctgacctggagagccattctactgagcctgtctgggggatgccctgggtggatllcagcclgaagctgtaccatgcct      tctctgcatgaagaaggtggagaccacatggccttctccctcagcattgccagcctgtgaccaggtgctgctggggctgggggagaacaccaa      gaccaacctggagagcatcctgtcttaccccaaggacttcacctgtgtcatcagggccctgaagggtcactactaaggggtgacctgtgtctcagat      ttccacagccctgaccigtctattaggacacttttgaatctcttagaccctgtacagcagctctcccaggggtgctgagcaacaactctgatccaac      ctggagctgattaacactgggtggccaagaacactaacaataagatcagcagggctgctggagacccctgcctctgacaccaggctggtgctgctgaatg      ccalctactgtctccaagtggaaactctllgatccaaagaagaccagatggagcctllccactlcaagaactctgtgatcaagggtgccatgatgaat      tctaagaagtaccctgtgctcactcattgaccagacctgaaggccaaggtggccagctgcagctgagccaacactgagcctggtgattctgtgtcc      ccagaacctgaagcacaggctggagacatggagcagggccctgagcccctctgtgttcaaggccatcagagaagctggagatgagcaagttccagc      ctactctgctgactctgcccagatcaagggtgaccactagccagacatctgtgagcattatggagaagctggagttctttactttcttatgatcaactgt      gtggcctgactgagaccctgacctgaggtgtctgcatgcagcaccagactgtgctggagctgactgagactgggggtggaggctgctgctgctcctgc      catctctgtggclagaccctgctgggtltaggtgagcagcagccctctctgtgtgctgtggaccagcagcacaagttccctgtctlcatgggcagggtg      tatgatcccaggccttga</p>	10
237	<p>aaccccaatgctactagcagcagcagccaggatcctgagagcctgcaggacagagggaagggaagggtggccaccactgtgatcagcaagatgctgtt      tggagcctatcctggaggtgagcctctctgccaccactaacagcaccaccaattctgctactaagatcactgccaacaccactgatgagcccaccacc      agcctaccactgagccaactaccagcccaccatccagcccaccagcccaccactcagctgcctactgatttctactcagcctaccactgggagcttc      tgcctgggctgctgaccctgtgctctgacctggagctctatttactgagggctgtgctgggggatgccctgggtgacttcagcctgaagctgtaccatgctt      ctctgcatgaagaaggtggagactaacatggccttctctctcttctctattgccaagcctgctgactcaggtgctgctggggctgggggagaataccaagac      taacctggagagcatcctgtcttatacctaaggactcacttgtgtgcatcagccctgaagggtcaccaccaaggggtgacttctgtgagccagatttcc      acagccctgacctgcccacagagacaccttggatgccaagcagaccctgtattctagctctcccaggggtgctgagcaacaactctgatccaactgg      aactgatcaacacttgggtggccaagaacaccaacaacaagatcagcagggctgctggatagcctgcctctgacaccaggctggtgctgctgaatgcat      ctacctgtctccaagtggaaaccactllgacccaagaagactagatggagccctlccactlcaagaactctgtgatcaagggtgccatgatgaalag      caagaagtaccctgtgcccactcattgaccagacctgaaggccaaggtgggcaagctgcagctgagccacaacctgagcctggtgatcctggtgcc      ccagaacctgaagcacagactggagacatggagcagggccctgagcccctgtgttcaaggctattatggagaagctggagatgctaaagttcagccta      ccctgctgacctgcccagatcaagggtgactaccagccagacatctgagcactatggagaagctggaattctttgacttcagctatgatctgaatctgt      gtggcctgactgaagacctgatttcaggtgtctctatgcagcaccagactgtgctggaactgactgagactgggggtggaggctgctgctgctcctgcc      atctctgtggccaggacctgctgggtlltaggtgagcagcagccctctctgtgtgctgtggatcagcagcacaagttccctgtgtlcatgggcagggtgta      tgaccctaggccttga</p>	20 30
238	<p>aaccccaatgctactttagctctcctcagaccctgagagcctgcaggacagggggagggaagggtggccaccactgtgatcctaaagatgctgtttgt      ggagcccactcctggaggtgagcagcctgccaccaccaacagcaccaccaactctgccactaagatcactgccaacaccactgatgagcccaccacc      agcccactactgagcccaccaccagcctactatccagcccaccagcccactaccagctgccactgacagccctaccagcccaccactggcagct      tctgcccctggcctgtgacctgtgctctgacctggagagccattctactgagcctgtgctgggggatgccctgggtgacttctctgaagctgtaccatgc      tttctctgcatgaagaaggtggagactaacatggcttttagcccctcagcattgctagcctgctgaccaggtgctgctggggctgggggagaactaa      gaccaacctggaatctatctgagctacccaaggacttcacctgtgtgaccagggccctgaagggtcaccaccaaggggtgacctgtgagccag      atctlccacagcccctgacctggccalcaggalactlltgaatgccagcagaacctgtactctctagccccagggtgctgagcaataaactctgatgctaa      cctggagctgatcaataacctgggtggctaaataccaacaacaagattagcagggctgctggactctctgcttctgataccaggctggtgctgctgaatgc</p>	40

10

20

30

40

50

	<p>cattfacctgtctgccaagtggaaagaccactfftgaccctaagaagactaggatggagccfttccactfcaagaactctgtcattaagggtgccatgatgaaca  gcaagaagtatcctgtggcccactttattgaccagactctgaaggccaagggtgggccagctgcagctgagccataacctgagcctggtgatcctgggtgcc  cagaacctgaagcataggctggagacatggagcaggctctgagcccctctgtgttcaaggctattalggagaagctggagatgagcaagttccagccca  ctctgctgaccctgcccagaatcaagggtgaccaccctcagacatgctgagcatcatggaaaagctggagtctftgactttttatgacctgaatctgtgtg  gcctgactgagatcctgatctgcaggtgtctccatgcagcaccagactgtgctggagctgactgagactgggggtggagctgctgctcttctgccatc  tctgtggccaggacctgctgggtgttggaggtgagcagccccctctgttctgtgtgggaccagcagcacaagtttctgtgtcatggcagggtgatg  acccagagcctga</p>	
239	<p>aatcccaatgccaccttagctctagccaggatcctgagagcctgacagcagggggggagggcaaggtgcccaccactgtagcagaagatgctgttt  gtgagagccattctggaggtgtcttctgtgccaccaccaatagcaccactaattctgccaccaagatcactgtaacaccactgatgagccaccactcag  cctaccactgagcccaccaccagcccactatcccaccaccagcccaccaccagctgcctactgacagccctaccagcccactactgggagcttc  tgccctggccctgtgacctgtgctctgactggagagccacagcactgagcgtgtctgggggatccctggtgactcagcctgaagctgtaccatg  cctttctgcatgaagaaggtgagaccaacatgcccfttagcccfttcagcattgccagcctgctgactcaggtgtctgctggggctggggagaacacc  aagaccaacctggagagcatcctgactaccccgaagacttactgtgtgcaccaggccctgaagggttactaccaagggggacttctgtgagcc  agatctccacagccctgacctggccatcagggatacttttgaatgccagcaggacctgtacagcagcagccccagggtgctgagcaacaactctgat  gtaacctggagctgatcaatactgggtggccaagaacaccaacaagaatfttaggctgctgactctgcccctgacactaggctggtgtgtgtg  aatgccatctacctgtctccaagtggaaagaccactttgatcccaagaagactaggatggagccctccactcaagaactctgtgatcaagggtgccatg  atgaacagcaagaaglacctgtggcccalttaltgaccagacctgaaggccaaggtggggcagctgcagctgagccacaatctgagcctggtgaltc  tgggtccccagaatctgaagcacagactggagacatggagcagcctgtctccctctgtgttcaaggccatcatggagaagctggagatgagcaagtt  ccagcccactctgactctgactgtagatcaaggtgaccaccagccagacatgctgagcattatggagaagctggagttcttactcagctatgacct  gaacctgtgtgctgactgaggacctgatctgcaggtgtctccatgcagcaccagactgtctgagcctgactgagactgggggtggagctgctgct  gcctctgctatftctgtggccaggacctgctgtgttggaggtgcagcagccctctgttctgtgtgggaccagcagcacaagttctctgttcatggg  gaggggtgatgaccccagggcctga</p>	10 20
240	<p>aatccaaatgctaccagctcctcctcccaggatcctgaatccctcaagacaggggggagggcaaggtgccaactactgtgattccaagatgctgtttgtg  gagccatcctggaggttagcagccttctactaccaactcaacaaccaatfcagccaccaaatacagcctaataccagatgagccaacaactcaacc  caccactgagccaccactcagccaacctcaaccacccaaccaactaccagctcccacagatctcctaccagcctaccactgctcctctctgcc  caggacctgtactctctgctgactggaagccattactgaggctgtcctgggggatctttgtagacttccctgaagctctaccatgactttcagc  aatgaagaaggtggagaccaacatgcccctttcccaatcagtatagcaagtctcctgactcaggtcctgctggggcaggggagaatacaagaccaac  ctggagagcatcctcagttatcccaaggactcactgtgtccaccagccctgaagggtctcacaacaagggtgacctcagctctcagatitccac  agcccagacctggccataaaggacacctftgtaafgcctctagacctgtactcaagctcccccagagtccctaagcaacaacagtgatcaaattfga  gctcatcaaacctgggtggccaagaacaccaacaagaatcagcagcgtctgacagctgccaagtgatacaagcctgtctcctcaatgctatct  acctgagtcceaagtggaagacaacalttgcacccaagaaaccagaatggaaccttctactcaaaaactcagttalaaaagtgcccatgatgaatagca  agaagtaccctgtggccattcattgacaaaacttgaagccaaggtggggcagctgcagctcctccacaactctgactgtgtaactcctgtatcccaga  acctgaaacatagccttgaagacatggaacagcctcagccctctgtttcaaggccataatggagaagctggagatgtccaagttccagcccactctc  laaacactaccagatcaagtgacaaccagccagatgatctcaalcatggagaaatfgaatttttattttctatgaccttaacctgtgtggctgac  agaggacctgatctcaggtttctgcaatgagcaccagacagctgtggaactgacagagactgggggtggaagctgctgcagcaagtgcaatatctgtg  gccagaacctgctggtctttgaagtcagcagccccctctgtttgtgtgtgggaccagcagcacaagttcctgtcttcatggggaggtatatgacccc  agggcctga</p>	30 40

10

20

30

40

241	<p>aacccaatgcaaccagcagttctctcagatccagagtcctctcaggacaggggggagggcaaggtggccaccactgtgatctccaagatgctgttt  gtggagcccaatcctggaggtatccagcctccctaccaccaacagcaccaccaactcagccacaaaatcactgctaaccactgatgagcccaaac  cagccaactactgagccaaccactcagctaccatccaaccaccagcctactaccagctcccactgactctctaccagcccaccactggcagctt  ctgcccagagctgtgacctctgctctgactggagtcctccattccacagagcagctgtgggggatccctggtgagacttctcctgaagctctaccatgc  attctctgcatgaagaaggtggagaccaacatggccttctcccccttcagcattgcccagcctctgaccaggtcctgctgggggaggggagaacaca  aagacaacctggagtcctcctcagctacccaaggttccactgtgtccaccagggcctgaagggttcacaaccaaggggtgaccagtgtctcac  agattttccacagcccagacctggccatcagggacacctttgtaatgccagtaggacctgtacagctccagtcaccagagctcctcagcaaacctctgat  gccaacctggagctgatcaaacctgggtggccaagaacaccaacaacaagatcagcaggctgctagactcactgcccctctgacacaaggctgtgctc  ctcaatgcaatctactgagtgccaagtggagaccaccttgaccccaagaagaccaggtgagcccttccactcaagaacagtgtcattaagggtcc  catgatgaacagcaagaagtacctgtggcccacttcattgaccagacctggaaggccaaggtggggcagctgcagctctccacaacctgtcactggct  atcctgttcccagaacctgaagcacaggttgagacatggagcaggccctcagccctctgtattcaaggccataatggagaagctggagatgagca  agttccagcccactctgctgacctaccaggtcaaggtgaccaccagccagacatgctctcaatcatggagaagttggagttcttctgactcagctatg  acctgaacctgtgtggctgacagagacctgacctgacaggtgtcagccatcagcaccagacagctgctggaactgacagagactgggggtggaagct  gctgcagcaagtgctatitcagtgccagggacctgtggtcttggaggtccagcagccctctgttctgtctgggaccagcagcaagttccctgtctt  catggggagggctatgaccccagggtcctga</p>	10
242	<p>aacccaatgccaccagctccagctctcaggaccagagacctgcaggacaggggggagggcaaggtggccaccacagtgatcagcaagatgctgt  ttgtggagcccatcctggaggtgagcagcctccccaccaccaacagcaccaccaattctgccaccaagatcacagccaacaccacagatgagcccaaa  cccagctaccacagagccaaccacacagcccaccatccaaccaccacactactaccagctcccacagacagccctaccagcctaccacaggc  agcttctgcccctggccctgtgacctgtgctctgactggagagccactccacagaggtctgtctgggggatccctgggattcagccgaagctgtac  catgcttctctgcatgaagaaggtggagaccaacatggccttcagccccttcagcattgccagcctcctgaccaggctcctgctgggggctggggaga  acaaaagaccaacctggagagcatcctgagctacccaaggttccactgtgtgaccagggcctgaagggttcaccaccaaggggtgacctctg  tgagccagatfttccacagccctgacctggccatcagggacacctttgtaatgctccagggacctgtacagctctagcccagggtgctgagcaaac  tctgatccaactggagctgatcaaacctgggtggccaagaacaccaacaacaagatcagcaggctgctggacagcctgcccctgacaccaggtg  gtgctctgaatgcatctactgtctgccaagtggagaccaccttgaccccaagaagaccagaatggagcccttccactcaagaactctgtgataaag  gtgcccctgatgaacagcaagaagtacctgtggcccacttcattgaccagacctgaaagccaaggtggccagctgcagctcagcccaacctgagc  ctggtcatcctgtgccccagaacctgaagcacaggtggagacatggaacagggcctcagcccctctgtgttcaaggccattatggagaagctggag  atgagcaagttccagcccactctgctgacactgcccaggtcaaggtgaccaccagccagacatgctgagcatcatggagaagttggagttcttctgact  cagctatgacctgaacctgtgtgctgacagagacctgacctccaggtgtctgcatgacagcaccagacagctggaactgacagagacaggggt  ggaaagctgctgctcctctgcatctctgtggccaagacctgctggttggaggtgcagcagccctctgttctgtgctgggaccagcagcaagaatc  cctgttctatggcaggggtgatgaccccagggtcctga</p>	20
243	<p>aacccaatgctacttctagctcctctcaggacctgagagccttcaggacaggggggagggcaaggtggccaccactgtgatctcaagatgctgtttgt  ggagcccaatcctggaggtgagcagcctgccaccaccaacagcaccaccaactctgccaactaagatcactgccaacaccactgatgagcccaccacc  agcccactactgagcccaccaccagcctactatccagcccaccagcccactaccagctgcccactgacagccctaccagcccaccactggcagct  tctgcccctgggctgtgacctgtgctctgacctggagagccattctactgaggtgtgctgggggatccctggtgacttctctgaagctgtaccatgc  tttctctgcatgaagaaggtggagactaacatggcttttagccccttcagcattgctagcctgctgaccagggtgctgctgggggctggggagaacactaa  gaccaacctggaatctatctgagctacccaaggttccactgtgtgaccagggcctgaagggttcaccaccaaggggtgacctctgtgagccag  atcttccacagcccctgacctggccatcagggatactttgtgaatgccagcagaacctgtactcttctagcccaggggtgctgagcaataatctgatgtaa  cctggagctgatcaatcctgggtggtaagaataccaacaacaagattagcaggctgctgactctctgcccctctgataccaggctggtgctgctgaaatgc</p>	30



	<p>atctccacagccctgacctggccatcaggatacttttgaatgccagcagaacctgfactctctagccccagggtgctgagcaataattctgatgctaa  cctggagctgatcaataacctgggtgctaagaafaccaacaacaagattagcaggctgctggactctctgcttctgataccaggctggtgctgctgaatgc  cattfacctgtctccaagtgaagaccactttgacctaaagaagactagggagcctttccactcaagaactctgcaataaggtgccatgatgaaca  gcaagaagtatcctgtggccactttatgaccagactctgaagccaaggtgggccaagctgcagctgagccalaacctgagcctgggatcctgggtgcc  cagaacctgaagcatagctggaggacatggagcaggctctgagccccctctgtttcaaggctattatggagaagctggagatgagcaagtccagccca  ctctgtgacctgccagaatcaaggtgaccacctctcagacatctgagcatcatggaagctggagtcttctgactttctatgacctgaatctgtgtg  gcctgactgaggatcctgatctgagggtgctgcatgagcaccagactgtctggagctgactgagactgggtggaggctgctgctctctgcccac  tctgtggccaggacctgctggtgttgagggtgagcagccctctctgtgtggaccagcagcacaagttctgtgttcatgggcagggtgatg  acccagagcctga</p>	10
247	<p>aacccaatgctactctagctctcagaccctgagagcctgcaggacagggggagggcaaggtggccaccactgfatctctaaagctgtttgt  ggagcccactctggaggtgagcagcctgcccaccaccaacagcaccaccaactctccactaaatcactgccaacaccactgatgagcccaccacc  agcccactactgagcccaccaccagcctactatccagcccaccagcccactaccagctgcccactgacagccctaccagcccaccactggcagct  tctgcccctggcctgtgacctgtgctctgacctggagagccattctactgagctgtgctgggggatgcccctggtggacttctctgaaagctgacctgc  ttctctgcatgaagaaggtggagactaacatggcttttagcccctcagcattgctagcctgctgacctgagctgctggggctgctgggagaactaa  gaccaacctggaatctatctgactaccacaaggacttccctgtgtgaccaggccctgaagggttaccaccaaggggtgacctgtgagccag  atctccacagccctgacctggccatcaggatacttttgaatgccagcagaacctgfactctctagccccagggtgctgagcaataattctgatgctaa  cctggagctgatcaataacctgggtgctaagaafaccaacaacaagattagcaggctgctggactctctgcttctgataccaggctggtgctgctgaatgc  cattfacctgtctccaagtgaagaccactttgacctaaagaagactagggagcctttccactcaagaactctgcaataaggtgccatgatgaaca  gcaagaagtatcctgtggccactttatgaccagactctgaagccaaggtgggccaagctgcagctgagccalaacctgagcctgggatcctgggtgcc  cagaacctgaagcatagctggaggacatggagcaggctctgagccccctctgtttcaaggctattatggagaagctggagatgagcaagtccagccca  ctctgtgacctgccagaatcaaggtgaccacctctcagacatctgagcatcatggaagctggagtcttctgactttctatgacctgaatctgtgtg  gcctgactgaggatcctgatctgagggtgctgcatgagcaccagactgtctggagctgactgagactgggtggaggctgctgctctctgcccac  tctgtggccaggacctgctggtgttgagggtgagcagccctctctgtgtggaccagcagcacaagttctgtgttcatgggcagggtgatg  acccagagcctga</p>	20
248	<p>aacccaatgctactctagctctcagaccctgagagcctgcaggacagggggagggcaaggtggccaccactgfatctctaaagctgtttgt  ggagcccactctggaggtgagcagcctgcccaccaccaacagcaccaccaactctccactaaatcactgccaacaccactgatgagcccaccacc  agcccactactgagcccaccaccagcctactatccagcccaccagcccactaccagctgcccactgacagccctaccagcccaccactggcagct  tctgcccctggcctgtgacctgtgctctgacctggagagccattctactgagctgtgctgggggatgcccctggtggacttctctgaaagctgacctgc  ttctctgcatgaagaaggtggagactaacatggcttttagcccctcagcattgctagcctgctgacctgagctgctgggtaagacctgctgaattct  ctccaggtcattgtgacactccataaagctcacaatccagacacttacaagccatgcccctggaagaagctgtaaaatgggctattatattgg  gggtgggtgagggatgatctttcattctgaacattccatcttccagctgatgtaataggcagcagctgtgtaaaactctgactatacaagaacata  taaaataaggtcgcagccactaacatgtttcatgccaagagagggtgataaagaagatgaaataggcagctggctcacgcctgtaatccagcacttt  gggaggccaaggggggtgatcacctgaggtcaggtcaagaccagcctggccaacatggtgaaacctgtctctactaaaaatacaaaaatcatcag  ggaggtggtgcatgacctgtaatcccagctactggcagctgaggcaggagaatcgttgaaccaggggtggagggtgagctgagccgagaccg  caccattgactacagctgggtgacagagcagactctgtctcaaaaaaaaaaaaaaattatcagagatagacctagatagatgtggttagtactcctc  tagctctgacctggcagatcacttfaacctctgagcctgagctctgtgtaaaatagtgatgctatctactcaaaagattaagaagcagaaa  gccagccggatcggtgttcaacctgtaatcccagcatttaggaggccgaggcggcagatcacagggtcagggttcagaccagcctgactaa  catggtgaaacccctctactaaaaataaaagaattagctaggcatggtgtgacacctgtaacccagctactcaggagctgaggcaggagaa</p>	30

10

20

30

40

50

	<p>tcaactgaaacacgggagcagaggtgacagtgagccgaatcatgccactgcaactccagcctgggaagactgagcaagactctgtcctcaaaaaaaaaa  agaagcagcctagtgtctgacttagtggagggtcaaaaaatgtaaatcctctgccatctgaggattactgtcaagtccattgtaattaccctaggaat  ggcacaacaaataactacaagcagtgaggacagagctattactcccagagagaattctaaaaaggctacagaatctttctggctggcagcgggactc  acacctataatcctggcactttggaggccaaggcagaggttcaagaccagcctggccaacatgttgaacccctctctactaaaaatgcaaaaattagc  caggcctagtgatgcatcttattgcccagctacttggaggcagaggtggaggaggtcttgaacctggagattcaagtgaactgagattgaccactg  attccagcctgggcaacaaagcaagactctgtcctcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagagattgagagaacacttccagctcagatgatctgtg  atcccccaaaagcagggaaatccctccattccagcctgtgcccacccctattccaagggaagccccccgactcatcctgaagtatcttcatctctg  ctttgtgagggcctgggagaacactaagaccaacctggaatctatcctgagctaccccaaggacttccactgtgtgaccaggccctgaaggctca  ccaccaagggggtgacctctgtgagccagatctccacagccctgacctggccatcagggatactttgtgaatgcccagcagaacctgtactcttagcc  ccaggggtgctgagcaataattctgatgtaacctggagctgatcaaatcctgggtgctgaagaataccaacaacaagattagcaggctgctggactctg  cttctgataccaggctggtgctgctgaatgccattacctgtctccaagtgaagaccacttttgaccctaagaagactaggtgagcctttccacttcaag  aactctgtcattaaggtgcccagatgaacagcaagaagtatcctgtggcccactttatgaccagacttgaagccaaggtggccagctgacagctgag  ccataacctgagcctggtgatcctgtgcccagaacctgaagcataggtgaggacatggagcaggctctgagccccctgtgttcaaggctattatgg  agaagctgagatgagcaagttccagcccactctgctgacctgcccagaatcaaggtgaccacctcagggacatgctgagcatcatggaaggctgg  agttcttgactttctatgacctgaatctgtgtgacctgactgagatcctgatctgaggtgtctgcatgagcaccagactgtctggagctgactgaga  ctggggtggaggctgctgctctctcctctgctgcccagaccctgctggtttgaggtgacagcagccctctgtttgtgctgtggaccagcagc  acaagttcctgtgttcatgggaggggtgatgaccccagagcctga</p>	10
249	<p>aacccaatgtacttctagctcctcagaccctgagagcctgacagcagggggagggcaaggtgcccaccactgtgatcttaagatgctgtttgt  ggagcccatcctggaggtgagcagcctcccaccaccaacagcaccaccaactctgccactaagatcactgccaacaccactgatgagcccaccacc  agcccactactgagcccaccaccagcctactatccagcccaccagcccactaaccagctgccactgacagccctaccagcccaccactgagcgt  tctcccctggcctgtgacctgtgctctgacctggagagccattctactagggctgtgctggggatgccctggtggacttctctgaagctgtaccatg  tttctcctgaagaaggtggagactaactgcttttagcccctcagcattgctagcctgctgaccaggtgctgctgggtaagaccctgctgaattct  ctccaggtcattttgtgacactcccataagagtcaccaatccagacacttacaagccatgcccctgggaagaagctgtaaaaatgggctattataattgg  gggtgggtagaggatgatcttttcttgaacattccatcttccacagtgatgtaataggcaccattgcttgaaaactctgactatatacaagaacat  aaaaaaggctccagccactaacctgtttcatgcaaggagaggtgataagaaagatgaattattatcagaagaagcagaagccagcagcctagtgt  ctgacttagtggagggtcaaaaaatgtaaatcctctgccatctgaggattactgtcaagtccattgtaattaccctaggaatgcaacaacaaatact  acaagcagtgaggacagagctattactcccagagagaattctaaaaaggctacagaatcttctgagagattgagagaacacttccagctcagatgatc  gtgatcccccaaaagcagggaaacctccattccagcctgtgcccacccctatcccagaagggccccccactatcctgcaagtatcttcatctct  gccccttggcagggcctgggagaacactaagaccaacctggaatctatcctgagctaccccaaggacttccactgtgtgaccaggccctgaaggcc  ttaccaccaagggggtgacctctgtgagccagatctccacagccctgacctggccatcagggatactttgtgaatgccagcagaacctgtactcttca  gccccaggtgctgagcaataattctgatgtaacctggagctgaacatcctgggtgctgaagaataccaacaacaagattagcaggctgctggactct  ctgcccctgataccaggctgctgctgctgaatgccattacctgtctccaagtggaagaccactttgaccctaagaagactaggtgagcctttccactt  caagaactctgtcattaaggtgccatgatgaacagcaagaagtatcctgtggcccactttatgaccagactctgaaggccaaggtggccagctgagc  tgagccataacctgagcctggtgatcctgtgcccagaacctgaagcataggtgaggacatggagcaggctctgagccccctgtgttcaaggctatt  atggagaagctgagatgagcaagttccagcccactctgctgacctgcccagaatcaaggtgaccacctctcaggacatctgagcatcatggaagg  ctggagtctttgactttctatgacctgaatctgtgtgacctgactgagatcctgatctgaggtgtctgcatgagcaccagactgtgctggagctgact  gagactgggggtgagcctgctgctctctcctctgctgcccagaccctgctggtttgaggtgacagcagccctctgtttgtgctgtggaccag  cagcacaagttcctgttcatgggaggggtgatgaccccagagcctga</p>	20 30 40



	<p>tgtacaccctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggatcaatctgacctgcctgggtcaaaaggcttctatcccagcgacatcgcctgggagtg  ggagagcaatgggagcagccggagaacaactacaagaccacgctcccggctggactccgacggctccttctctcaatagcaagctcaccgtggacaa  gagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctctgcacaaccactacacgagaagagcctctccctgtctccgggt</p>	
252	<p>aatccaaatgctaccagctccagctcccaggatccagagagttgcaagacagaggcgaagggaaggtcgcaacaacagttatctccaagatgctattcg  ftgaaccatctggagggtttccagcttccgacaaccaactcaacaaccaatfcagccacaaaataacagctaataccactgatgaaccaccacacaaa  cccaccacagagcccaccaccaaccaccatccaaccaccaaccaactaccagctcccaacagattctctaccagcccactactgggtcctct  gcccagagacctgttactctctgctgactggagagtcattcaacagagccgtgttgggggatgctttgtagattctcccgaagctctaccacgctct  cagcaatgaagaaggtggagaccaacatggcctttccccattcagatcgcaccgctccttaccaggtcctgctcggggctggggagaacacaaaaac  aaacctggagagcatcctcttacccaagacttcactgtgtccaccagccctgaagggttcacgaccaaagggttcacctcagctctcagatttc  cacagcccagacctggccataaggacaccttftgaatgcctctcggacctgtacagcagcagcccagagctcaagcaacaacagtgacgccaac  ftggagctcaacaacctgggtggccaagaacaccaacaacaagalagcagccggctgtagacagctcgcctccgataaccgcttctctctcaatgc  tatctacctgagtgccaagtggagaacaacattgatcccaagaaaaccagaatggaaccttctactcaaaaactcagttataaaagtcccatgatgaat  agcaagaagtaccctgtggccatttcatgaccaacttgaagccaaggtggggcagctgcagctctcccacaatctgagttggtgatctctgaccc  cagaacctgaacatcgcttgaagacatggaacaggtctcagccctctgtttcaaggccatcatggagaaactggagatgtccaagtccagcccact  ctcctaactaccccccatcaaaagtacgaccagccagatgctctcaatcatggagaatggaattctcgaattttctatgacctaacctgtgtggg  ctgacagaggacctgatctcaggtttctcagatgagcaccagacagctgctggaactgacagagactgggtggagcggctgcagcctccgcatc  tctgtggcccgcacctgctgtcttgaagtgcagcagccctcctctctgctctggaccagcagcacaagttccctgtctctatggggcagtatatg  accccaggggcgacaaaactcacatgcccaccgtgcccagcactgaactcctggggggaccgtcagcttctcttcccccaaaaaccaaggaca  cccctgatctccccgacccctgaggtcacatgctgtgggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtagctggacggctgg  aggtgcataatccaagacaagccggcgggagcagtagacaacagcagctaccctgtgtgcagcgtcctcaccgtcctgaccagagctgctgaat  ggcaagagtagaagtcaaggtctcaacaagccctccagccccatcgagaaaacctctcaaaagccaagggcagccccgagaaccacagg  tgtacaccaagccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgagctgctgcaaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtgaggt  gggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgggtcccgtgctggactccgacggctccttcagactcggcagctacctaccgtggac  aagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctctgcacaaccactacacgagaagagcctctccctgtctccgggt</p>	<p>10 20 30 40</p>
253	<p>aatccaaatgctaccagctccagctcccaggatccagagagttgcaagacagaggcgaagggaaggtcgcaacaacagttatctccaagatgctattcg  ftgaaccatctggagggtttccagcttccgacaaccaactcaacaaccaatfcagccacaaaataacagctaataccactgatgaaccaccacacaaa  cccaccacagagcccaccaccaaccaccatccaaccaccaaccaactaccagctcccaacagattctctaccagcccactactgggtcctct  gcccagagacctgttactctctgctgactggagagtcattcaacagagccgtgttgggggatgctttgtagattctcccgaagctctaccacgctct  cagcaatgaagaaggtggagaccaacatggcctttccccattcagatcgcaccgctccttaccaggtcctgctcggggctggggagaacacaaaaac  aaacctggagagcatcctcttacccaagacttcactgtgtccaccagccctgaagggttcacgaccaaagggttcacctcagctctcagatttc  cacagcccagacctggccataaggacaccttftgaatgcctctcggacctgtacagcagcagcccagagctcaagcaacaacagtgacgccaac  ftggagctcaacaacctgggtggccaagaacaccaacaacaagalagcagccggctgtagacagctcgcctccgataaccgcttctctctcaatgc  tatctacctgagtgccaagtggagaacaacattgatcccaagaaaaccagaatggaaccttctactcaaaaactcagttataaaagtcccatgatgaat  agcaagaagtaccctgtggccatttcatgaccaacttgaagccaaggtggggcagctgcagctctcccacaatctgagttggtgatctctgaccc  cagaacctgaacatcgcttgaagacatggaacaggtctcagccctctgtttcaaggccatcatggagaaactggagatgtccaagtccagcccact  ctcctaactaccccccatcaaaagtacgaccagccagatgctctcaatcatggagaatggaattctcgaattttctatgacctaacctgtgtggg  ctgacagaggacctgatctcaggtttctcagatgagcaccagacagctgctggaactgacagagactgggtggagcggctgcagcctccgcatc  tctgtggcccgcacctgctgtcttgaagtgcagcagccctcctctctgctctggaccagcagcacaagttccctgtctctatggggcagtatatg</p>	<p>10 20 30 40</p>

10

20

30

40



	<p>cagaacctgaaacatcgtcttgaagacatggaacagctctcagccctctgtttcaaggccatcatggagaactggagatgtccaagttccagcccact  ctcctaactaccccgatcaaaagtgacgaccagccagatgctctcaatcatggagaattggaattcttctatgacctaacctgtgtggg  ctgacagaggaccctgatctcaggttctgcatgagcaccagacagtgctggaactgacagagactgggggtggagcggctgcagcctccgcatc  tctgtggcccgcacctgtctgtctttgaagtgacgagccctctctctgtctctggaccagcagacaaagttccctgtcttcatggggcagtatatg  accccaggcggacaaaactcacatgcccaccgtgccagacctgaaactctgggggaccgtcagttctcttcccccaaaaaccaaggaca  ccctcatgatctcccggaccctgagatcacatgctggtggtgagcctgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggagcgcgtgg  agggtcataatgccaagacaaagccgcyggagggagcagtagacaacagcagctaccgtgtgtcagcgtctcactctctgaccagactggtgaatg  gcaaggagtacaagtgcaaggctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaacctccaagcgaagggcagccccgagaaccacaggt  gtacacctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtcaaggctctatcccagcgacatcggctggagtg  ggagagcaatggcgaccggagaaactacaaagaccagcctcccgtctgtgactccgacgctctctctctctacagcaagctaccctgggaaa  gagcaggtggcagcaggggaaactctctcatgctccgtgctgcatgagcctctgcacaacctacacgcagaagacccctctctctccgggt</p>	10
256	<p>aacccaatgctacttctagctctctcagaccctgagagcctgagagcctgagagcaggggggagggcaaggtggccaccactgtgatcttaagatgctgtttgt  ggagcccactctggaggtgagcagcctgccaccaccaacagcaccaccaactctgccactaagatcactgccaacaccactgatgagcccaccacc  agcccactactgagcccaccaccgctactatccagcccaccagcccactaccagctgccactgacagccctaccagcccaccactggcagct  tctccctgggctgtgacctgtgctcagacctggagagccactctactgagcgtgtgctgggggatccctggtgacttctctgaaagtgtatcatg  cttctctgcatgaagaaggtggagactaactggttttagccctctcagcattgctagcctgctgaccaggtgctgctggggcctggggagaacta  agaccaactggaatctatcctgagctacccaagactcactgtgtgaccagggcctgaagggtcaccaccaagggggtgacctgtgagcca  gatcttccacagccctgacctggccatcaggatctttgtgaatgccagcagaacctgtacttctagcccagggtgctgagcaataattctgatgcta  acctggagctgatcaatctgggtggtgtaagaatccaacaacaagattagcagggctgctgactctctgctctgataaccaggtggtgctgtaatg  ccattacctgtctccaagtggaagaccactttgacctaaagaactaggtggagccttccactcaagaactctgtcattaaggtgccatgatgaac  agcaagaagtatcctgtgcccactttatgaccagactctgaagccaaggtgggccaagctgcagctgagccaacctgagcctggtatcctggtgc  cccagaactggaagcagcctggagacatggagcagcctctgagccccctgtgttcaaggctattatggagaagctggagatgagcaagttccagc  ccactctgctgacctgcccagaatcaaggtgaccacctctcagacatgctgagcatcatgaaaaagctggagttctttgactttctatgacctgaa  tgtgacctgactgagatcctgatctcaggtgtctccatgagcaccagactgtgctggagctgactgagactgggggtgagcgtgctgctctgc  catctctgtggccagacctgctggtttgaggtgcagcagccctctctgtttgtgctgtgggaccagcagcaagttcctgtgtcatggcaggggt  tatgaccccagagcctga</p>	20
257	<p>aacccaatgctacttctagctctctcagaccctgagagcctgagagcaggggggagggcaaggtggccaccactgtgatcttaagatgctgtttgt  ggagcccactctggaggtgagcagcctgccaccaccaacagcaccaccaactctgccactaagatcactgccaacaccactgatgagcccaccacc  agcccactactgagcccaccaccgctactatccagcccaccagcccactaccagctgccactgacagccctaccagcccaccactggcagct  tctccctgggctgtgacctgtgctcagacctggagagccattctactgagcgtgtgctgggggatccctggtgacttctctgaaagtgtaccatgc  tttctctgcatgaagaaggtggagactaactggttttagccctctcagcattgctagcctgctgacccaggtgctgctggggcctggggagaactaa  gaccaactggaatctatcctgagctacccaagactcactgtgtgaccagggcctgaagggtcaccaccaaggggtgacctgtgagccag  atctccacagccctgacctggccatcaggatctttgtgaatgccagcagaacctgtacttcttagcccaggggtgctgagcaataattctgatgctaa  cctggagctgatcaatctgggtggctaaagaatccaacaacaagattagcaggtgctgagctctctgctctgataccaggtgctgctgctgaatgc  cattacctgtctccaagtggaagaccactttgacctaaagaactaggtgagcctttcactcaagaactctgtcattaaggtgccatgatgaca  gcaagaagtatcctgtgcccactttatgaccagactctgaaggccaaggtgggccaagctgcagctgagccataacctgagcctggtgatcctggtgccc  cagaacctgaaagcagctggagacatggagcaggtctgagccccctgtgttcaaggctattatggagaagctggagatgagcaagttccagccca  ctctgctgacctgcccagaatcaaggtgaccacctctcagacatgctgagcatcatgaaaaagctggagttctttgactttctatgacctgaaatctgtgtg</p>	30
		40

	gcctgactgaggatcctgatctgcagggtctgccatgcagcaccagactgtgctggagctgactgagactggggtggaggctgctgctctgccatc tctgtggccaggacctgctgggtgttgagggtgcagcagcccttctgtgtgctggtggaccagcagcacaagtttctgttcatgggcagggtgatg accccagagcctga	
258	aaccccaatgctacttctagctcctctcaggacctgagagcctgcaggacaggggggggcaagggtgccaccactgtgatctctaaagtctgtttgt ggagcccatcctggagggtgagcagcctgccaccaccaacagcaccaccaactctgccactaagatcactgccaacaccactgatgagccaccacc agcccactactgagcccaccaccagcctactatccagcccaccagcccactaccagctgccactgacagccctaccagcccaccactggcagct tctccctgggctgtgacctgtgctctgacctggagagccatttactgaggctgtgctgggggatgccctgtggacttctctctgaagctgtaccatgc tttctctgccatgaagaaggtgagactaacatggccttttagccccttcagcattgctagcctgctgaccagggtgctgctgggtaagacctgttgaattct ctccaggctattgttgactcaccataagatcaccaatccagacacttacaagccatgctctgggaagaagctgtaaaaatgggtattatattgg gggtgggtgaggggatgtatcttttctgtgacattcattcagctgatgtaatggcagcattgtgtaaaactctgtactatacaagaacata taaaaataggtgcagccactaacatgtttcatggcaaggagaggtgataagaagatgaaattattatcagaagaagcagaagccagcagcctagtgt ctgacttagtggagggtcaaaaaatgtaaacctctgcatctgagggtacttactgcaagctccatttggtaattaccctaggaatggcacaacaaactact acaagcagttgggacagagctattactcccagagagaattctaaaaggctacagaatctttctgagagattgagagaacactccagctcagatgatct gtgatcccctccaaagcaggggaataacctccattccagcctgtgcccacccctatcccaaggagggccccgactcactctcaagtatctttcatctct gcccctgttgcaggggtgggagaaactaaccaacctggaaatctatcctgagctaccacaaggacttcacctgtgtgcaccaggccctgaaggggc ttaccaccaaggggtgacctctgtgagccagatctccacagccctgacctggccatcagggatactttgtgaatggcagcagaacctgtactctcta gccccagggtgctgagcaataattctgatgtaacctggagctgatcaaatcctgggtgctaaagaatcaacaacaagattagcaggtgctggactct ctgctcttgataccaggctgtgctgctgtaatgccatttacctgctgccaagtggaaagaccacttttaccctaagaagactaggatggagcctttccactt caagaactctgcttaaggtgccatgatgaacagcaagaagtatcctgtggcccactttatgaccagactctgaaggccaaggtgggccaagctgcaagc tgagccataacctgagctggtgatcctggtgcccagaacctgaagcatagctggagacatggagcaggtctgagcccctctgttcaaggctatt atggagaagctggagatgagcaagttccagcccactctgctgacctgcccagaatcaagggtgaccacctctcaggacatgctgagcatcatggaanaag ctggagttctttgactttctatgacctgaatctgtgtgctgactgaggatctgatctgcaggtgtctgctccatgcagcaccagactgtgctggagctgact gagactggggtggaggctgctgctgctctgctcctctctgtgcccagacctgctggtgtttgagggtgcagcagcccttctgtgtgctggtggaccag cagcacaagtttctgttcatgggcagggtgatgaccccagagcctga	10
259	atggctagcagactgactctgctgacctgctgctgctgctgctgctggctggggacagggccagcagc	
260	atggccagcaggtgacctgctgactctgctgctgctgctgctgctgctggctggggacagggccagcagc	
261	atggctagcagactgactctgctgacctgctgctgctgctgctgctgctggctggggacagggccagcagc	30
262	atggctagcagactgactctgctgacctgctgctgctgctgctgctgctggctggggacagggccagcagc	
263	atggccagcaggtgacctgctgacctgctgctgctgctgctgctgctggctggggatagggccagcagc	
264	atggccttagctgactctgctgactctgctgctgctgctgctgctgctggctggggacagggccagctct	
265	atggctagcaggtgacctgctgacctgctgctgctgctgctgctgctgctggctggggacagggcccttagc	
266	atggcctcaggctgacctgctgacctcctgctgctgctgctgctgctgctggctggggatagaccttagc	40

10

20

30

40

50

267	atggcctccaggctgacctgctcaccctctgctgctcctgctggctggggacagggcctccagc
268	atggcctccaggctgacctgctgacctcctgctgctcctgctggctggggacagaccagcagc
269	aacccaatgctacttctagctccctcaggacctgagacctgacaggggggagggcaaggtggccaccactgtagctctaagatgctgtttgt ggagcccactctggaggtgagcagcctgcccaccaccaacagcaccaccaactctgccactaagatcaactgccaacaccactgatgagcccaccacc agcccactactgagcccaccaccagcctactatccagcccaccagcccactaccagctgcccactgacagcctaccagcccaccactggcagct ctgcccctgggctgtgacctgtgctctgacctggagagccattctactgaggtgtgctgggggatccctggtggacttctctgaagctgtaccatgc tttctctgcatgaagaagggtggagactaacatggcttttagccccttcagattgctagcctgctgaccaggtgctgctggggctgggagaactaa gaccaacctggaatctatctgagctacccaaggacttcacctgtgtgcaccagggcctgaagggtctaccaccaaggggtgacctctgtgagccag atcttccacagccctgacctgcccacagggatactttgtgaatgccagcagaacctgtacttcttagcccagggtgctgagcaataattctgatgtaa cctggagctgatcaatacctgggtggtaagaataccaacaagaattagcagctgctggactctgctccttgataaccagctggtgctgctgaatgc cattacctgtctccaagtgaagaccacttttagccctaagaagactaggatggagcctttccactcaagaactctgtaaggtgccatgatgaaca gcaagaagtatcctgtggcccactttatgaccagactctgaaggccaaggtggggcagctgcagctgagccataacctgacctggatcctgggtccc cagaacctgaagcatagctggaggacatggagcaggtctgagcccctctgttcaaggctattatgagaagctggagatgagcaagtccagccca ctctgctgacctgcccagaatcaaggtgaccacctctcaggacatgctgagcatatgaaaagctggagttctttgactttctatgacctgaatctgtgtg gcctgactgaggatcctgatctgaggtgtctgcatgagcaccagactgtctgagctgactgagactggggtggaggtgctgctgcttctgcatc tctgtggccaggacctgctggtgtttgaggtgagcagcccctcctgtttgctgtggaccagcagcacaagttctgtttcatgggagggtgtatg acccagagcctga

10

20

【 0 2 9 8 】

さらなる実施形態は、配列番号：232～258および269のいずれかで提供されるC1-INHコード配列に関する。ある実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号：232～258および269のいずれかで提供されるC1-INHコード配列に対して少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも93%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一である配列を含む；独立して、C1-INHは、配列番号：181に対して少なくとも93%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有する。独立してという場合、C1-INHコード配列に対する、提供される配列同一性のいずれかは、配列番号：181の提供される配列同一性のいずれかと組み合わせられ得ることを示す。

30

【 0 2 9 9 】

独立して例示されるセットの例としては、配列番号：236または配列番号：236の塩基1～1500に対して少なくとも90%の配列同一性を有し、配列番号：181に対して少なくとも93%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有するC1-INHをコードする核酸；配列番号：236または配列番号：236の塩基1～1500に対して少なくとも95%の配列同一性を有し、配列番号：181に対して少なくとも93%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有するC1-INHをコードする核酸；および配列番号：236または配列番号：236の塩基1～1500に対して少なくとも99%の配列同一性を有し、配列番号：181の配列に対して少なくとも99%の配列同一性を有するC1-INHをコードする核酸が挙げられる。

40

【 0 3 0 0 】

独立して例示される別のセットの例としては、配列番号：238または配列番号：238の塩基1～1500に対して少なくとも90%の配列同一性を有し、配列番号：181に対して少なくとも93%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有するC1-INHをコードする核酸

50

；配列番号：238または配列番号：238の塩基1～1500に対して少なくとも95%の配列同一性を有し、配列番号：181に対して少なくとも93%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有するC1-INHをコードする核酸；および配列番号：238または配列番号：238の塩基1～1500に対して少なくとも99%の配列同一性を有し、配列番号：181の配列に対して少なくとも99%の配列同一性を有するC1-INHをコードする核酸が挙げられる。

【0301】

独立して例示される別のセットの例としては、配列番号：243または配列番号：243の塩基1～1540に対して少なくとも90%の配列同一性を有し、配列番号：181に対して少なくとも93%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有するC1-INHをコードする核酸；配列番号：243または配列番号：243の塩基1～1540に対して少なくとも93%、少なくとも95%の配列同一性を有し、配列番号：181に対して少なくとも93%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有するC1-INHをコードする核酸；および配列番号：243または配列番号：243の塩基1～1540に対して少なくとも99%の配列同一性を有し、配列番号：181に対して少なくとも99%の配列同一性を有するC1-INHをコードする核酸が挙げられる。

【0302】

ある実施形態では、コードするC1-INHは、配列番号：84～103および259～268のいずれかの配列に対して少なくとも95%、少なくとも97%または100%同一であるシグナルペプチドをコードする配列をさらに含み、独立して、配列番号：192に対して少なくとも93%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有するC1-INHをコードする。

【0303】

ヒトC1-INHタンパク質は十分に特徴付けられており、霊長類を含む様々な種由来の配列は、当技術分野において周知である。様々な配列は、C1-INHの配列多様性を示す。様々なC1-INHタンパク質の例を下表に示す。下表における同一性パーセントはBLASTを用いてデフォルト設定で決定され、列挙される数字は%ペアワイズ同一性である。異なる実施形態では、出願全体を通して提供される同一性パーセントは、デフォルト設定を用いてBLASTを使用して決定され、ペアワイズ同一性(% pairwise identities)を得る。

【0304】

【表2】

種	リファレンス／配列番号	完全長ヒト C1-INH に対する同一性%
ヒト	配列番号：192	100
アカゲザル	タンパク質 ID：703928	93
カニクイザル	タンパク質 ID：XP_005577905.2	93
アフリカンミドリザル	タンパク質 ID：XP_007996463.1	94
チンパンジー	タンパク質 ID：XP_003318026.1	98

【0305】

10

20

30

40

50

【表 3】

種	リファレンス／配列番号	成熟ヒト C1-INH に対する同一性%
ヒト	配列番号：181	100
アカゲザル	タンパク質 ID：703928 成熟配列	92
カニクイザル	タンパク質 ID：XP_005577905.2 成熟配列	92
アフリカンミドリザル	タンパク質 ID：XP_007996463.1 成熟配列	94
チンパンジー	タンパク質 ID：XP_003318026.1 成熟配列	98

10

## 【実施例】

## 【0306】

## 実施例 1 - 発現カセットの概要

C1インヒビター発現カセットをテーブル 1 に示すように設計した。サンプル発現カセットの概要図については図 1 も参照されたい。発現カセットは、P2AリンカーまたはFcドメインの有無にかかわらず、5'および3'隣接AAV逆方向末端反復（ITR）、肝臓特異的ApoE/hAATエンハンサー/プロモーター配列、シグナルペプチド、ヒトC1インヒビターコード配列、およびウシ成長ホルモン（bGH）ポリアデニル化（ポリA）配列を含んでいた。発現カセットのいくつかは、ヒトヘモグロビンサブユニット（HBB2）イントロン、さらなるエンハンサー配列、miRNA結合部位、および/またはRIDD配列をさらに含んでいた。

20

## 【0307】

30

40

50

【表 4】

テーブル1. SERPING1 発現カセット成分

発現カセット	配列 番号	シグナル ペプチド	配列 番号	cDNA	配列 番号	さらなる下 流の制御エ レメント	配列 番号
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_ SERPING1_BGH228	1	SERPING 1	84	SERPING1	232	なし	
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_ SP7.SERPING1_BGH228	2	SP7	85	SERPING1	232	なし	
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_ ALB.SERPING1_BGH228	3	ALB	90	SERPING1	232	なし	
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_ ORM1.SERPING1_BGH228	4	ORM1	91	SERPING1	232	なし	
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_ TF.SERPING1_BGH228	5	TF	92	SERPING1	232	なし	
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_ AMBP.SERPING1_BGH228	6	AMBP	93	SERPING1	232	なし	
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_ LAMP1.SERPING1_BGH228	7	LAMP1	94	SERPING1	232	なし	
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_ BTN2A2.SERPING1_BGH228	8	BTN2A2	95	SERPING1	232	なし	
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_ CD300.SERPING1_BGH228	9	CD300	96	SERPING1	232	なし	
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_ NOTCH2.SERPING1_BGH228	10	NOTCH2	97	SERPING1	232	なし	
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_ STRC.SERPING1_BGH228	11	STRC	98	SERPING1	232	なし	
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_ AHSG.SERPING1_BGH228	12	AHSG	99	SERPING1	232	なし	
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_ SYN1.SERPING1_BGH228	13	SYN1	100	SERPING1	232	なし	
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_ SYN2.SERPING1_BGH228	14	SYN2	101	SERPING1	232	なし	
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_ SYN3.SERPING1_BGH228	15	SYN3	102	SERPING1	232	なし	
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_ SYN4.SERPING1_BGH228	16	SYN4	103	SERPING1	232	なし	
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_ SERPING1coI2_BGH228	17	SERPING 1	259	SERPING1c oI2	233	なし	

10

20

30

40

50

発現カセット	配列番号	シグナルペプチド	配列番号	cDNA	配列番号	さらなる下流の制御エレメント	配列番号
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co13_BGH228	18	SERPING1	260	SERPING1co13	234	なし	
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co14_BGH228	19	SERPING1	261	SERPING1co14	235	なし	
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co17_BGH228	20	SERPING1	262	SERPING1co17	236	なし	
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co120_BGH228	21	SERPING1	263	SERPING1co120	237	なし	
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_BGH228	22	SERPING1	264	SERPING1co21	238	なし	
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co124_BGH228	23	SERPING1	265	SERPING1co124	239	なし	
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1coH9_BGH228	24	SERPING1	266	SERPING1coH9	240	なし	
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1coH13_BGH228	25	SERPING1	267	SERPING1coH13	241	なし	
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1coBC2_BGH228	26	SERPING1	268	SERPING1coBC2	242	なし	
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1coI21(-RIDD)_BGH228	27	SERPING1	269	SERPING1coI21(-RIDD)	243	なし	
pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1coI21_BGH228	28	SERPING1	264	SERPING1co21	238	なし	
pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1coI24_BGH228	29	SERPING1	265	SERPING1coI24	239	なし	
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_Δ76.SERPING1_BGH228	30	SERPING1	84	Δ76.SERPING1	244	なし	
AAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_Δ98.SERPING1_BGH228	31	SERPING1	84	Δ98.SERPING1	245	なし	
pSwap_ApoE_hAATv18_HBB2m1_SERPING1coI21_BGH228	32	SERPING1	264	SERPING1co21	238	なし	
pSwap_ApoE_hAATv18_HBB2m1_SERPING1coI24_BGH228	33	SERPING1	265	SERPING1coI24	239	なし	
pSwap_2xApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_BGH228	34	SERPING1	264	SERPING1co21	238	なし	

10

20

30

40

50

発現カセット	配列 番号	シグナル ペプチド	配列 番号	cDNA	配列 番号	さらなる下 流の制御エ レメント	配列 番号
pSwap_4xApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_BGH228	35	SERPING 1	264	SERPING1c o21	238	なし	
pSwap_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_2xApoE_BGH228	36	SERPING 1	264	SERPING1c o21	238	2xApoE	75
pSwap_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_4xApoE_BGH228	37	SERPING 1	264	SERPING1c o21	238	4xApoE	76
pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_hAATenh_BGH228	38	SERPING 1	264	SERPING1c o21	238	hAATenh	173
pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_hAATenh(co1)_BGH228	39	SERPING 1	264	SERPING1c o21	238	hAATenh(co1)	174
pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_WPRE3_BGH228	40	SERPING 1	264	SERPING1c o21	238	WPRE3	175
pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_WPRE3co1_BGH228	41	SERPING 1	264	SERPING1c o21	238	WPRE3co1	176
pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_WPRE_BGH228	42	SERPING 1	264	SERPING1c o21	238	WPRE	177
pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_WPREco1_BGH228	43	SERPING 1	264	SERPING1c o21	238	WPREco1	178
pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1(ATG)_SERPING1co21_BGH228	44	SERPING 1	264	SERPING1c o21	238	なし	
pSwap_ApoE_hAAT_SERPING1co21(イントロン1-2, 2-3)_BGH228	45	SERPING 1	264	SERPING1c o21(イント ロン1-2, 2- 3)	246	なし	
pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21(イントロン2-3)_BGH228	46	SERPING 1	264	SERPING1c o21(イント ロン2-3)	247	なし	

10

20

30

40

50

発現カセット	配列番号	シグナルペプチド	配列番号	cDNA	配列番号	さらなる下流の制御エレメント	配列番号
pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21(イントロン3-4)_BGH228	47	SERPING1	264	SERPING1co21(イントロン3-4)	248	なし	
pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21.P2A.SERPING1co24_BGH228	48	SERPING1co21.P2A.SERPING1co24 (配列番号：158)				なし	
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1.Fc_BGH228	49	SERPING1	84	SERPING1.Fc	250	なし	
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1.Fc(Ishino)_BGH228	50	SERPING1	84	SERPING1.Fc(Ishino)	251	なし	
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1.Fc(Ying)_BGH228	51	SERPING1	84	SERPING1.Fc(Ying)	252	なし	
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1.Fc(YTE)_BGH228	52	SERPING1	84	SERPING1.Fc(YTE)	253	なし	
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1.Fc(LS)_BGH228	53	SERPING1	84	SERPING1.Fc(LS)	254	なし	
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1.Fc(IFL)_BGH228	54	SERPING1	84	SERPING1.Fc(IFL)	255	なし	
pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_(4x mir-142-3p)_BGH228	55	SERPING1	264	SERPING1co21	238	4x mir-142-3p	179
pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_BGH228 (-ORFs)	56	SERPING1	264	SERPING1co21(-ORFs)	256	なし	
pSwap_ApoE_hAAT_SERPING1co21(SERPING1 5'UTR)_BGH228	57	SERPING1	264	SERPING1co21	238	(SERPING1 5'UTR)	180
pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21(イントロン2-3)_BGH228 - SINES_LINES	58	SERPING1	264	SERPING1co21(イントロン2-3)(SINES_LINES)	257	なし	

10

20

30

40

50

発現カセット	配列番号	シグナルペプチド	配列番号	cDNA	配列番号	さらなる下流の制御エレメント	配列番号
pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21(イントロン3-4)_BGH228 – SINES_LINES	59	SERPING1	264	SERPING1co21(イントロン3-4)(SINES_LINES)	172	なし	
pSwap_ApoE_hAAT_SERPING1co21(SERPING1APRE/5'UTR)_BGH228	60	SERPING1	264	SERPING1co21	238	SERPING1APRE/5'UTR	181
pSwap_ApoE_hAAT_(SERPING1 APRE) HBB2m1_SERPING1co21_BGH228	61	SERPING1	264	SERPING1co21	238	SERPING1APRE	182
pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_BGH228 (SAA2 5'UTR)	62	SERPING1	264	SERPING1co21	238	SAA2 5'UTR	183
pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_BGH228 (SAA2 3' UTR)	63	SERPING1	264	SERPING1co21	238	SAA2 3' UTR	184
pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_BGH228 (SAA2 5'&3' UTR)	64	SERPING1	264	SERPING1co21	238	SAA2 5'&3' UTR	183, 184
pSwap_ApoE_hAAT(APRE-SAA2)_HBB2m1_(SAA2 5')SERPING1co21_BGH228	65	SERPING1	264	SERPING1co21	238	SAA2 5'	183
pSwap_(2x ADRES)ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_BGH228	66	SERPING1	264	SERPING1co21	238	なし	
pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21(+RIDD1x)_BGH228	67	SERPING1	264	SERPING1co21	238	RIDD1x	185
pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21(+RIDD3x)_BGH228	68	SERPING1	264	SERPING1co21	238	RIDD3x	186
pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21(+RIDD1xBlos)_BGH228	69	SERPING1	264	SERPING1co21	238	RIDD1xBlos	187

10

20

30

40

pAAV = 5' ITR 配列番号 : 70、3' ITR 配列番号 : 71 ; pSWAP = 5' ITR 配列番号 : 72、3' ITR 配列番号 : 73 ; ApoE = 配列番号 : 225、74~76 ; SSA2 APRE = 配列番号 : 77 ; 2x ADRES = 配列番号 : 78 ; hAAT = 配列番号 : 79 ; hAATv18 = 配列番号 : 80 ; HBB2m1 = 配列番号 : 81 ; HBB2m1 (-ATG) = 配列番号 : 82 ; BGH228 = 配列番号 : 83。

【 0 3 0 8 】

発現カセットは、AAVカプシド、例えば、国際特許出願公開WO 2016/210170に記載されるAAV-4-1カプシド変異体（その内容はその全体が参照により本明細書に組み込

50

まれる)、またはLK03カプシド変異体(その内容はその全体が参照により本明細書に組み込まれる)にカプシド化されることにより、AAVウイルス粒子にパッケージングされる。ウイルス粒子は、一般に、当技術分野で周知の三重トランスフェクションプロトコルを使用して生成される。

【0309】

実施例2 - AAV中でカプシド化されたSERPING1発現ベクターのベクター効力の2用量でのC57BL/6Jマウスにおける評価

目的

肝臓からの分泌が改善されたSERPING1導入遺伝子を開発するための努力において、最初のin vitroスクリーニング試験から選択された天然および合成ペプチドのパネルで、内因性SERPING1シグナルペプチドを置換した。天然に存在するシグナルペプチドは、-2-HS-糖タンパク質(AHSG)およびキモトリプシノーゲンB2(sp7)のものに相当し、合成1(合成1)および合成4(合成4)と称される合成ペプチドは、合理的設計によって誘導された。C57BL/6Jマウスにおいて非GLP試験を実施し、静脈内注射(ベクター配列番号: 1、13、16、12、および2)により2用量で異なるシグナルペプチド配列を有する5つのSERPING1発現ベクターの効力を評価した。

10

【0310】

試験には、11~12週齢の100匹の雄性C57BL/6J野生型マウスが含まれた。天然ヒトSERPING1シグナルペプチドに対して、ヘテロシグナルペプチドを含む4つの候補カセットをベンチマークした。すべての発現カセットは、天然のSERPING1 cDNA配列を含んでいた。5つのベクターに共通であったカセットの他の調節エレメントには、アポリポタンパク質E肝臓制御領域1(ApoE HCR-1)エンハンサー、ヒト-1アンチトリプシン(hAAT)プロモーター、改変ヒトヘモグロビン(HBB)由来合成イントロン(HBB2)、およびCpG減少ウシ成長ホルモン(bGH)ポリアデニル化(ポリA)シグナル配列が含まれた。生物工学的に作製したAAVカプシド中に全てのカセットをパッケージングした。この研究において利用されるベクターは、以下のテーブル2に詳述される。低用量(1.0 x 10<sup>12</sup> vg/kg)または高用量(4.0 x 10<sup>12</sup> vg/kg)の特定のベクターをマウス(n = 10~11/群)に注射した(テーブル3)。群7~11(低用量コホート)について18週間にわたって、または群1~5(高用量コホート)について28週間にわたって動物をモニタリングした。テーブル4に詳述するように、ヒトC1-INH抗原レベル、C1-INH活性、および肝臓形質導入を評価した。

20

30

【0311】

【表5】

テーブル2: 本試験で評価した5つのベクターの特性

SERPING1 配列	ベクター配列番号	シグナルペプチド(sp)	sp 長(bp)
天然 <i>SERPING1</i> cDNA 配列番号: 104; シグナルペプチドコード配列(配列番号: 232)なし	1	SERPING1	66
	13	Syn1	63
	16	Syn4	66
	12	AHSG	54
	2	sp7	54

40

【0312】

50

## 【表 6】

テーブル 3 : 群指定および用量レベル

用量(vg/kg) <sup>a</sup>	ベクター配列番号	群	雄の匹数
4.0x10 <sup>12</sup>	1	1	10
	13	2	10
	16	3	10
	12	4	10
	2	5	10
1.0x10 <sup>12</sup>	1	7	10
	13	8	10
	16	9	11
	12	10	10
	2	11	11

<sup>a</sup> 25g と想定されるマウス体重に基づいて、ベクター用量を推定した。

## 【 0 3 1 3 】

## 【表 7】

テーブル 4 : 実施された分析

分析	パラメータ	アッセイ	時点
循環ヒト C1-INH	血漿中ヒト C1-INH 抗原	ELISA (キットベース およびカスタム)	キットベース : 3, 6, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 25, お よび 27 週目 カスタム : 8, 28 週目
機能的ヒト C1-INH	血漿中ヒト C1-INH 活性	酵素的	22, 25, 27 週目 (高用量コホートののみ)
肝臓形質導入	肝臓中ベクターゲノム 濃度	qPCR	終点 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> 終点は、低用量コホート (1.0×10<sup>12</sup> vg/kg、群 7~11) については 18 週目、高用量コホート (4.0×10<sup>12</sup> vg/kg、群 1~5) については 28 週目と定義した。

ELISA、酵素結合免疫吸着アッセイ ; qPCR、リアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応。

## 【 0 3 1 4 】

## 結果

## マウス血漿中のヒト C1-INH 抗原レベル

10

20

30

40

50

SERPING1発現カセットによってコードされるタンパク質の産生および分泌を評価するために、18週目（低用量コホート、群7～11）または第28週目（高用量コホート、群1～5）のいずれかに、研究の終了まで3週目に開始する低用量（ $1.0 \times 10^{12}$  vg/kg）または高用量（ $4.0 \times 10^{12}$  vg/kg）の5つのベクターの1つを投与した動物の血漿中のC1-INH抗原レベルを評価した。

【0315】

C1-INHキットベースのELISAキット（Molecular Innovations、#HC1INHKIT-TOT）を用いて、また、検出のために抗ヒトC1-INH IgG（Affinity Biologicals、#GACINH-AP）および抗ヒトC1-INH HRPコンジュゲートIgG（Affinity Biologicals、#GACINH-HRP）でコーティングされたプレートを使用するカスタムサンドイッチ型ELISA捕捉アッセイを用いて、抗原レベルを定量した。

10

【0316】

用量にかかわらず、AAVカプシド化された配列番号：1（群7、低用量コホート、または群1、高用量コホート）を投与されたマウスは、すべての他の群と比較して、検出可能なヒトC1-INH抗原の最も高い平均レベルを一貫して発現した（図2）。低用量コホートでは、AAVカプシド化された配列番号：1で処置したマウスのみが、プールされた正常ヒト血漿よりも一貫して高いC1-INHレベルを有した。逆に、高ベクター用量での全てのシグナルペプチド変異体の投与は、ベクター投与後少なくとも28週間、持続した生理学的レベルを超える血漿C1-INHのレベルをもたらした。6か月の実験にわたって、発現レベルは正常よりも9倍高く、罹患率または死亡率は観察されなかった。

20

【0317】

評価された時点にわたって平均抗原レベルに有意差がないと定義される定常状態C1-INH抗原レベル（線形回帰分析、示されない）は、両方のベクター用量でAAVカプシド化された配列番号：13、16、および12を投与された動物と比較して、AAVカプシド化された配列番号：1を投与した動物において有意に高かった（図3）。AAVカプシド化された配列番号：1にて低用量および高用量で処置された動物において、血漿中の平均±標準偏差ヒトC1-INHレベルはそれぞれ、 $315.01 \pm 32.98$  μg/mLおよび $1321.79 \pm 302.97$  μg/mLで安定したままであった；これらの定常状態レベルは、両方の用量コホートにわたって、全ての他のコンストラクトと比較して、血漿C1-INH抗原の1.58～3.27倍高いレベルに相当した。

30

【0318】

まとめると、天然SERPING1シグナルペプチド（AAVカプシド化された配列番号：1）を含むベクターカセットは、用量にかかわらず、C1-INH抗原の産生および分泌に関して、*in vivo*で他の4つのベクターよりも優れていた。

【0319】

マウス血漿中のヒトC1-INHの活性

血漿中のヒトC1-INH機能を評価するために、Technochrom C1-INHキットの改良版（Diapharma、5345003）を用いて、22週目、25週目、および27週目に、発色アッセイにより、高用量コホート（群1～5）からの試料を活性について試験した。定量において、血漿C1-INHを過剰のC1-エステラーゼに対して滴定し、残留C1-エステラーゼ活性を測定した。活性レベルは、凝集参照標準に対する活性のパーセンテージとしてレポートした。

40

【0320】

定常状態ヒトC1-INH活性レベルは、他のシグナルペプチド変異体と比較して、AAVカプシド化された配列番号：1を投与された動物において有意に上昇した（ $p < 0.0001$ ）（図4）。 $4.0 \times 10^{12}$  vg/kgのAAVカプシド化された配列番号：1を投与された動物における活性レベルは、766.30%活性の定常状態に達した。さらに、ヒトC1-INH活性は、抗原レベルと正の相関を有し、直接的な線形関係を示し、機能的C1-INHが産生されたことを示唆した（ピアソン  $r = 0.8778$ 、 $p < 0.0001$ 、 $R^2 = 0.771$ ）（図5）。

【0321】

50

### 肝臓組織中の正規化ベクターゲノム濃度 - qPCR

静脈内AAVベクター投与後の標的組織形質導入を評価するために、リアルタイム定量PCR (qPCR) アッセイを用いて、ベクターゲノム濃度について終点の肝臓試料を分析した。QIAamp Fast DNA Tissue Kit (Qiagen、カタログ番号51404) を使用する改良DNA抽出法を用いて、終点の肝臓試料からDNAを抽出した。

#### 【0322】

bGHポリAシグナルは、すべての候補発現カセットの成分であったため、AAV標的として選択した。マウスフォークヘッドボックスP1 (Foxp1) を標的とし、試料間のゲノムDNA濃度を測定し、非生物学的変異を除去した。bGHポリAの最終コピー数をFoxp1に対して正規化し、Foxp1コピー当たりのbGHポリAコピーとしてレポートした(図6)。予想通り、末端肝臓におけるベクターゲノムコピーは、より高ベクター用量を投与された動物において、より低ベクター用量と比較してより大きかった(図5)。両方の用量コホートにおいて、AAVカプシド化された配列番号: 1を投与された動物は、AAVカプシド化された配列番号: 16および12を投与された動物と比較して有意に高いレベルで、標的組織における最も高い平均ベクターゲノム濃度を一貫して示した。さらに、C1-INH抗原レベルは、両方の用量コホートにわたって相対的なベクターゲノムコピーと正の相関を有し、これらの2つのパラメータ間の予想される直接的な関係を実証した(ピアソン  $r = 0.9306$ 、 $p < 0.0001$ 、 $R^2 = 0.866$ ) (図7)。

10

#### 【0323】

### シグナルペプチド変異体のベクター効力

シグナルペプチド変異体の効力を比較するために、低ベクター用量コホートおよび高ベクター用量コホートの両方において、終点の肝臓ベクターゲノムコピーに対して定常状態C1-INH抗原レベルを正規化した(図8)。低ベクター用量群において動物間でのベクター効力の差異は観察されなかったが、高ベクター用量のAAVカプシド化された配列番号: 16を投与された動物は、AAVカプシド化された配列番号: 1と比較して、正規化定常状態C1-INH抗原レベルの増加を示した; AAVカプシド化された配列番号: 1についてのベクターゲノムコピーの変動性は、観察された効力の差異に寄与しているかもしれない。

20

#### 【0324】

### 結論

本試験では、独自のシグナルペプチドコード配列を含む5つの候補発現カセットに由来するC1-INH抗原レベル、C1-INH活性、およびベクターゲノムコピーを評価した。試験した5つのベクターのうち、その導入遺伝子カセット中に天然ヒトSERPING1シグナルペプチドコード配列を含むベクター(AAVカプシド化された配列番号: 1; 群7および群1)は、用量にかかわらず、最も高い定常状態C1-INH抗原、C1-INH活性レベル、および終点ベクターゲノム濃度を示した。効力の差は最小であったため、結果は、野生型マウスにおけるAAVカプシドの文脈において、AAVカプシド化された配列番号: 1が、他のシグナルペプチドを含有するベクターと比較して最も強い応答を有したことを示す。

30

#### 【0325】

### 実施例3 - AAV中でカプシド化された最適化SERPING1発現ベクターの単回用量でのC57BL/6Jマウスにおけるベクター効力の評価

40

#### 目的

2つの非GLP試験(AおよびB)をC57BL/6Jマウスにおいて実施し、静脈内注射により13種類の独自のヒトSERPING1発現ベクターのベクター効力を評価した。SERPING1導入遺伝子変異体は、コドン最適化(Integrated DNA Technologies (IDT) Codon Optimization Tool, Codon Harmonizer, and Best Codon scripts) およびトランケーション戦略(テーブル5)を用いて作製した。選択された変異体は、in vitroスクリーニング試験において高いC1-INH分泌を以前に示した。

#### 【0326】

2つの試験は、9~10週齢の合計80匹の雄性C57BL/6J野生型マウスを含んだ。天然

50

ヒトSERPING1 cDNA配列に対して12種類の候補カセットを評価した。すべてのベクターにおいて維持されたカセットの他の制御エレメントは、アポリポタンパク質E肝臓制御領域1 (ApoE HCR-1) エンハンサー、ヒト  $\alpha$ -1アンチトリプシン (hAAT) プロモーター、改変ヒトヘモグロビン (HBB) 由来合成イントロン (HBB2)、およびCpG減少ウシ成長ホルモン (bGH) ポリアデニル化 (ポリA) シグナル配列を含んでいた。生物工学的に作製したAAVカプシド中に全てのカセットをパッケージングした。各群当たり5匹の動物に  $1.0 \times 10^{12}$  vg/kgの特定のベクターを注射し (テーブル6およびテーブル7)、試験Aでは7週間、試験Bでは6週間かけてモニタリングした。ヒトC1-INH抗原、ブラジキニン抗原、およびベクターゲノム濃度をテーブル8に詳述するように評価した。

【0327】

10

【表8】

テーブル5：試験Aおよび試験Bにおいて評価された13のベクターの特性

ベクター配列番号	cDNA	導入遺伝子改変	コドン最適化スクリプト
1	SERPING1	-	-
18	I3	コドン最適化	IDT
19	I4	コドン最適化	IDT
20	I7	コドン最適化	IDT
21	I20	コドン最適化	IDT
22	I21	コドン最適化	IDT
23	I24	コドン最適化	IDT
17	I2	コドン最適化	IDT
24	H9	コドン最適化	ハーモナイズ
25	H13	コドン最適化	ハーモナイズ
26	BC2	コドン最適化	最適コドン
30	$\Delta$ 76	5'末端から76アミノ酸切断	-
31	$\Delta$ 98	5'末端から98アミノ酸切断	-

20

30

【0328】

40

50

## 【表 9】

テーブル6：試験Aの群指定および用量レベル

群	ベクター配列 番号	動物の引数 (雄)	用量レベル (vg/kg)	用量濃度 (vg/マウス) <sup>a</sup>
1	1	5	1.0x10 <sup>12</sup>	2.5x10 <sup>10</sup>
2	18	5	1.0x10 <sup>12</sup>	2.5x10 <sup>10</sup>
3	19	5	1.0x10 <sup>12</sup>	2.5x10 <sup>10</sup>
4	20	5	1.0x10 <sup>12</sup>	2.5x10 <sup>10</sup>
5	21	5	1.0x10 <sup>12</sup>	2.5x10 <sup>10</sup>
6	22	5	1.0x10 <sup>12</sup>	2.5x10 <sup>10</sup>
7	23	5	1.0x10 <sup>12</sup>	2.5x10 <sup>10</sup>
8	賦形剤	5	n/a	n/a

<sup>a</sup> vg/kg ベクター用量は、25g の推定マウス体重に基づいて推定した。

10

20

## 【0329】

## 【表 10】

テーブル7：試験Bの群指定および用量レベル

群	ベクター配列 番号	動物の引数 (雄)	用量レベル (vg/kg)	用量濃度 (vg/マウス) <sup>a</sup>
1	1	5	1.0x10 <sup>12</sup>	2.5x10 <sup>10</sup>
2	17	5	1.0x10 <sup>12</sup>	2.5x10 <sup>10</sup>
3	24	5	1.0x10 <sup>12</sup>	2.5x10 <sup>10</sup>
4	25	5	1.0x10 <sup>12</sup>	2.5x10 <sup>10</sup>
5	26	5	1.0x10 <sup>12</sup>	2.5x10 <sup>10</sup>
6	30	5	1.0x10 <sup>12</sup>	2.5x10 <sup>10</sup>
7	31	5	1.0x10 <sup>12</sup>	2.5x10 <sup>10</sup>
8	賦形剤	5	n/a	n/a

<sup>a</sup> vg/kg ベクター用量は、25g の推定マウス体重に基づいて推定した。

30

40

## 【0330】

50

## 【表 1 1】

テーブル 8 : 実施された分析

分析	パラメータ	アッセイ	時点
血漿中循環ヒト C1-INH	ヒト C1-INH 抗原	ELISA	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 週目 <sup>a</sup>
血漿中循環ブラジキニン	ブラジキニン抗原	ELISA	7 週目 <sup>a</sup>
肝臓形質導入	肝臓中ベクターゲノム濃度	qPCR	終点 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> 時点は試験 A のみで評価した。血漿中循環血漿中ブラジキニンについては、試験 A の群 4、6、および 8 のみを分析に含めた。

<sup>b</sup> 終点は、試験 A については 7 週目、試験 B については 6 週目と定義した。ELISA、酵素結合免疫吸着アッセイ；qPCR、定量的ポリメラーゼ連鎖反応。

10

## 【0 3 3 1】

20

## 結果

## 血漿中 C1-INH 抗原

改変（コドン最適化または切断）SERPING1 発現カセットからの C1-INH 抗原の *in vivo* 産生を評価するために、ELISA（Molecular Innovations、#HC1INHKIT-TOT）によって循環 C1-INH 抗原レベルを評価した。ベクター投与の 1 週間後に C1-INH 抗原評価を開始し、試験終了まで毎週継続した。

## 【0 3 3 2】

試験 A における候補ベクターは、一般に、試験 B と比較してより高いレベルの血漿 C1-INH 抗原を生じ、実施例 3 の焦点である。ベクター投与後、平均血漿 C1-INH レベルはほとんどの群において 3 週目（±1 週）前後にピークに達し、その後低下した（図 9）。3 週目（±1 週）の最高ピーク抗原レベルは、AAV カプシド化された配列番号：22 を投与されたマウスにおいて、 $722.31 \pm 242.03 \mu\text{g/mL}$  の平均 ± 標準偏差に達した。AAV カプシド化された配列番号：22、23、20、および 18 を投与されたマウスは、親カセット（AAV カプシド化された配列番号：1）と比較して、試験の過程を通して、類似のまたはより高いレベルの血漿 C1-INH を示した；ベクターはまた、2 週目までにプールされた正常ヒト血漿の平均 ± 標準偏差レベル（ $179.2 \pm 20.88 \mu\text{g/mL}$ ）を超え、試験の期間にわたって持続した。

30

## 【0 3 3 3】

試験 A では、AAV カプシド化された配列番号：22、または AAV カプシド化された配列番号：23 のいずれかを投与された動物における相対的定常状態（すなわち、試験したすべての時点にわたって平均抗原レベルに有意差なし、一元配置分散分析は示さない）C1-INH 抗原レベルは、AAV 化された配列番号：1 を投与された動物よりも有意に大きかった（それぞれ、1.75 倍および 1.3 倍大きい）（図 9）。

40

## 【0 3 3 4】

試験 B では、定常状態 C1-INH 抗原レベルは、AAV カプシド化された配列番号：1 と比較して、コドン最適化 SERPING1 変異体を含有する AAV ベクターを投与された動物において類似していた（図 9）。しかしながら、AAV カプシド化された配列番号：24 を投与された動物は、AAV カプシド化された配列番号：1 と比較して、定常状態 C1-INH 抗原レベルの 50% の減少を示した（それぞれ、 $237.10 \pm 55.88 \mu\text{g/mL}$  に対して  $119.89 \pm 69.29 \mu\text{g/mL}$ ）。C1-INH レベルの初期ピークは、ほとんどの群において 3 週目お

50

よび4週目前後に観察され、続いて抗原レベルの低下が観察された(図10)。3週目および4週目の最高ピーク抗原レベルは、AAVカプシド化された配列番号:17を投与されたマウスにおいて $299.19 \pm 110.92 \mu\text{g/mL}$ の平均 $\pm$ 標準偏差に達し、続いてAAVカプシド化された配列番号:25群において $289.45 \pm 56.12 \mu\text{g/mL}$ に達した。両方の変異体は、親カセット( $287.32 \pm 76.21 \mu\text{g/mL}$ )と比較して、C1-INH抗原のより高い平均 $\pm$ 標準偏差ピークレベルを示した。試験Aと同様に、循環C1-INHレベルの増加は、抗原レベルの最初の低下後、いくつかの群において観察された。試験終了時に、C1-INH抗原の最高平均 $\pm$ 標準偏差レベルは、AAVカプシド化された配列番号:17において $347.69 \pm 139.64 \mu\text{g/mL}$ であり、AAVカプシド化された配列番号:25群において $297.57 \pm 56.74 \mu\text{g/mL}$ であった。これらの群におけるピークC1-INHレベルは、親カセットおよびPNP値の両方を超えたが、試験Bにおいて観察された最高抗原レベルは、試験Aにおいて3番目に高いC1-INH発現変異体によって示されたものよりも低かった。切断型SERPING1変異体(76および98)を含有するAAVベクターを投与された動物において、C1-INH抗原のレベルは低下し、研究終了まで4週目からの定量限界未満のままであった。

10

#### 【0335】

まとめると、いくつかのコードン最適化SERPING1発現変異体の投与は、両方の研究ならびにプールされた正常ヒト血漿範囲にわたって、親カセットよりも1.13~1.75倍高い定常状態C1-INH抗原レベルをもたらした。両方の試験を通して、研究AからのAAVカプシド化配列番号:22、AAVカプシド化配列番号:23、およびAAVカプシド化配列番号:20は、最高レベルの血漿C1-INH抗原を示した。

20

#### 【0336】

##### 血漿中のブラジキニン濃度

C1-INHの下流効果を評価するために、試験終了時にELISA(Enzo Life Sciences、製品#ADI-900-206、室温)によって血漿ブラジキニンを評価した。7週目にて、より高いレベルのC1-INH抗原を有する、AAVカプシド化された配列番号:22および20(試験A)の2つの変異体においてブラジキニンを測定した。

#### 【0337】

試験終了時にて、循環ブラジキニンレベルは、AAVカプシド化された配列番号:22または20のいずれかを投与されたマウスにおいて有意に低下し、賦形剤処置マウスにおいては血漿ブラジキニンの3%未満のレベルに達した(図11)。予想通り、血漿ブラジキニン濃度は、血漿C1-INHと逆相関し、AAVカプシド化された配列番号:22群(ピアソン  $r = -0.9417$ 、 $p < 0.0168$ 、 $R^2 = 0.8867$ )において、AAVカプシド化された配列番号:20群(ピアソン  $r = -0.6383$ 、 $p = \text{ns}$ 、 $R^2 = 0.4074$ )と比較して、より強い逆相関が観察された。まとめると、ヒトC1-INHの持続的な超生理的レベルは、野生型マウスにおける血漿ブラジキニンの有意な減少と関連していた。

30

#### 【0338】

##### 肝組織中の正規化ベクターゲノム濃度

静脈内AAVベクター投与後の標的組織形質導入を評価するために、リアルタイム定量PCR(qPCR)アッセイを用いて、終点の肝臓試料中のベクターゲノム濃度を評価した。共有ポリアデニル化シグナル(bGHポリA)のコピー数を、マウスFoxp1遺伝子のコピーに対して正規化した。

40

#### 【0339】

AAVカプシド化された配列番号:1と試験Aにおける6つのコードン最適化変異体との間で、末端における正規化ベクターゲノム濃度に統計的差異はなかった(図12A)。

#### 【0340】

試験Bでは、AAVカプシド化配列番号:1と6つのコードン最適化または切断SERPING1変異体との間の終点の平均肝臓ベクターゲノムコピーは、AAVカプシド化された配列番号:24および17群において、それぞれ、Foxp1コピーあたり $0.0388 \sim 0.0936$ のbGHpAコピーの範囲であった。AAVカプシド化配列番号:17群に続いて、ベクターゲ

50

ノム濃度は、AAVカプシド化配列番号：1および26（それぞれ、Foxp1コピー当たり0.0829および0.0785のBGHPAコピー）を投与された動物において最も高かった。すべてのSERPING1発現ベクター間で、終点での正規化ベクターゲノム濃度に統計的差異はなかった（図12B）。AAVカプシド化された配列番号：30および31を投与された動物における終点ベクターゲノム濃度（それぞれ0.0417および0.0606）は、肝臓形質導入が起こり、試験における残りのベクターに匹敵することを示した。AAVカプシド化された配列番号：30および31は、より低いレベルの循環C1EIを提供した（データは示されない）。

#### 【0341】

C1-INH抗原と相対的ベクターゲノムコピーとの間の正の相関は、AAVカプシド化された配列番号：1、および最も高いC1-INH抗原発現を有するコドン最適化変異体（配列番号：20、22、および23）について観察され（ピアソン  $r = 0.8510$ 、 $p < 0.0001$ 、 $R^2 = 0.7243$ ）、これらの2つのパラメータ間の直接的な関係を実証した（図13）。

10

#### 【0342】

コドン最適化変異体のベクター効力

ベクター効力に対するコドン最適化の効果を評価するために、定常状態C1-INH抗原レベルを、終点の肝臓試料におけるベクターゲノムコピーに対して正規化した（図14）。AAVカプシド化された配列番号：21を投与されたマウスを除いて、親カセット（AAVカプシド化された配列番号：1）と試験Aにおけるコドン最適化変異体との間でベクター効力の差異は観察されなかった；AAVカプシド化された配列番号：21を投与されたマウスは、ベクター効力の減少を示した。

20

#### 【0343】

結論

まとめると、コドン最適化SERPING1導入遺伝子のAAV介在性送達は、野生型マウスにおける機能的C1-INHのレベルの上昇および持続をもたらした。

#### 【0344】

実施例4 - Serping1ノックアウトマウスにおけるAAV中でカプシド化されたコドン最適化SERPING1ベクターの用量範囲評価

目的

30

129/S5x C57BL/6J-Tyrc-Brd (Serping1<sup>-/-</sup>またはC1-INHノックアウトまたはC1-INHヌル) マウスにおいて非GLP試験を実施し、静脈内注射により疾患モデルにおけるコドン最適化ヒトSERPING1発現ベクター（AAVカプシド化配列番号：20）のベクター効力を3用量で評価した。

#### 【0345】

本試験は、13~18週齢の20匹の雄性および19匹の雌性C1-INHノックアウトマウスを含んだ。群当たり最大5匹のラットに3用量（ $1.0 \times 10^{12}$  vg/kg、 $4.0 \times 10^{12}$  vg/kg、または $1.0 \times 10^{13}$  vg/kg）の1つのAAVカプシド化された配列番号：20を注射した（テーブル9）。コドン最適化導入遺伝子に加えて、カセットの制御エレメントは、アポリタンパク質E肝臓制御領域1（ApoE HCR-1）エンハンサー、ヒト  $\alpha$ -1アンチトリプシン（hAAT）プロモーター、改変ヒトヘモグロビン（HBB）由来合成イントロン（HBB2）、およびCpG減少ウシ成長ホルモン（bGH）ポリアデニル化（polyA）シグナル配列を含んでいた。カセットをAAV-4-1カプシドにパッケージングした。8週間にわたって動物をモニターした。テーブル10に詳述するように、血漿C1-INH抗原レベル、C1-INH活性、肝臓ベクターゲノム濃度、およびSERPING1 mRNA発現を評価した。

40

#### 【0346】

50

## 【表 1 2】

テーブル 9 : 群指定および用量レベル

性	群	ベクター配列	動物の匹数	投与時のおおよその年齢 (週齢)	用量レベル (vg/kg)	用量濃度 (vg/マウス) <sup>a</sup>
雄	1	配列番号 : 20	3	18	1.0x10 <sup>12</sup>	2.5x10 <sup>10</sup>
	2	配列番号 : 20	5	16	4.0x10 <sup>12</sup>	1.0x10 <sup>11</sup>
	3	配列番号 : 20	5	16	1.0x10 <sup>13</sup>	4.0x10 <sup>11</sup>
	4	賦形剤	1	14	n/a	n/a
	5	配列番号 : 20	2	13	1.0x10 <sup>12</sup>	2.5x10 <sup>10</sup>
	6	賦形剤	4	13	n/a	n/a
雌	7	配列番号 : 20	5	14-16	1.0x10 <sup>12</sup>	2.5x10 <sup>10</sup>
	8	配列番号 : 20	5	13-14	4.0x10 <sup>12</sup>	1.0x10 <sup>11</sup>
	9	配列番号 : 20	5	13	1.0x10 <sup>13</sup>	4.0x10 <sup>11</sup>
	10	賦形剤	4	13	n/a	n/a

<sup>a</sup> vg/kg ベクター用量は、25g の推定マウス体重に基づいて推定した。

n/a、該当なし。

## 【 0 3 4 7 】

## 【表 1 3】

テーブル 10 : 実施された分析

分析	パラメータ	アッセイ	時点
血漿中循環ヒト C1-INH	ヒト C1-INH 抗原	ELISA (キットベースおよびカスタム)	キットベース : 1, 4, および 5 週目 カスタム : 6, 7, および 8 週目
血漿中機能的ヒト C1-INH	ヒト C1-INH 活性	酵素的	5, 8 週目
肝臓形質導入	ベクターゲノム濃度	qPCR	終点 <sup>a</sup>
肝臓中 AAV 転写	mRNA 発現レベル	RT-qPCR	終点 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> 終点を第 8 週と定義した。

AAV、アデノ随伴ウイルス ; C1-INH、C1 インヒビター ; ELISA、酵素結合免疫吸着アッセイ ; qPCR、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 ; RT-qPCR、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応。

## 【 0 3 4 8 】

## 結果

10

20

30

40

50

### 血漿中C1-INH抗原

実施例 2 に記載されるように、キットベースのELISAおよびカスタムサンドイッチ型ELISA捕捉アッセイを使用して、C1-INH抗原レベルを定量した。

#### 【0349】

注射の1週間後に開始したELISAによって循環C1-INH抗原を評価し、4週目から8週目（試験終了）まで毎週モニターした。4週目～8週目の雌雄マウスにおいて平均血漿C1-INH抗原レベルの用量依存的増加が観察された（図15）。中（ $4.0 \times 10^{12}$  vg/kg）および高（ $1.0 \times 10^{13}$  vg/kg）ベクター用量では、すべての動物が4週目までに検出可能なC1-INHのレベルを示した。性別にかかわらず、中用量または高用量のベクターを投与されたマウスは、4週目までに、プールされた正常ヒト血漿（PNP；平均±標準偏差 =  $175.4 \pm 41.3$  μg/mL）以上の平均血漿中C1-INHレベルを示し、試験終了まで持続した。雄性マウスは、中および高ベクター用量で、雌性マウスと比較してより高い平均抗原レベルを示し、これは、雌性マウスと比較した雄性マウスにおけるAAV投与後のより高い肝臓形質導入に起因し得る（Davidoff et al., Blood. 2003; 102(2): 480-488）。

#### 【0350】

まとめると、AAVカプシド化された配列番号：20の投与はC1-INH抗原レベルの用量依存的増加をもたらし、雌性よりも雄性においてより高い絶対抗原レベルが観察された。

#### 【0351】

ヒトC1-INH抗原検出の方法を比較するために直交アプローチを用いた。5週目に、低または中ベクター用量を投与した雄性マウスにおいて、ELISAならびに追加のキャピラリー電気泳動イムノアッセイ（Wes）によってC1-INH抗原を評価した。

#### 【0352】

低ベクター用量（ $1.0 \times 10^{12}$  vg/kg）では、平均C1-INHの値および変動（標準偏差）は、ELISAおよびWesアプローチで同等であったが、C1-INH抗原の相対濃度は定量法間で一致しなかった。中ベクター用量（ $4.0 \times 10^{12}$  vg/kg）では、両方の技術を用いて、より低いベクター用量と比較してC1-INHの増加が観察された。しかしながら、ELISAによって検出された平均C1-INH値は、Wesによって定量されたレベルのほぼ2倍であった（ $1063.99$  μg/mL対 $547.25$  μg/mL）；Wesを用いた試料変動性もまた、中ベクター用量でのELISAより大きかった。

#### 【0353】

C1-INH抗原と2種類の抗原検出法を用いた活性との相関解析は、C1-INH抗原をELISA法（ $R^2 = 0.995$ ）で評価した場合、Wes（ $R^2 = 0.993$ ）と比較してわずかに強い相関を呈した（データは示されない）。この比較のためのサンプルサイズは比較的小さく（ $n=9$ の総サンプル）、ベクター用量および動物性別によって制限されたため、より大きいより包括的なサンプル集団は、各抗原検出方法の有用性についてのさらなる洞察を提供し得る。

#### 【0354】

### マウス血漿におけるC1-INHの抗原と性別の相関

配列番号：20によってコードされる導入遺伝子産物の生物学的活性を決定するために、C1-INH活性を発色アッセイによって評価し、過剰のC1-エステラーゼに対してC1-INHを滴定し、残留C1-エステラーゼ活性を測定した。ベクター投与後5週目および8週目に、全ての用量コホートの雄性および雌性マウスにおいてC1-INH活性を評価した。C1-INH凝集参照標準に対する活性のパーセンテージとしてレポートされる活性を、C1-INH抗原レベルと比較した。

#### 【0355】

全ての配列番号：20処置群にわたって、C1-INH活性とC1-INH抗原との間に正の相関が観察された（ $R^2 = 0.981$ ；図16）。抗原レベルと一致して、高ベクター用量を投与された雄性マウスは、最大レベルのC1-INH活性を有した。加えて、高ベクター用量コホートおよび中ベクター用量コホートにおける雄性マウスは、用量が一致した雌性と比較

10

20

30

40

50

して、しばしばより高いレベルのC1-INH活性を示した。

【0356】

肝臓組織における正規化ベクターゲノム濃度 - qPCR

ベクター投与後の標的組織形質導入を評価するために、前述のようにベクターゲノム濃度について終点（8週目）肝臓試料を分析した。

【0357】

雌雄マウスの肝臓においてベクターゲノム濃度の用量依存的増加が観察され、標的組織の機能的形質導入が確認された（図17）。用量を一致させた雌性マウスと比較して、AAVカプシド化された配列番号：20を投与された雄性マウスにおいて、より高いレベルの肝臓形質導入が観察され、これは、マウス肝臓のAAV形質導入に影響を及ぼす性別の以前の報告と一致した（Davidoff et al., Blood, 2003; 102(2): 480-488）。高用量および中用量のAAVカプシド化配列番号：20を投与した雄性マウスにおける平均肝臓ベクターゲノム濃度は、用量をマッチさせた雌性で観察された濃度の約2倍であった。

10

【0358】

肝臓組織における正常化mRNA発現レベル

終点（8週目）肝臓試料においてqRT-PCRを用いてSERPING1 mRNA発現を定量した。SERPING1 mRNAをマウスペプチジルプロリルシストランスイソメラーゼE（Ppie）に対して正規化し、Ppieコピー当たりのSERPING1コピーとしてレポートした。

【0359】

ベクターゲノム濃度と一致して、雄性および雌性マウスにおいて導入遺伝子発現の用量依存的増加が観察された（図18）。さらに、雄性における平均導入遺伝子発現は、同じベクター用量を投与された雌性よりも大きかった。

20

【0360】

ベクター用量のベクターとの比較は、ヌルマウス（C1-INHノックアウト）試験において安定化される。

【0361】

結論

$4.0 \times 10^{12}$  vg/kg（中用量）および $1.0 \times 10^{13}$  vg/kg（高用量）の用量でのAAVカプシド化された配列番号：20の投与は、C1-INHノックアウト雄性および雌性マウスにおいて、C1-INH抗原の循環レベルを生理学的または超生理学的レベルに回復させることができた。マウスにおける以前の報告と一致して、AAV介在性の肝臓指向性遺伝子送達後に性別特異的応答が観察された。

30

【0362】

実施例5 - B6.SJLマウスバックグラウンドでのSerpig1欠損の特性分析（図20）

C57BL/6xSJLバックグラウンド（Molecular Innovations）のSerpig1<sup>-/-</sup>マウスをHAEのモデルとして使用した。市販のマウスモデルを特性分析するために行われた実験では、エバンスブルー色素血管外漏出（データは示されない、および図20A）肢容積プレチスモグラフィによって評価されるように、系統をマッチさせた野生型コントロールとSerpig1<sup>-/-</sup>マウスとの間に血管透過性の差は観察されなかった。図20B）血漿C1-INH、図20C）ブラジキニン、図20D）C4a、および図20E）組織プラスミノーゲン活性化因子（tPA）において明確な差が観察された。C1-INH、C4a、およびtPAは、C1-INHと予想される関係に従ったが、ブラジキニンレベルは、内因性mC1-INHの存在下で減少するよりもむしろ増加するようであった。

40

【0363】

実施例6 - I21（配列番号：22）はHAEモデルマウスの血漿中において用量依存性のhC1-INH抗原レベルを持続させる（図21）

図21A）B6/SJL<sup>Serpig1+/+</sup>、図21B）B6/SJL<sup>Serpig1+/-</sup>、および図21C）B6/SJL<sup>Serpig1-/-</sup>の雄性マウスにおける血漿hC1-INHレベルは、 $1.0 \times 10^{12} \sim 3.16 \times 10^{12}$  vg/kgの範囲の3用量の1つのAAVカプシド化I21（配列番号：22）を1/4

50

対数単位で注射されたものである。これらの用量は、様々なレベルの内因性mC1-INHの存在下で機能的C1-INHの閾値に及ぶことを意図し、その下では、構成的な低レベル補体活性化がC1-INH異化の加速をもたらすことが理論的に可能である。循環C1-INHのピークに時間差は認められなかったが、*Serping1*<sup>-/-</sup>動物は閾値までの遅延した動態を示した。ピーク発現の差異は、遺伝子型によって駆動されるのではなく、投与処方の変化に由来することが見出された（データは示されない）。

#### 【0364】

実施例7 - C1-INH発現および薬力学（図22）

異なる*Serping1*遺伝子型におけるhC1-INH発現を比較するデータは、hC1-INH用量応答に対する内因性mC1-INHの潜在的効果を示したが（図22Aおよび図22B）、明確な関係は確立されなかった。循環血漿hC1-INHは、血漿ブラジキニン（図22C）およびtPA活性（図22D）と明確かつ一貫した負の相関を有し、接触系のエレメントの機能的調節および止血を示した。

10

#### 【0365】

実施例8 - I21（配列番号：22）はHAEモデルマウスの血漿中で用量依存性のhC1-INH抗原レベルを持続させる（図23）

B6/SJL<sup>*Serping1*<sup>-/-</sup></sup>雄性マウスに、 $9.5 \times 10^{11} \sim 3.0 \times 10^{13}$  vg/kgの範囲の5用量の1つのI21（配列番号：22）を注射した。（図23A）ELISAによって測定された時間の関数としての血漿C1-INHレベル。数値はIU/mLの単位であり、平均±標準偏差として示される。（図23B）B6/SJL<sup>*Serping1*<sup>-/-</sup></sup>雄性マウスにおけるベクター用量の関数としての定常状態C1-INH抗原レベル。全ての数値を対数変換し、回帰分析（ $R^2 = 0.88$ ）を用いて線形フィットを生成した。C1-INH C1-エステラーゼ阻害によって測定される活性は、線形用量反応を示し、抗原レベルと相関した（データは示されない）。

20

#### 【0366】

実施例9 - HAE疾患モデルマウスにおける血管新生発作の主要なドライバーである、I21（配列番号：22）が介在するブラジキニンの減少（図24）

図24A）各用量コホートにおける個々の血漿ブラジキニンレベルおよび平均±SD血漿ブラジキニンレベル。最低ベクター用量コホートを除いて、I21ベクターを投与された動物は、賦形剤処置マウスと比較して、平均血漿ブラジキニンの有意な減少を示した。post-hocダネット多重比較検定（\*\*、 $p < 0.01$ ；\*\*\*、 $p < 0.001$ ）を用いた一元配置分散分析により、賦形剤と比較した統計的比較を行った。図24B）血漿C1-INHレベルは血漿ブラジキニンレベルと逆相関し、C1-INH抗原に関して直線関係を示した（ $R^2 = 0.81$ ）。

30

#### 【0367】

実施例10 - I21（配列番号：22）介在C1-INHはHAEのマウスモデルにおいてC4のレベルをレスキューする（図25）

自動毛細血管ベースの免疫測定システム（WesTM、ProteinSimple）により試験終了時に血漿C4を分析した。図25A）各用量コホートにおける個々のおよび平均±標準偏差の相対C4発現。図25B）31週目における各動物のそれぞれのC1-INH抗原レベルに対してプロットした個々の相対血漿C4値。全ての数値を対数変換し、回帰分析（ $R^2 = 0.87$ ）を用いて線形フィットを生成した。血漿C1-INHの関数としてC4のレベルも調べた（図25C）。

40

#### 【0368】

実施例11 - 毒性試験

C57BL/6J雄性および雌性マウスにおいて、AAVカプシド化されたI21（配列番号：22）毒性を評価した。雄性マウスに、 $2.5 \times 10^{12}$  vg/kg、 $5.0 \times 10^{12}$  vg/kg、または $1.0 \times 10^{13}$  vg/kgのAAVカプシド化されたI21を投与した。雌性マウスに、 $1.0 \times 10^{13}$  vg/kg、 $5.0 \times 10^{13}$  vg/kg、または $9.9 \times 10^{13}$  vg/kgのAAVカプシド化されたI21を投与した。投与された全てのマウスは30日まで生存し、組織病理学的評価における顕微鏡的所見は、AAVカプシド化されたI21の投与に直接関連していないと考えられた

50

。投与されたマウスにおけるC1-INHレベルは、>30~60倍程であり、正常の100%を超えた(図26Aおよび図26B)。

【0369】

実施例12 - 非ヒト霊長類(NHP)用量試験

このNHP用量推定試験の目的は、AAVカプシド化I21ベクターの安全性を評価し、ヒトC1-INHの治療レベルを達成するための用量の範囲を解明し、開始臨床用量を知らせることであった。1.0 x 10<sup>13</sup> vg/kg、3.2 x 10<sup>13</sup> vg/kg、および1.0 x 10<sup>14</sup> vg/kgの3つの上昇するベクター用量は、雄性および雌性のカニクイザルの両方における正常循環C1-INHの20%、70%、および200%を標的とすることを目的とした。

【0370】

【表14】

テーブル11

群No.				
1	ビヒクル	0	6	6
2	AAV-カプシド化I21	1.0 x 10 <sup>13</sup> (低)	4	4
3	AAV-カプシド化I21	3.2 x 10 <sup>13</sup> (中)	4	4
4	AAV-カプシド化I21	1.0 x 10 <sup>14</sup> (高)	3	3

【0371】

NHP血漿中のヒトC1-INH抗原レベル:

LC-MS/MS方法を用いてヒトC1-INHを定量した。血漿由来ヒトC1-INH(Molecular Innovations、#HC1INH-1.0MG)を用いて、10 μg/mL~0.1 μg/mLの範囲の標準を調製し、50倍希釈後に30 μg/mLおよび300 μg/mLを標的とするQC試料を調製した。定量化の前に試料を5倍まで希釈した。

【0372】

NHP血漿中のヒトC1-INHの活性:

過剰のC1-エステラーゼに対してC1-INHを滴定し、Technochrom C1-INHキット(Diapharma、5345003)の改変版を用いて、残存C1-エステラーゼ活性を測定する発色性C1-エステラーゼインヒビターアッセイでC1-INH活性を定量した。各バイアル上に示された量のヌクレアーゼ非含有水で提供されたC1-エステラーゼおよび基質のバイアルを再構成し、National Institute for Biological Standards and Control(NIBSC)濃縮物(08/256)を細胞培養グレードの水で再構成して、19.2 IU/mL(1920%正常活性)のストック濃度を得た。提供された緩衝液Bを37 °Cの水浴に入れて、使用前に適切な温度に平衡化させた。96ウェル組織培養プレートにおいて、提供された緩衝液A中で試料を1:10に希釈した。標準活性200%~標準活性17.3%の範囲で、合計8つの基準点について、緩衝液A中のNIBSC濃縮物(08/256)を用いて、緩衝液単独(標準C1-INH活性の0%)からなる最終点を有する標準曲線を調製した。基質の1:6希釈物を緩衝液B中で調製し、QC試料をCyno Normal Pooled Plasmaおよび緩衝液A中で連続的に調製して、75%および3~0%の正常活性を達成した。20 μLのヒトC1-エステラーゼを新鮮な96ウェル組織培養プレートに添加した。ヒトC1-エステラーゼを含有するすべてのウェルに、20 μLの標準、QCおよび試料を2連で添加し、プレートを37 °Cで5分間30秒間インキュベートし、その後、希釈した予熱した基質120 μLを各ウェルに添加し、プレートをさらに20分間37 °Cでインキュベートした。20分のインキュベーションの後、プレートを直ちに54秒ごとに5分間、405nmでの光学密度について37 °Cに設定されたSpectraMax i3xプレートリーダー(Molecular Devices)上で読み取った。SoftMax Proソフトウェアを使用して、Log-Log変換フィットを使用して標準

10

20

30

40

50

をプロットし、計算を自動的に行った。レポートされた結果は、この標準曲線を用いた補間から得られた逆計算希釈であり、投与前1日目の血漿サンプルにおいて得られた%正常C1-INH活性の正規化後の正常C1-INH活性のパーセンテージとしてレポートされる。

【0373】

図27Aおよび図27Bは、異なる時点での投与試験の結果を示す。AAV-カプシド化されたI21(配列番号:22)は、hC1-INH抗原および活性の両方の持続的増加を生じさせた。さらに、C1-INH発現は治療範囲に及んだ。

【0374】

図28Aおよび図28Bは、異なる用量のAAVカプシド化I21で産生されたhC1-INH抗原レベルおよびピークパーセント正常C1-INH活性を示す。両方の分析について、対数変換データの二元配置分散分析を行った。抗原および活性は、性別にかかわらず、試験したすべての用量にわたって良好に相関した。雄性和雌性の間で発現に統計的差異は観察されなかった。

10

【0375】

実施例13 - in vitroでのプラスミドからのhC1-INH発現

Huh7細胞を異なるSERPING1発現プラスミドでin vitroでトランスフェクトし、上清中のhC1-INH抗原レベルを測定した。異なる発現プラスミドはテーブル12に示されるように、AAV発現カセットを含んだ。

【0376】

20

30

40

50

## 【表 15】

テーブル 1 2

プラスミドとその略語のリスト：

配列 番号		図 2 9 省略プラスミド名称
22	pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_BGH228	pAAV_SERPING1_I21
28	pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_BGH228	pSwap-SERPING1_I21
34	pSwap_2xApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_BGH228	2xApoE 5'
35	pSwap_4xApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_BGH228	4xApoE 5'
36	pSwap_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_2xApoE_BGH228	2xApoE 3'
37	pSwap_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_4xApoE_BGH228	4xApoE 3'
38	pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_hAATenh_BGH228	hAAT enh 3'
39	pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_hAATenh(co1)_BGH228	hAAT enh (co1) 3'
42	pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_WPRE_BGH228	WPRE
43	pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_WPREco1_BGH228	WPRE(co1)
40	pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_WPRE3_BGH228	WPRE3
41	pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_WPRE3co1_BGH228	WPRE3(co1)
56	pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_BGH228 (-ORFs)	(-ORFs)
44	pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1(-ATG)_SERPING1co21_BGH228	HBB2 -ATG
27	pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21(-RIDD)_BGH228	(-RIDD)
229	pAAV_ApoE_hAAT_HBB2m1(-ATG)_SERPING1co21(-RIDD)_BGH228	(HBB2 -ATG/ -RIDD)
57	pSwap_ApoE_hAAT_SERPING1co21(SERPING1 5'UTR)_BGH228	SERPING1 5'UTR
61	pSwap_ApoE_hAAT_(SERPING1 APRE) HBB2m1_SERPING1co21_BGH228	SERPING1 APRE
60	pSwap_ApoE_hAAT_SERPING1co21(SERPING1APRE/ 5'UTR)_BGH228	SERPING1 APRE & 5'UTR
62	pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_BGH228 (SAA2 5'UTR)	SAA2 5'UTR
63	pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_BGH228 (SAA2 3' UTR)	SAA2 3' UTR
64	pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_BGH228 (SAA2 5'&3' UTR)	SAA2 5'&3' UTR
65	pSwap_ApoE_hAAT(APRE-SAA2)_HBB2m1_(SAA2 5')SERPING1co21_BGH228	SAA2 APRE & 5'UTR
66	pSwap_(2x ADRES)ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21_BGH228	2xADRES
67	pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21(+RIDD1x)_BGH228	RIDD1x
68	pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21(+RIDD3x)_BGH228	RIDD3x

10

20

30

40

50

69	pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21(+RIDD1xBlos)_BGH228	RIDD1xBlos
45	pSwap_ApoE_hAAT_SERPING1co21(イントロン1-2, 2-3)_BGH228	イントロン1-2, 2-3
46	pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21(イントロン2-3)_BGH228	イントロン2-3
47	pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21(イントロン3-4)_BGH228	イントロン3-4
58	pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21(イントロン2-3)_BGH228 - SINES_LINES	イントロン2-3 - LINES/SINES
227	pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21(イントロン2-3)_BGH228 - SINES_LINES -CpG	イントロン2-3 - LINES/SINES(-CpG)
59	pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21(イントロン3-4)_BGH228 - SINES_LINES	イントロン3-4 - LINES/SINES
228	pSwap_ApoE_hAAT_HBB2m1_SERPING1co21(イントロン3-4)_BGH228 - SINES_LINES-CpG	イントロン3-4 - LINES/SINES(-CpG)

10

## 【0377】

結果を図29に示す。結果はn = 3の生物学的複製の平均である。エラーバーは標準偏差を示す。ほぼ全てのプラスミドが、CAG (pCAG\_GFP) によって駆動される緑色蛍光タンパク質 (GFP) を有するコントロールプラスミドと比較して、分泌されたヒトC1-INHの発現レベルの増加を示し、これらのプラスミドはSERPING1導入遺伝子産物の発現をもたらすことを示した。

20

## 【0378】

in vitroで配列番号：49、50、51、52、53、または54を含む異なるSERPING1発現プラスミドでHuh7細胞をトランスフェクトした；上清中のC1-INH抗原レベルは検出不能であった（データは示されない）。

## 【0379】

実施例14 - miR-142-3p標的部点を有するSERPING1発現プラスミド

30

配列番号：28 (pSwap-SERPING1\_I21)、配列番号：55 (mir 142-3p)、またはコントロールプラスミドpCAG\_GFPの核酸を含むプラスミドでin vitroでHuh7細胞をトランスフェクトし、上清中に分泌されたヒトC1-INH抗原をアッセイした。結果を図30に示す。結果はn = 3の生物学的複製の平均である。エラーバーは標準偏差を示す。

## 【0380】

miR-142-3p標的部点プラスミドは、緑色蛍光タンパク質 (pCAG\_GFP) コントロールプラスミドと比較して、分泌されたヒトC1-INHの発現レベルの増加を示し、これは、SERPING1導入遺伝子産物の発現をもたらしたことを示す。さらに、miR-142-3pプラスミドは、pSwap-SERPING1\_I21のレベルと比較的類似したレベルのヒトC1-INHを生じた。

40

## 【0381】

本発明は、本明細書において、本発明の多数の実施形態を説明するために肯定的な言葉を用いて一般的に開示される。本発明はまた、具体的には、特定の主題が物質または材料、方法ステップおよび条件、プロトコール、または手順等の、完全にまたは部分的に除外される実施形態を含む。例えば、本発明のある実施形態では、材料および/または方法のステップは除外される。したがって、本発明は、一般に、本発明が含まないものに関して本明細書では表現されないが、本発明において明確に除外されない態様はそれにもかかわらず、本明細書で開示される。

50

【 図 面 】  
【 図 1 】

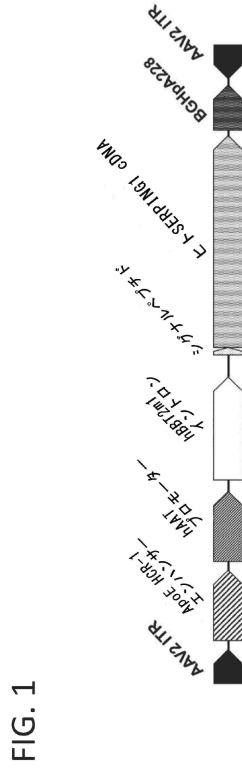


FIG. 1

【 図 3 】

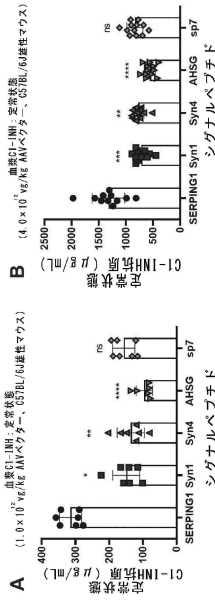


FIG. 3

【 図 4 】

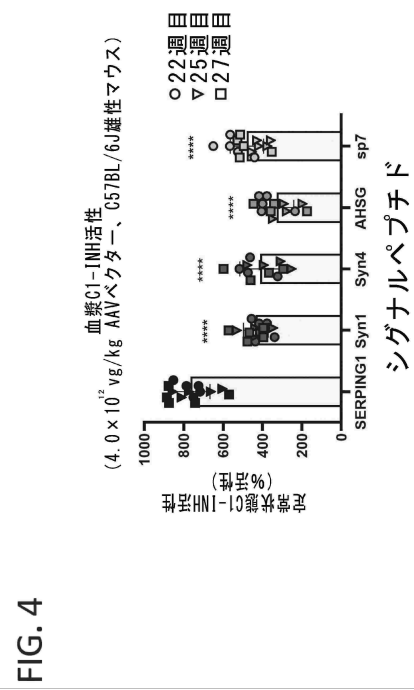


FIG. 4

【 図 2 】

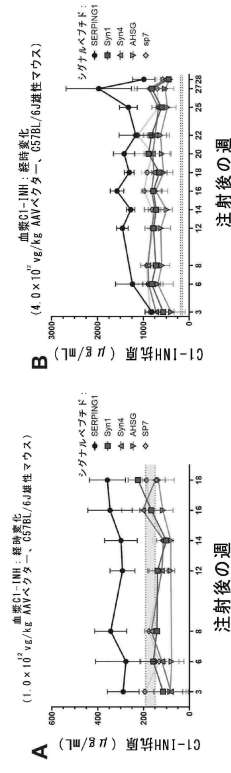


FIG. 2

10

20

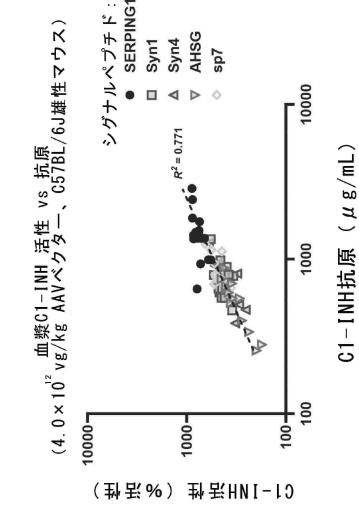
30

40

50

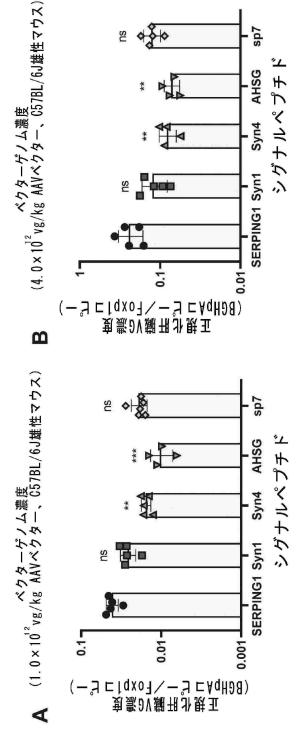
【 図 5 】

FIG. 5



【 図 6 】

FIG. 6

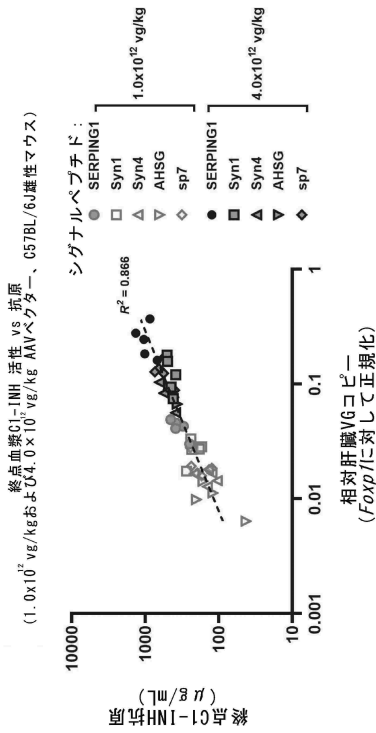


10

20

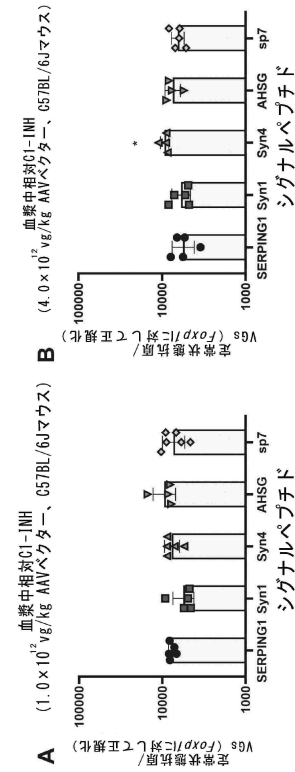
【 図 7 】

FIG. 7



【 図 8 】

FIG. 8



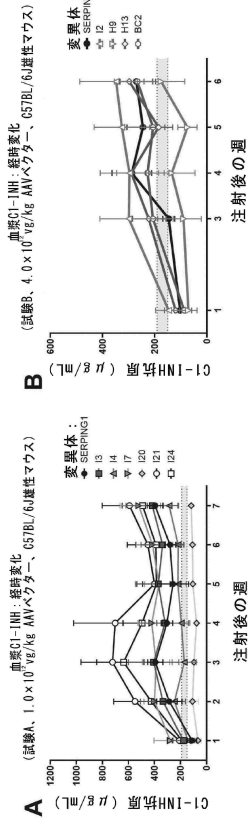
30

40

50

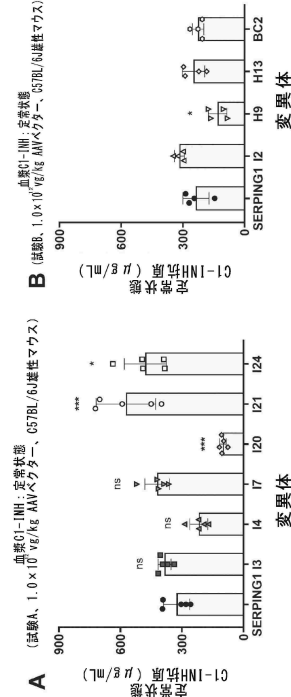
【 図 9 】

FIG. 9



【 図 10 】

FIG. 10

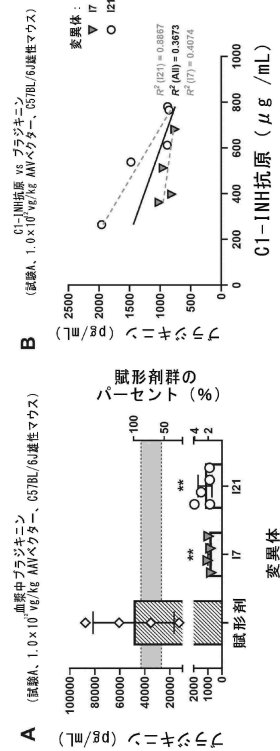


10

20

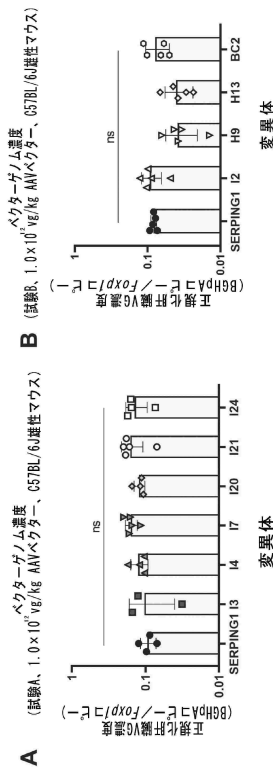
【 図 11 】

FIG. 11



【 図 12 】

FIG. 12



30

40

50

【 図 1 3 】

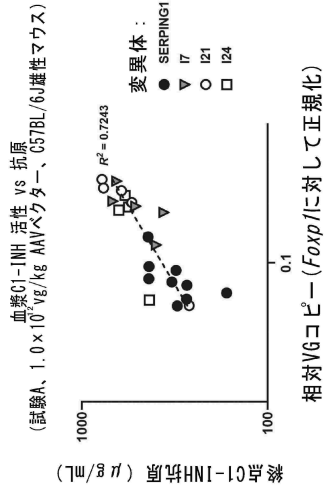


FIG. 13

【 図 1 4 】

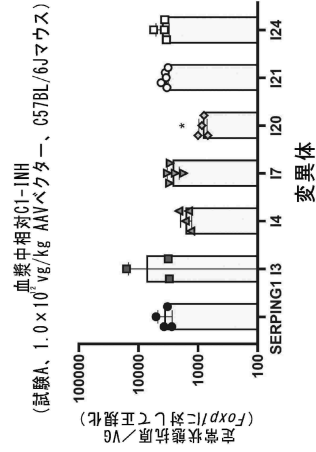


FIG. 14

【 図 1 5 】

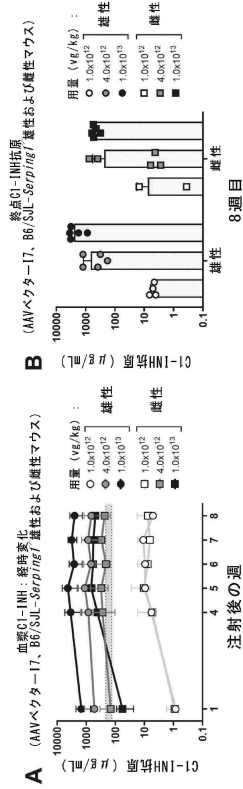


FIG. 15

【 図 1 6 】

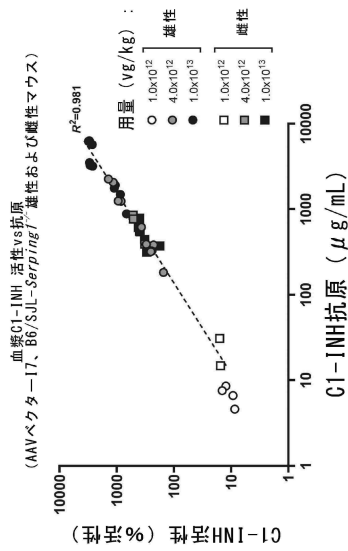


FIG. 16

10

20

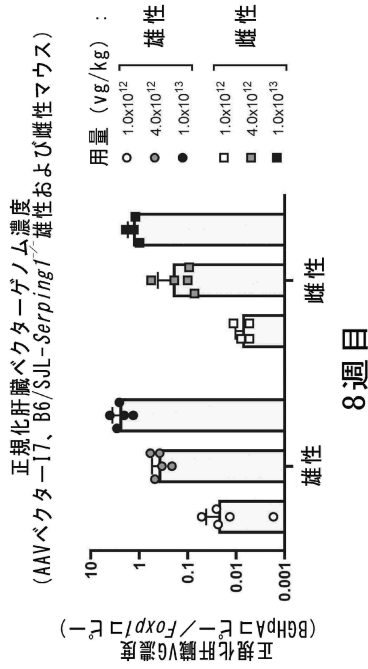
30

40

50

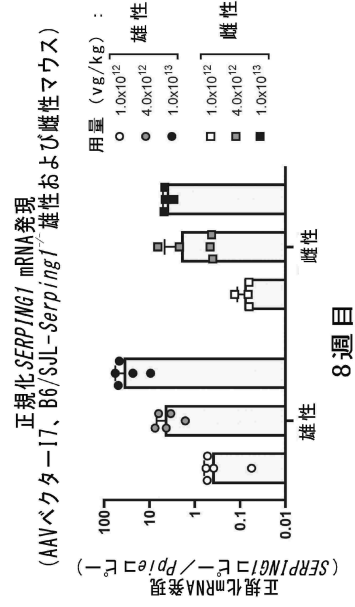
【 図 1 7 】

FIG. 17



【 図 1 8 】

FIG. 18

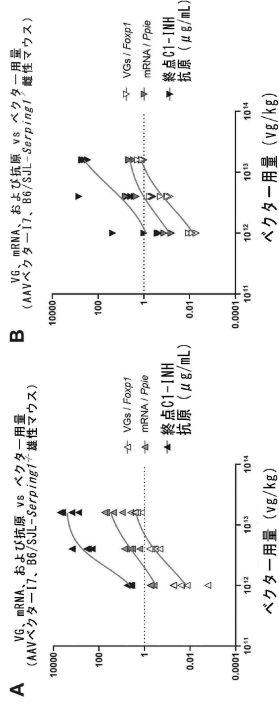


10

20

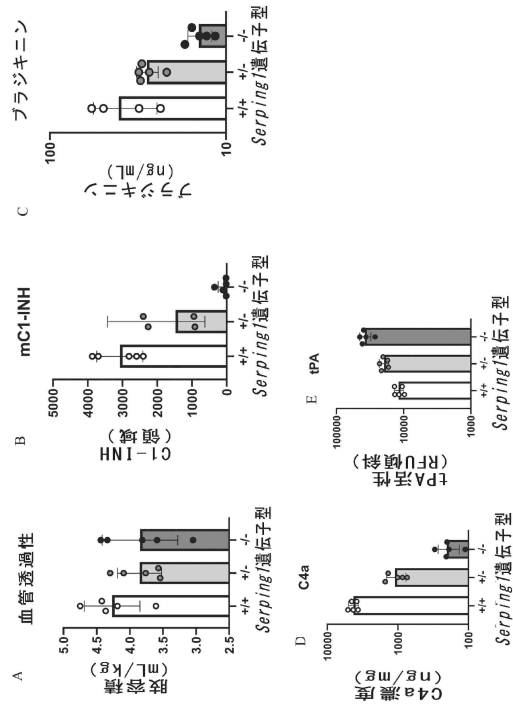
【 図 1 9 】

FIG. 19



【 図 2 0 】

FIG. 20



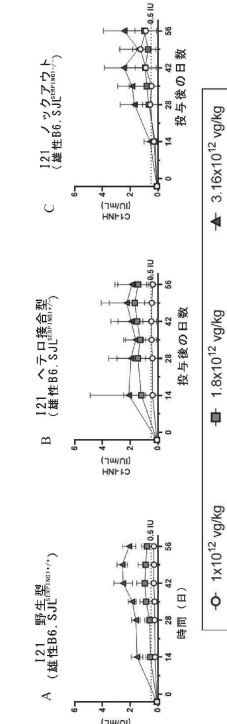
30

40

50

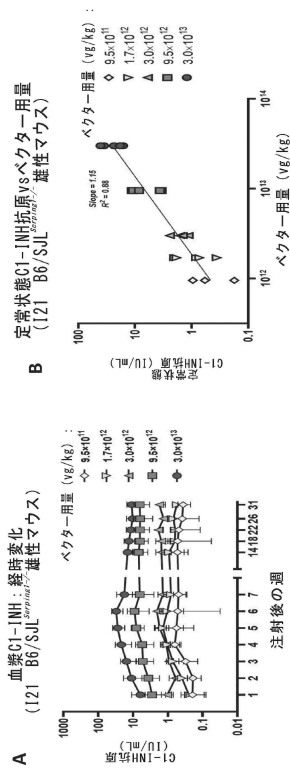
【 図 2 1 】

FIG. 21



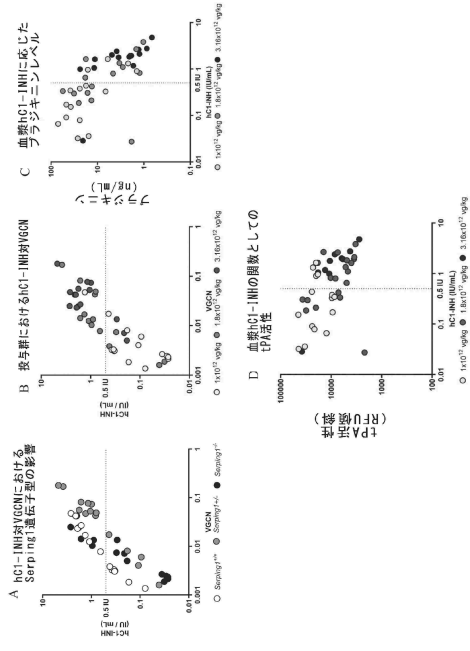
【 図 2 3 】

FIG. 23



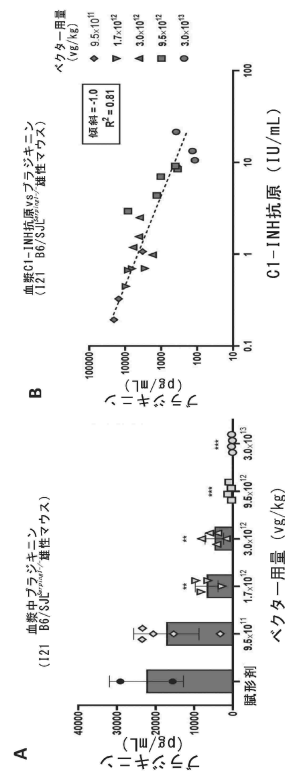
【 図 2 2 】

FIG. 22



【 図 2 4 】

FIG. 24



10

20

30

40

50

【 図 2 5 - 1 】

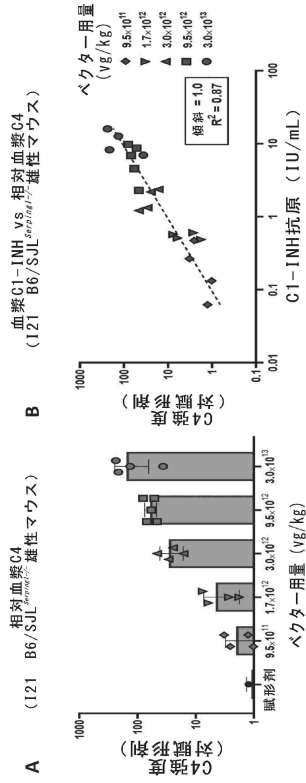


FIG. 25

【 図 2 5 - 2 】

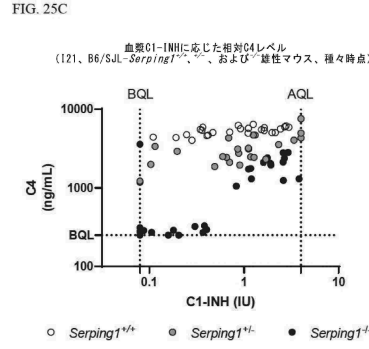


FIG. 25C

10

20

【 図 2 6 】

FIG. 26A

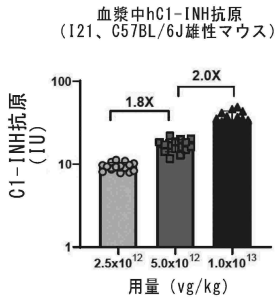
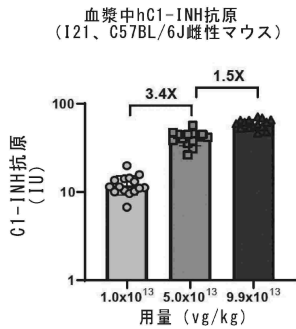


FIG. 26B



【 図 2 7 】

FIG. 27A

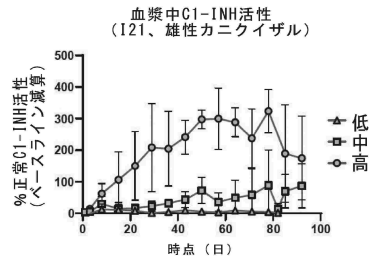
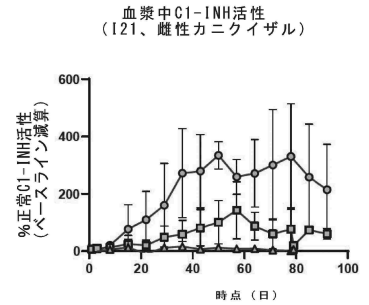


FIG. 27B



30

40

50

【 図 2 8 】

FIG. 28A

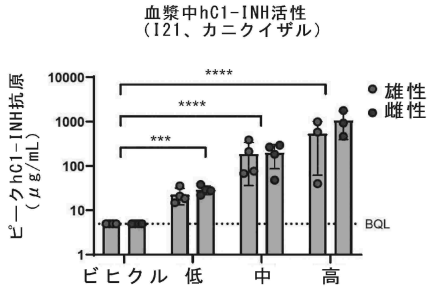
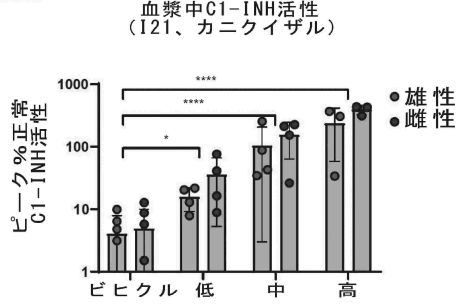


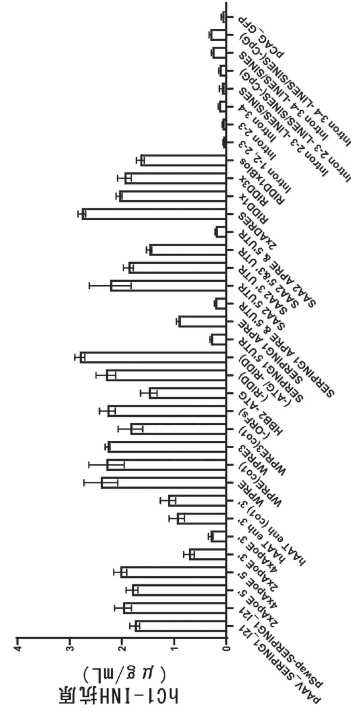
FIG. 28B



【 図 2 9 】

トランスフェクトHuh7細胞上清におけるhC1-INH抗原レベル

FIG. 29

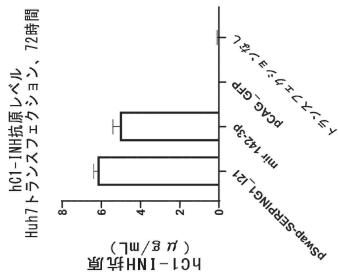


10

20

【 図 3 0 】

FIG. 30



30

【 配 列 表 】

202450626600001.app

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/14091

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 IPC - A61K 38/55, A61K 38/57, A61P 43/00 (2022.01)  
 CPC - A61P 7/10, C07K 14/8121, C07K 14/811, C07K 14/81, A61K 38/1709

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

10

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
 See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X - A	US 2016/0347822 A1 (CORNELL UNIVERSITY) 1 December 2016 (01.12.2016) para [0023]-[0024], [0062]-[0063]	1 - 2-6
A	US 2013/0244974 A1 (PHARMING INTELLECUTAL PROPERTY B.V.) 19 September 2013 (19.09.2013) abstract; para [0007]; SEQ ID NO: 1	2-6
A	US 2013/0259924 A1 (MODERNA THERAPEUTICS) 3 October 2013 (3.10.2013) pg 66, Table 6; SEQ ID NO: 238	2-6
A	WO 2016/170176 A1 (CUREVAC AG) 27 October 2016 (27.10.2016) pg 110, Table 11; SEQ ID NO: 8029	2-6

20

30

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
23 May 2022

Date of mailing of the international search report  
**JUL 12 2022**

40

Name and mailing address of the ISA/US  
 Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents  
 P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450  
 Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer  
 Kari Rodriguez  
 Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 22/14091

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

10

a.  forming part of the international application as filed:

in the form of an Annex C/ST.25 text file.

on paper or in the form of an image file.

b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

20

3. Additional comments:

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 22/14091

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
- 2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3.  Claims Nos.: 8, 12-40, 42-46 and 48-59  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

20

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Continued on Supplemental Page

- 1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-6, limited to SEQ ID NOs: 181 and 238

30

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/14091

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

Group I+: Claims 1-7 and 9-11, directed to an isolated polynucleotide composition comprising a nucleic acid encoding a C1 inhibitor, wherein the nucleic acid is CpG-reduced and/or codon optimized compared to the coding sequence of the C1 inhibitor. The C1 inhibitor polynucleotide will be searched to the extent that said polynucleotide comprises a nucleic acid sequence at least 97% identical to SEQ ID NO: 238 said C1 inhibitor comprises [amino acid] SEQ ID NO: 181. It is believed that claims 1-6 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass said C1 inhibitor polynucleotide. Additional C1 inhibitor polynucleotides will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected C1 inhibitor polynucleotides. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a C1 inhibitor polynucleotide comprising a nucleic acid encoding a C1 inhibitor, wherein the nucleic acid comprises a sequence of SEQ ID NO: 119, and wherein the C1 inhibitor comprises the amino acid sequence of 192 (claims 1 and 11).

10

Group II+: Claims 41, 47 and 60-61, directed to a composition comprising an AAV vector, comprising 5' and 3' ITRs, tissue specificity, potency and response elements, a nucleic acid encoding a signal peptide, and a nucleic acid encoding at least one of a C1 inhibitor, a variant C1 inhibitor, and a fusion or combination thereof. Group II+ will be searched upon payment of additional fees. The AAV vector may be searched, for example, to the extent that the 5' and 3' ITRs comprise SEQ ID NOs: 70 and 71, respectively, the tissue specificity, potency and response elements comprise SEQ ID NOs: 79, 229 and 77, respectively; the signal peptide and nucleic acid sequences comprising SEQ ID NOs: 203 and 84; and the C1 inhibitor having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 181. It is believed that claim 41, limited to said AAV vector, read on this exemplary invention. Additional AAV vectors will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be an AAV vector wherein the 5' and 3' ITRs comprise SEQ ID NOs: 72 and 73, respectively, the tissue specificity, potency and response elements comprise SEQ ID NOs: 80, 74 and 78, respectively; the signal peptide and nucleic acid sequences comprising SEQ ID NOs: 204 and 85; and a C1 inhibitor having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 192 and a nucleic acid sequence of SEQ ID NO: 104 (Claim 41).

20

The inventions listed as Groups I+ and II+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

No technical features are shared between the nucleic acid and amino acid sequences of Group I+, or between the nucleic acid and amino acid sequences of Group II+, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if the inventions listed as Group I+ and or Group II+ were considered to share technical features, these shared technical features are previously disclosed by the prior art, as further discussed below.

Group I+ requires an isolated polynucleotide composition comprising a nucleic acid encoding a C1 inhibitor, wherein the nucleic acid is CpG-reduced and/or codon optimized compared to the coding sequence of the C1 inhibitor, not required by Group II+.

Group II+ requires an AAV vector, comprising 5' and 3' ITRs, tissue specificity, potency and response elements, a nucleic acid encoding a signal peptide, not required by Group I+.

Common Technical Features

The inventions of Group I+ and II+ share the technical feature of a C1 inhibitor comprising a signal peptide, for example C1 inhibitor having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 181

30

However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is taught by US 2016/0130324 A1 to Shire Human Genetics Therapies Inc (hereinafter, "Shire"). Shire teaches SEQ ID NO: 1, a 478 aa C1 inhibitor having 100% identity to the applicant's SEQ ID NO: 181 (claim 1 "A fuslon protein comprising: a human C1-inhibitor polypeptide", para [0110] "In some embodiments, the fuslon protein comprising a human C1-inhibitor polypeptide ... includes an amino acid sequence identical to the full length human C1-inhibitor protein SEQ ID NO:1", para [0110] "A schematic depicting the structure of C1-INH is provided in FIG. 1A. The signal peptide, N-terminal domain, and serpin domain are shown").

As the technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the inventions. Groups I+ and II+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Item 4, continued: claims 8, 12-40, 42-46 and 48-59 are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a) regarding multiply dependent claims.

40

## フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7088(2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	
(32)優先日	令和3年4月30日(2021.4.30)	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,T,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW	
	アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 1 4 3 フィラデルフィア キングセッシング アベニュー 4 7 0 0	
(72)発明者	アーマー ショーン	
	アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 8 9 6 6 ホーランドスルーブレッド ドライブ 1 6	
(72)発明者	クイン ウィリアム ジョン ザ サード	
	アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 1 4 3 フィラデルフィア サウス フォーティーシックス ストリート 5 0 8	
(72)発明者	プレストン マイケル	
	アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 3 3 5 ダウニングタウン ブレイクリー ロード 2 0	
(72)発明者	イオエーレ スティーブン	
	アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0 8 0 5 3 マールトン コルツ ゲート ロード 4 4	
(72)発明者	コーエン ダニエル	
	アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 1 4 6 フィラデルフィア ガバナーズ コート 5 0 2	
(72)発明者	シー チェンウェイ ケルビン	
	アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 0 8 7 ウェイン イートン ドライブ 1 1 5	
F ターム (参考)	4B065 AA90X AB01 BA02 BC50 CA23 CA44	
	4C084 AA13 MA16 MA56 MA66 NA14 ZA831 ZA832	
	4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 MA05 MA16 MA56 MA66 NA14 ZA83	
	4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA16 MA56 MA66 NA14 ZA83	