

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202290645 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2022.07.28

(51) Int. Cl. C12N 15/00 (2006.01)  
A61K 38/00 (2006.01)  
C07K 14/435 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2020.09.17

(54) мРНК, КОДИРУЮЩАЯ СКОНСТРУИРОВАННЫЙ CFTR

(31) 62/903,047; 62/984,632; 63/021,263

(72) Изобретатель:

(32) 2019.09.20; 2020.03.03; 2020.05.07

Вустер Ричард, Дероза Франк, Беглен

(33) US

Лианн, Нандури Приянка, Диаз

(86) PCT/US2020/051277

Ануша, Тран Кханг Анх (US)

(87) WO 2021/055609 2021.03.25

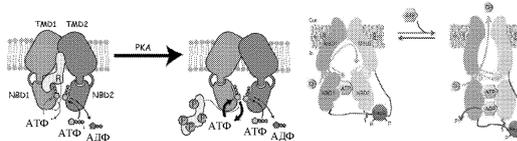
(74) Представитель:

(71) Заявитель:

ТРАНСЛЕЙТ БИО, ИНК. (US)

Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение предусматривает, среди прочего, усовершенствованные способы и фармацевтические композиции для лечения кистозного фиброза на основе кодон-оптимизированной мРНК, кодирующей сконструированный или мутантный белок регулятора трансмембранной проводимости при кистозном фиброзе (CFTR).



202290645

A1

A1

202290645

## **МРНК, КОДИРУЮЩАЯ СКОНСТРУИРОВАННЫЙ CFTR**

### **ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

[0001] Настоящая заявка испрашивает преимущество и приоритет на основании предварительной заявки на патент США с серийным номером 62/903047, поданной 20 сентября 2019 г., предварительной заявки на патент США с серийным номером 62/984632, поданной 3 марта 2020 г., и предварительной заявки на патент США с серийным номером 63/021263, поданной 7 мая 2020 г., содержание каждой из которых включено в данный документ во всей своей полноте.

### **ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

[0002] Содержимое текстового файла под названием "MRT-2115WO\_SL.txt", который был создан 17 сентября 2020 г. и имеет размер 261 КБ, тем самым включено посредством ссылки во всей своей полноте.

### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

[0003] Кистозный фиброз представляет собой аутосомное наследственное нарушение, возникающее в результате мутации гена CFTR, который кодирует хлорид-ионный канал, который, как считается, участвует в регуляции множества других ионных каналов и транспортных систем в эпителиальных клетках. Потеря функции CFTR приводит к хроническому заболеванию легких, аберрантному продуцированию слизи и резкому снижению продолжительности жизни. См. в целом Rowe et al., *New Engl. J. Med.* 352, 1992-2001 (2005).

[0004] В настоящее время лечения кистозного фиброза не существует. В литературе задокументированы многочисленные трудности, возникающие при попытке индуцировать экспрессию CFTR в легком. Например, вирусные векторы, содержащие ДНК CFTR, запускали иммунные ответы, и симптомы CF сохранялись после введения. Conese et al., *J. Cyst. Fibros.* 10 Suppl 2, S114-28 (2011); Rosenecker et al., *Curr. Opin. Mol. Ther.* 8, 439-45 (2006). Сообщали также, что невирусная доставка ДНК, включая ДНК CFTR, запускает иммунные ответы. Alton et al., *Lancet* 353, 947-

54 (1999); Rosenecker et al., J Gene Med. 5, 49-60 (2003). Кроме того, при использовании невирусных ДНК-векторов сталкиваются с дополнительной проблемой, заключающейся в том, что механизм комплекса ядерных пор обычно не импортирует ДНК в ядро, где могла бы происходить транскрипция. Pearson, Nature 460, 164-69 (2009).

## СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Настоящее изобретение предусматривает, среди прочего, фармацевтические композиции, содержащие матричную РНК (мРНК), кодирующую сконструированный или мутантный белок регулятора трансмембранной проводимости при кистозном фиброзе (CFTR), и способы их получения и применения. Примечательно, что сконструированные или мутантные белки CFTR, описанные в данном документе, содержат мутации, которые повышают активность или стабильность белка. Эти фармацевтические композиции можно использовать для улучшенного лечения кистозного фиброза.

[0006] В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию для лечения кистозного фиброза, содержащую мРНК, кодирующую регулятор трансмембранной проводимости при кистозном фиброзе (CFTR), где CFTR предусматривает одну или более мутаций, которые обеспечивают получение активированного белка CFTR.

[0007] В одном аспекте в данном документе предусматривается фармацевтическая композиция для лечения кистозного фиброза, содержащая мРНК, кодирующую регулятор трансмембранной проводимости при кистозном фиброзе (CFTR), где CFTR предусматривает одну или более мутаций, которые обеспечивают получение белка CFTR, который является более стабильным, чем белок CFTR дикого типа.

[0008] Например, в некоторых вариантах осуществления мутантный белок CFTR характеризуется более длительным периодом полувыведения по сравнению с CFTR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления мутантный белок CFTR характеризуется приблизительно таким же периодом полувыведения, что и CFTR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления мутантный белок CFTR имеет на приблизительно 5 минут, 10 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 60 минут, 90

минут, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 8 часов, 10 часов, 12 часов, 14 часов, 16 часов, 18 часов, 20 часов, 22 часа или 24 часа больший период полувыведения по сравнению с CFTR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления мутантный белок CFTR характеризуется периодом полувыведения, большим, чем 24 часа, по сравнению с CFTR дикого типа.

[0009] В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций расположены в пределах регуляторного домена, трансмембранного домена (MSD) и/или нуклеотид-связывающего домена (NBD) CFTR. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций расположены в пределах аминокислотных остатков 634-835 регуляторного домена CFTR. В некоторых вариантах осуществления мутации расположены в пределах разных доменов.

[0010] В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR, содержащий одну или более мутаций, приводит к повышению активности по сравнению с белком CFTR дикого типа.

[0011] В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR, содержащий одну или более мутаций, приводит к увеличению переноса по сравнению с белком CFTR дикого типа.

[0012] В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR, содержащий одну или более мутаций, приводит к повышению проводимости по сравнению с белком CFTR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR, содержащий одну или более мутаций, приводит к повышению проводимости в присутствии модуляторов по сравнению с белком CFTR дикого типа. Например, сконструированный белок CFTR обладает повышенной проводимостью в присутствии потенцирующего средства, корректора и/или активатора по сравнению с проводимостью белка CFTR дикого типа.

[0013] В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR, содержащий одну или более мутаций, обладает улучшенными фармакокинетическими свойствами по сравнению с белком CFTR дикого типа.

[0014] В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR, содержащий одну или более мутаций, обеспечивает получение активированного белка CFTR, который является более стабильным, чем белок CFTR дикого типа.

[0015] В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR, содержащий одну или более мутаций, обеспечивает получение белка CFTR, который является более терапевтически эффективным для лечения кистозного фиброза по сравнению с белком CFTR дикого типа. Например, сконструированный белок CFTR обладает одним или более из улучшений в отношении активности, переноса, синергической проводимости в присутствии модуляторов (например, потенцирующих средств, корректоров и/или активаторов), фармакокинетических свойств и стабильности по сравнению с белком CFTR дикого типа.

[0016] В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает по меньшей мере 2 мутации в аминокислотных остатках по сравнению с белком CFTR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает по меньшей мере 3 мутации в аминокислотных остатках по сравнению с белком CFTR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает по меньшей мере 4 мутации в аминокислотных остатках по сравнению с белком CFTR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает по меньшей мере 5 мутаций в аминокислотных остатках по сравнению с белком CFTR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает по меньшей мере 6 мутаций в аминокислотных остатках по сравнению с белком CFTR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает по меньшей мере 7 мутаций в аминокислотных остатках по сравнению с белком CFTR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает по меньшей мере 10 мутаций в аминокислотных остатках по сравнению с белком CFTR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает по меньшей мере 11 мутаций в аминокислотных остатках по сравнению с белком CFTR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает по меньшей мере 12 мутаций в аминокислотных остатках по сравнению с белком CFTR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает по меньшей мере 13 мутаций в аминокислотных остатках по сравнению с белком CFTR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает по меньшей мере 14 мутаций в аминокислотных остатках по сравнению с белком CFTR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает по меньшей мере 15 мутаций в аминокислотных остатках по сравнению с белком CFTR

дикого типа. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает по меньшей мере 16 мутаций в аминокислотных остатках по сравнению с белком CFTR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает по меньшей мере 17 мутаций в аминокислотных остатках по сравнению с белком CFTR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает по меньшей мере 18 мутаций в аминокислотных остатках по сравнению с белком CFTR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает по меньшей мере 19 мутаций в аминокислотных остатках по сравнению с белком CFTR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает по меньшей мере 20 мутаций в аминокислотных остатках по сравнению с белком CFTR дикого типа.

[0017] В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает от 1 до 20 мутаций в аминокислотных остатках по сравнению с белком CFTR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает от 2 до 15 мутаций в аминокислотных остатках по сравнению с белком CFTR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает от 3 до 12 мутаций в аминокислотных остатках по сравнению с белком CFTR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает от 5 до 10 мутаций в аминокислотных остатках по сравнению с белком CFTR дикого типа.

[0018] В некоторых вариантах осуществления мутация представляет собой аминокислотную замену. В некоторых вариантах осуществления мутация представляет собой делецию одной или более аминокислот. В некоторых вариантах осуществления мутация представляет собой вставку одной или более аминокислот. В некоторых вариантах осуществления мутация представляет собой инверсию аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления мутация представляет собой комбинацию аминокислотной замены, делеции одной или более аминокислот, вставки одной или более аминокислот, инверсии аминокислоты.

[0019] В некоторых вариантах осуществления одну или несколько мутаций осуществлены по остаткам K14, K68, S422, S660, S670, S686, T690, S700, K710, S712, K716, S737, S753, S768, T787, T788, S790, S795, S813, K978, K1041, K1080, K1218, E1371, K190, G550, R553, R555, K1250, K464, W401, F409, F430 и их комбинациях. В



Соответственно, в некоторых вариантах осуществления один или более остатков лизина CFTR мутированы. В некоторых вариантах осуществления один или более остатков серина CFTR мутированы. В некоторых вариантах осуществления один или более остатков глицина CFTR мутированы. В некоторых вариантах осуществления один или более остатков треонина CFTR мутированы. В некоторых вариантах осуществления один или более остатков аргинина CFTR мутированы. В некоторых вариантах осуществления один или более остатков триптофана CFTR мутированы. В некоторых вариантах осуществления один или более остатков треонина CFTR мутированы. В некоторых вариантах осуществления один или более остатков глутаминовой кислоты CFTR мутированы. В некоторых вариантах осуществления один или более остатков фенилаланина CFTR мутированы.

**[0020]** В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает одну или более мутаций, затрагивающих АТФ-зависимый цикл закрытия/открытия мембранного канала. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает мутации по остаткам W401 и E1371. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает мутации по остаткам K464 и E1371. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает мутации в W401, F409 и E1371. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает мутации в W401, F409, F430 и E1371. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает мутацию в K978. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает мутацию в E1371. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает мутации по остаткам W401 и E1371. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает мутации в W401, F409 и E1371. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает мутации в W401, F409, F430 и E1371. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает мутации в K464 и E1371.

**[0021]** В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций приводят к замене на остаток аланина. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций приводят к замене на остаток аргинина. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций приводят к замене на остаток аспарагина. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций приводят к замене на остаток аспартата. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций

приводят к замене на остаток цистеина. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций приводят к замене на остаток глутамата. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций приводят к замене на остаток глутамина. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций приводят к замене на остаток глицина. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций приводят к замене на остаток гистидина. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций приводят к замене на остаток изолейцина. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций приводят к замене на остаток лейцина. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций приводят к замене на остаток лизина. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций приводят к замене на остаток метионина. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций приводят к замене на остаток фенилаланина. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций приводят к замене на остаток пролина. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций приводят к замене на остаток серина. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций приводят к замене на остаток треонина. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций приводят к замене на остаток триптофана. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций приводят к замене на остаток тирозина.

**[0022]** В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций выбраны из K14R, K68R, K710R, K716R, K1041R, K1080R, K1218R и их комбинаций.

**[0023]** В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает мутации, выбранные из K14R, K68R, K1218R, K14R/K68R, K14R/K1218R, K68R/K1218R и K14R/K68R/K1218R. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций представляют собой мутацию K14R. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций представляют собой мутацию K68R. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций представляют собой мутацию K1218R. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций представляют собой мутацию K14R/K68R. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций представляют собой мутацию K14R/K1218R. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций представляют собой мутацию

K68R/K1218R. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций представляют собой мутацию K14R/K68R/K1218R.

[0024] В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает мутации S660D/S737D/S795D/S813D, S660DD/S686D/S700D/S737D/S795D/S813D, K978C или E1371Q. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает мутации S660D/S737D/S795D/S813D. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает мутации S660DD/S686D/S700D/S737D/ S795D/S813D. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций представляют собой мутацию K978C. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций представляют собой мутацию E1371Q. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает мутации S422D/S660D/S670D/S686D/T690D/S700D/S712D/S753D/T787D/T788D/S790D/S795D/S813D. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает мутации S422D/S660D/S670D/S686D/T690D/S700D/S712D/S737D/S753D/S768D/T787D/T788D/S790D/S795D/S813D.

[0025] В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций, осуществленных по остаткам S422, S660, S670, S686, T690, S700, S712, S737, S753, S768, T787, T788, S790, S795, S813, представляют собой аминокислотную замену на глутаминовую кислоту (E). В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает мутации S422E/S660E/S670E/S686E/T690E/S700E/S712E/S753E/T787E/T788E/S790E/S795E/S813E. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает мутации S422E/S660E/S670E/S686E/T690E/S700E/S712E/S737E/S753E/S768E/T787E/T788E/S790E/S795E/S813E.

[0026] В некоторых вариантах осуществления CFTR дополнительно предусматривает мутацию K14R. В некоторых вариантах осуществления CFTR дополнительно предусматривает мутацию E1371Q. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает мутации K14R/S422D/S660D/S670D/S686D/T690D/S700D/S712D/S753D/T787D/T788D/S790D/S795D/S813D. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает мутации

K14R/S422D/S660D/S670D/S686D/T690D/S700D/S712D/S737D/S753D/S768D/T787D/T788D/S790D/S795D/S813D. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает мутации K14R/S422E/S660E/S670E/S686E/T690E/S700E/S712E/S753E/T787E/T788E/S790E/S795E/S813E. В некоторых вариантах осуществления CFTR предусматривает мутации K14R/S422E/S660E/S670E/S686E/T690E/S700E/S712E/S737E/S753E/S768E/T787E/T788E/S790E/S795E/S813E.

[0027] В некоторых вариантах осуществления мРНК, кодирующая CFTR, является кодон-оптимизированной. В некоторых вариантах осуществления мРНК, кодирующая CFTR, не является кодон-оптимизированной.

[0028] В некоторых вариантах осуществления кодон-оптимизированная мРНК CFTR дополнительно содержит последовательность 5'-нетранслируемой области (UTR) под SEQ ID NO: 4.

[0029] В некоторых вариантах осуществления кодон-оптимизированная мРНК CFTR дополнительно содержит последовательность 3'-нетранслируемой области (UTR) под SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

[0030] В некоторых вариантах осуществления кодон-оптимизированная мРНК CFTR инкапсулирована в наночастице. В некоторых вариантах осуществления наночастица представляет собой липосому. В некоторых вариантах осуществления липосома содержит один или более катионных липидов, один или более некаатионных липидов, один или более липидов на основе холестерина и один или более PEG-модифицированных липидов. В некоторых вариантах осуществления липосома содержит не более трех отдельных липидных компонентов. В некоторых вариантах осуществления один отдельный липидный компонент представляет собой катионный липид на основе стерина. В некоторых вариантах осуществления катионный липид на основе стерина представляет собой сложный эфир имидазолхолестерина (ICE).

[0031] В некоторых вариантах осуществления липосомы имеют размер, составляющий менее чем приблизительно 200 нм. В некоторых вариантах осуществления липосомы имеют размер, составляющий менее чем приблизительно 150 нм. В некоторых вариантах осуществления липосомы имеют размер, составляющий менее чем приблизительно 120 нм. В некоторых вариантах

осуществления липосомы имеют размер, составляющий менее чем приблизительно 110 нм. В некоторых вариантах осуществления липосомы имеют размер, составляющий менее чем приблизительно 100 нм. В некоторых вариантах осуществления липосомы имеют размер, составляющий менее чем приблизительно 80 нм. В некоторых вариантах осуществления липосомы имеют размер, составляющий менее чем приблизительно 60 нм. В некоторых вариантах осуществления липосомы имеют размер, составляющий менее чем приблизительно 50 нм.

[0032] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит потенцирующее средство для CFTR. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит корректор CFTR. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит активатор CFTR. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит потенцирующее средство, корректор и/или активатор для CFTR. Подходящие потенцирующие средства, корректоры и/или активаторы для CFTR включают ивакафтор (торговое наименование Kalydeco®), лумакафтор (торговое наименование Orkambi®), тезакафтор, vX-659, VX-445, VX-152, VX-440, VX-371, VX-561, GLPG1837, GLPG2222, GLPG2737, GLPG2451, GLPG1837, PTI-428, PTI-801, PTI-808 и элуфорсен. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит ивакафтор. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит лумакафтор. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит тезакафтор. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит ивакафтор, лумакафтор, тезакафтор или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит VX-659. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит VX-445. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит VX-152. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит VX-440. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит VX-371. В некоторых вариантах осуществления

фармацевтическая композиция дополнительно содержит VX-561. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит GLPG1837. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит GLPG2222. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит GLPG2737. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит GLPG2451. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит GLPG1837. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит РТИ-428. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит РТИ-801. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит РТИ-808. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит элуфорсен. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит любую комбинацию потенцирующих средств, корректоров и/или активаторов для CFTR.

[0033] В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает, среди прочего, полинуклеотид, содержащий последовательность, комплементарную последовательности мРНК по настоящему изобретению.

[0034] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой линейный или кольцевой полинуклеотид, содержащий дезоксирибонуклеотидные остатки.

[0035] В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает, среди прочего, культивируемую клетку, содержащую полинуклеотид по настоящему изобретению.

[0036] В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает способ индуцирования экспрессии CFTR в эпителиальных клетках легкого млекопитающего, включающий стадию приведения эпителиальных клеток легкого млекопитающего в контакт с фармацевтической композицией по настоящему изобретению.

[0037] В некоторых вариантах осуществления кодон-оптимизированную мРНК CFTR вводят посредством легочной доставки. В некоторых вариантах осуществления

кодон-оптимизированную мРНК CFTR вводят посредством внутривенной доставки. В некоторых вариантах осуществления кодон-оптимизированную мРНК CFTR вводят посредством перорального, ректального, вагинального, трансмукозального или внутрикишечного введения; парентеральной доставки, в том числе внутрикожных, чрескожных (местных), внутримышечных, подкожных, интрамедуллярных инъекций, а также интратекального, прямого внутрижелудочкового, внутривенного, внутрибрюшинного и/или интраназального введения.

[0038] В некоторых вариантах осуществления легочная доставка предусматривает распыление. В некоторых вариантах осуществления кодон-оптимизированную мРНК CFTR вводят посредством аэролизации.

[0039] В некоторых вариантах осуществления лечение субъекта достигается при более низкой терапевтически эффективной дозе по сравнению с лечением субъекта с помощью мРНК, кодирующей CFTR дикого типа.

[0040] В некоторых вариантах осуществления лечение субъекта, нуждающегося в этом, приводит к более короткому времени распыления для введения терапевтически эффективной дозы по сравнению с лечением с помощью мРНК, кодирующей CFTR дикого типа.

[0041] В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает, среди прочего, нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок регулятора трансмембранной проводимости при кистозном фиброзе (CFTR), где модифицированный белок CFTR содержит одну или более аминокислотных замен на глутаминовую кислоту.

[0042] В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен происходят по остаткам серина. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен происходят по остаткам треонина.

[0043] В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен расположены в пределах регуляторного домена CFTR. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен расположены в аминокислотных остатках 440—820. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен происходят по остатку S422, S660, S670, S686, T690, S700, S712, S737, S753, S768, T787, T788, S790, S795 и/или S813.

[0044] В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок CFTR предусматривает одну или более мутаций из S422E, S660E, S670E, S686E, T690E, S700E, S712E, S737E, S753E, S768E, T787E, T788E, S790E, S795E и/или S813E. В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок CFTR предусматривает мутации S422E/S660E/S670E/S686E/T690E/S700E/S712E/S753E/T787E/T788E/S790E/S795E/S813E. В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок CFTR предусматривает мутации S422E/S660E/S670E/S686E/T690E/S700E/S712E/S737E/S753E/S768E/T787E/T788E/S790E/S795E/S813E.

[0045] В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок CFTR дополнительно предусматривает мутацию K14R. В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок CFTR дополнительно предусматривает мутацию E1371Q.

[0046] В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает, среди прочего, нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок регулятора трансмембранной проводимости при кистозном фиброзе (CFTR), где модифицированный белок CFTR содержит мутации K14R и E1371Q.

[0047] В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок CFTR дополнительно предусматривает одну или более мутаций в регуляторном домене, трансмембранном домене (MSD) и/или нуклеотид-связывающем домене CFTR.

[0048] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой ДНК, кДНК, РНК, мРНК или РНА. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой кДНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой РНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой мРНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой РНА. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой PCNA. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой MCNA.

[0049] В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает, среди прочего, вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок регулятора трансмембранной проводимости при кистозном фиброзе (CFTR).

[0050] В некоторых вариантах осуществления вектор на основе AAV упакован в вирус или вирусную частицу. В некоторых вариантах осуществления вирусная частица является псевдотипированной. В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, вирус герпеса или лентивирус.

[0051] В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает, среди прочего, модифицированный белок CFTR, содержащий одну или более аминокислотных замен на глутаминовую кислоту.

[0052] В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает, среди прочего, способ лечения кистозного фиброза, включающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, модифицированного белка CFTR.

[0053] В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает, среди прочего, способ индуцирования экспрессии CFTR у субъекта, включающий введение вектора на основе AAV. В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает, среди прочего, способ лечения кистозного фиброза, включающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, вектора на основе AAV.

## **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

[0054] Графические материалы приведены исключительно с целью иллюстрации, а не ограничения.

[0055] На **фиг. 1** показана схема, иллюстрирующая регуляцию активности канала регулятора трансмембранной проводимости при кистозном фиброзе (CFTR).

[0056] На **фиг. 2А** и **фиг. 2В** показаны схемы иллюстративных сконструированных белков CFTR с мутациями, которые активируют, и/или стабилизируют, и/или усиливают экспрессию белка CFTR. На **фиг. 2А** показана схематическая модель и иллюстративные фосфомиметические мутации R-домена. На **фиг. 2В** показана схематическая модель мутаций, затрагивающих АТФ-зависимое

открытие/закрытие мембранного канала. На **фиг. 2C** показаны иллюстративные мутации, повышающие стабильность/экспрессию. На **фиг. 2D** показана экспрессия иллюстративного сконструированного мутантного варианта белка CFTR с повышенной стабильностью по сравнению с экспрессией белка WT.

[0057] На **фиг. 3A** представлен гель, на котором видно, что мутированные конструкции CFTR экспрессируются на сходных уровнях по сравнению с CFTR дикого типа в культивируемых клетках HEK.

[0058] На **фиг. 3B** показан иллюстративный график тока короткого замыкания, изображающий поток хлорид-ионов во времени через каналы, состоящие из белка CFTR дикого типа и сконструированного мутантного варианта белка CFTR, в анализе в камере Уссинга при высокой дозе, составляющей 0,5 мкг.

[0059] На **фиг. 4** показан иллюстративный график тока короткого замыкания, изображающий поток хлорид-ионов во времени через каналы, состоящие из белка CFTR дикого типа и сконструированного мутантного варианта белка CFTR в анализе в камере Уссинга при низкой дозе, составляющей 0,35 мкг.

[0060] На **фиг. 5** показаны иллюстративные результаты в виде графика зависимости тока короткого замыкания от времени, меры транспорта хлорид-ионов через сконструированный белок E CFTR при дозах в диапазоне от 0,05 мкг до 0,35 мкг.

[0061] На **фиг. 6** показаны иллюстративные результаты в виде графика зависимости тока короткого замыкания от времени, меры транспорта хлорид-ионов через белок CFTR дикого типа при пермеабилзации мембраны эсцином с использованием доз от 10 мкМ до 25 мкМ эсцина в присутствии и в отсутствие АТФ.

[0062] На **фиг. 7** показаны иллюстративные результаты в виде графика зависимости тока короткого замыкания от времени, меры транспорта хлорид-ионов через белок CFTR дикого типа при дозе 10 мкМ эсцина в анализе в камере Уссинга.

[0063] На **фиг. 8** показан иллюстративный график тока короткого замыкания, изображающий поток хлорид-ионов во времени через каналы, образованные CFTR WT и сконструированными фосфомиметическими мутантными вариантами белка CFTR в анализе в камере Уссинга.

[0064] На **фиг. 9А** показан иллюстративный график проводимости при коротком замыкании, измеренной в камере Уссинга с использованием клеток FRT, трансфицированных мРНК CFTR дикого типа, 13D и 13E. На **фиг. 9В** показан иллюстративный график проводимости при коротком замыкании, измеренной в камере Уссинга с использованием клеток FRT, трансфицированных мРНК CFTR дикого типа, 15D и 15E. Стрелки указывают на добавление форсколина (f), ивакафтора VX-770 (v) или ингибитора 172 CFTR. Планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего значения с N=3 или 4.

[0065] На **фиг. 10** показана иллюстративная гистограмма, изображающая ток при максимальной активации для различных мутантных вариантов белка CFTR с улучшениями в отношении переноса, перечисленных в таблице 10, как определено с помощью анализа в камере Уссинга.

[0066] На **фиг. 11А** показан иллюстративный вестерн-блоттинг, демонстрирующий экспрессию белков CFTR (варианты 15E, 13E, E1371Q и CFTR дикого типа) в клетках HEK293. На **фиг. 11В** представлена количественная оценка уровней экспрессии, показанных на **фиг. 11А**. На **фиг. 11С** показан иллюстративный график проводимости при коротком замыкании, измеренной в камере Уссинга с использованием клеток FRT, трансфицированных мРНК CFTR дикого типа, 15E, 15E/K14R, 13D, 13D/K14R, 13E и 13E/K14R. На **фиг. 11D** представлена гистограмма тока при максимальной активации для различных конструкций CFTR, испытанных на **фиг. 11С**. На **фиг. 11Е** представлена серия графиков, которые показывают проводимость при коротком замыкании, измеренную в камере Уссинга с использованием клеток FRT, трансфицированных мРНК CFTR дикого типа, 13D, 13E, 15D или 15E, как указано.

[0067] **Фиг. 12А** представляет собой таблицу токов, отражающую поток хлорид-ионов на исходном уровне и после добавления форсколина, VX-770 и CFTRinh-172. На **фиг. 12В** представлен иллюстративный график проводимости при коротком замыкании, демонстрирующий, среди прочего, что замена аланина в фосфомиметических сайтах снижает индуцированную форсколином хлоридную проводимость в клетках FRT.

[0068] На **фиг. 13А** показан иллюстративный график проводимости при коротком замыкании, измеренной в камере Уссинга с использованием клеток FRT, трансфицированных мРНК CFTR дикого типа, E1371Q и E1371Q/K14R. Стрелки указывают на добавление форсколина (f), ивакафтора VX-770 (v) или ингибитора 172 CFTR. Планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего значения с N=3 или 4. На **фиг. 13В** представлена гистограмма, отображающая активность и экспрессию мутантного варианта CFTR E1371Q и мутантного варианта CFTR E1371Q/K14R по сравнению с белком CFTR дикого типа.

[0069] На **фиг. 14А** и **фиг. 14В** представлены гистограммы, отображающие максимальный ток активации для различных конструкций CFTR в анализе в камере Уссинга через 22 и 44 часа. На **фиг. 14С** представлена иллюстративная гистограмма, показывающая, что удаление сайта убиквитинирования на N-конце изменяет активность канала в комбинации с другими заменами.

[0070] На **фиг. 15А** изображена схема, показывающая CFTR, который содержит мутации в указанных аминокислотных остатках. На **фиг. 15В** изображена серия графиков, которые показывают время релаксации каналов для указанных мутантных вариантов CFTR. На **фиг. 15С** изображена серия графиков, которые показывают измерения проводимости при коротком замыкании, измеренной в камере Уссинга, для вариантов CFTR.

[0071] На **фиг. 16А** изображен график, показывающий проводимость при коротком замыкании, измеренную в камере Уссинга с использованием клеток FRT, которые были трансфицированы с помощью мРНК CFTR, имеющих фосфомиметические мутации CFTR. На **фиг. 16В** представлен график, показывающий EC50 (нМ) форсколина в случае мРНК CFTR, которые имеют различное количество фосфомиметических мутаций.

[0072] На **фиг. 17** представлен график, показывающий чувствительность к форсколину для мРНК CFTR, которые имеют специфические аминокислотные замены, оцененную по проводимости при коротком замыкании, измеренной в камере Уссинга с использованием клеток FRT, которые были трансфицированы с помощью мРНК CFTR, идентифицированных на графике.

[0073] На **фиг. 18А** представлен гель, отображающий расположение полос для различных последовательностей CFTR. На **фиг. 18В** представлена гистограмма, отображающая эффективность мРНК CFTR для различных последовательностей CFTR. На **фиг. 18С** представлена гистограмма, отображающая относительную экспрессию различных последовательностей CFTR в полосе С.

[0074] На **фиг. 19** представлена гистограмма, отображающая результаты анализа по оценке цитотоксичности различных последовательностей мРНК CFTR.

[0075] На **фиг. 20А, 20В, 20С, 20D, 20Е и 20F** представлена серия графиков, которые показывают проводимость при коротком замыкании, измеренную в камере Уссинга, для различных кодон-оптимизированных и не являющихся кодон-оптимизированными конструкций CFTR.

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0076] Для облегчения понимания настоящего изобретения вначале ниже определены некоторые термины. Дополнительные определения следующих терминов и других терминов приводятся по всему описанию. Публикации и другие справочные материалы, упоминаемые в данном документе для описания предшествующего уровня техники настоящего изобретения и для предоставления дополнительных подробностей, касающихся его осуществления, включены в данный документ посредством ссылки.

[0077] *Примерно или приблизительно.* Используемый в данном документе термин «примерно» или «приблизительно», применяемый к одному или более представляющим интерес значениям, относится к значению, сходному с указанным эталонным значением. В определенных вариантах осуществления термин «примерно» или «приблизительно» относится к диапазону значений, которые находятся в пределах 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или меньше в любую сторону (большую или меньшую) от указанного эталонного значения, если иное не указано или иное не очевидно из контекста (кроме случаев, когда такое число превышает 100% возможного значения).

[0078] Используемый в данном документе термин «партия» относится к величине или количеству мРНК, синтезированному за один раз, например, полученному в соответствии с одним производственным заказом в течение одного и

того же цикла производства. Партия может относиться к количеству мРНК, синтезированному в одной реакции, которая происходит с помощью одной аликвоты фермента и/или одной аликвоты матрицы ДНК для непрерывного синтеза при одном наборе условий. В некоторых вариантах осуществления партия будет включать мРНК, полученную в результате реакции, в которой не все реагенты и/или компоненты добавляются и/или восполняются по мере прохождения реакции. Термин «не в одной партии» не будет означать мРНК, синтезированную в разное время, которую объединяют для достижения необходимого количества.

[0079] *Доставка.* Используемый в данном документе термин «доставка» охватывает как местную, так и системную доставку. Например, доставка мРНК охватывает ситуации, при которых мРНК доставляют в целевую ткань, и кодируемый белок экспрессируется и удерживается в целевой ткани (что также называется «локальным распределением» или «локальной доставкой»), и ситуации, при которых мРНК доставляют в целевую ткань, и кодируемый белок экспрессируется и секретируется в систему кровообращения пациента (например, в сыворотку), и системно распространяется, и поглощается другими тканями (что также называется «системным распределением» или «системной доставкой»). В некоторых вариантах осуществления доставка представляет собой легочную доставку, например, включающую распыление.

[0080] *Инкапсулирование.* Используемый в данном документе термин «инкапсулирование» или его грамматические эквиваленты относятся к способу заключения молекулы мРНК в наночастицу.

[0081] *Сконструированный или мутантный.* Используемые в данном документе термины «сконструированный» или «мутантный» или их грамматические эквиваленты относятся к нуклеотидной или белковой последовательности, содержащей одну или более модификаций по сравнению с их встречающейся в природе последовательностью, включая без ограничения делеции, вставки гетерологичных нуклеиновых кислот или аминокислот, инверсии, замены или их комбинации.

[0082] *Экспрессия.* Используемый в данном документе термин «экспрессия» последовательности нуклеиновой кислоты относится к трансляции мРНК в

полипептид, сборке нескольких полипептидов (например, тяжелой цепи или легкой цепи антитела) в интактный белок (например, антитело) и/или посттрансляционной модификации полипептида или полностью собранного белка (например, антитела). В настоящей заявке термины «экспрессия» и «продуцирование» и их грамматические эквиваленты используются взаимозаменяемо.

[0083] *Функциональный*. Как используется в данном документе, «функциональная» биологическая молекула представляет собой биологическую молекулу в форме, в которой она проявляет свойство и/или активность, которыми она характеризуется.

[0084] *Период полувыведения*. Используемый в данном документе термин «период полувыведения» представляет собой время, необходимое для того, чтобы определенная величина, такая как концентрация или активность нуклеиновой кислоты или белка, снизилась до половины своего значения, измеренного в начале периода времени.

[0085] *Улучшать, увеличивать или снижать*. Используемые в данном документе термины «улучшать», «увеличивать» или «уменьшать» или грамматические эквиваленты указывают на значения, рассчитанные относительно исходного измерения, например измерения у одного того же индивидуума до начала лечения, описанного в данном документе, или измерения у контрольного субъекта (или нескольких контрольных субъектов) в отсутствие лечения, описанного в данном документе. «Контрольный субъект» является субъектом, страдающим той же формой заболевания, что и субъект, получающий лечение, и имеющим примерно тот же возраст, что и субъект, получающий лечение.

[0086] *Примеси*. Используемый в данном документе термин «примеси» относится к веществам внутри ограниченного количества жидкости, газа или твердого вещества, которые отличаются от химического состава целевого материала или соединения. Примеси также называют загрязнителями.

[0087] *In vitro*. Используемый в данном документе термин «*in vitro*» относится к событиям, которые происходят в искусственной среде, *например*, в пробирке или реакционном сосуде, в культуре клеток и *т. д.*, а не в многоклеточном организме.

[0088] *In vivo*. Используемый в данном документе термин «*in vivo*» относится к событиям, которые происходят в многоклеточном организме, как, например, в организме человека и отличного от человека животного. Применительно к клеточным системам термин может быть использован в отношении событий, которые происходят в живой клетке (в противоположность, например, системам *in vitro*).

[0089] *Выделенный*. Используемый в данном документе термин «выделенный» относится к веществу и/или структурной единице, которые были (1) отделены по меньшей мере от некоторых компонентов, с которыми они были ассоциированы изначально при выработке (в природе и/или в экспериментальных условиях), и/или (2) произведены, получены и/или изготовлены человеком. Выделенные вещества и/или структурные единицы могут быть отделены от приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или более чем приблизительно 99% других компонентов, с которыми они изначально были ассоциированы. В некоторых вариантах осуществления выделенные средства являются на приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или более чем приблизительно 99% чистыми. В контексте данного документа вещество является «чистым», если оно практически не содержит других компонентов. В контексте данного документа расчет чистоты в процентах выделенных веществ и/или структурных единиц не должен включать вспомогательные вещества (например, буфер, растворитель, воду и т. д.).

[0090] *Матричная РНК (мРНК)*. Используемый в данном документе термин «матричная РНК (мРНК)» относится к полинуклеотиду, который кодирует по меньшей мере один полипептид. мРНК, используемая в данном документе, охватывает как модифицированную, так и немодифицированную РНК. мРНК может включать одну или более кодирующих и некодирующих областей. мРНК может быть получена посредством очистки из природных источников, получена с использованием

рекомбинантных систем экспрессии и необязательно очищена, химически синтезирована и *т. д.* При необходимости, например, в случае с химически синтезированными молекулами, мРНК может содержать аналоги нуклеозидов, такие как аналоги, имеющие химически модифицированные основания или сахара, модификации остова и *т. д.* Последовательность мРНК представлена в направлении от 5' к 3', если не указано иное.

[0091] *Нуклеиновая кислота.* Используемый в данном документе термин «нуклеиновая кислота» в его самом широком смысле относится к любому соединению и/или веществу, которое включено или может быть включено в состав полинуклеотидной цепи. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой соединение и/или вещество, которое включено или может быть включено в состав полинуклеотидной цепи посредством фосфодиэфирной связи. В некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» относится к отдельным остаткам нуклеиновой кислоты (например, нуклеотидам и/или нуклеозидам). В некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» относится к полинуклеотидной цепи, содержащей отдельные остатки нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» охватывает РНК, а также одно- и/или двухнитевую ДНК и/или кДНК. Более того, термины «нуклеиновая кислота», «ДНК», «РНК» и/или подобные термины включают аналоги нуклеиновых кислот, т. е. аналоги, имеющие остов, отличный от фосфодиэфирного. Например, так называемые «пептидные нуклеиновые кислоты», которые известны в данной области техники и содержат пептидные связи вместо фосфодиэфирных связей в остове, считаются входящими в объем настоящего изобретения. Термин «нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность» включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и/или кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Нуклеотидные последовательности, которые кодируют белки и/или РНК, могут включать интроны. Нуклеиновые кислоты могут быть получены посредством очистки из природных источников, могут быть получены с применением рекомбинантных систем экспрессии и необязательно могут быть очищены, химически синтезированы и *т. д.* При необходимости, например, в случае химически синтезированных молекул, нуклеиновые кислоты могут включать аналоги нуклеозидов, такие как аналоги,

содержащие химически модифицированные основания или сахара, модификации остова и т. д. Последовательность нуклеиновой кислоты представлена в направлении от 5' к 3', если не указано иное. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой или содержит природные нуклеозиды (например, аденозин, тимидин, гуанозин, цитидин, уридин, дезоксиаденозин, дезокситимидин, дезоксигуанозин и дезоксицитидин); аналоги нуклеозидов (например, 2-аминоаденозин, 2-тиотимидин, инозин, пирролопиримидин, 3-метиладенозин, 5-метилцитидин, C5-пропинилцитидин, C5-пропинилуридин, 2-аминоаденозин, C5-бромурин, C5-фторуридин, C5-йодуридин, C5-пропинилуридин, C5-пропинилцитидин, C5-метилцитидин, 2-аминоаденозин, 7-дезаааденозин, 7-дезаагуанозин, 8-оксоаденозин, 8-оксогуанозин, O(6)-метилгуанин и 2-тиоцитидин), химически модифицированные основания; биологически модифицированные основания (например, метилированные основания); интеркалированные основания; модифицированные сахара (например, 2'-фторрибозу, рибозу, 2'-дезоксирибозу, арабинозу и гексозу) и/или модифицированные фосфатные группы (например, фосфоротиоаты и 5'-N-фосфорамидитные связи). В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение, в частности, направлено на «немодифицированные нуклеиновые кислоты», что означает нуклеиновые кислоты (например, полинуклеотиды и остатки, в том числе нуклеотиды и/или нуклеозиды), которые не были химически модифицированы с целью облегчения или достижения доставки. В некоторых вариантах осуществления нуклеотиды Т и У используют взаимозаменяемо в описаниях последовательностей.

**[0092]** *Пациент.* Используемые в данном документе термины «пациент» или «субъект» относятся к любому организму, которому может быть введена предусмотренная композиция, например, для экспериментальных, диагностических, профилактических, косметических и/или терапевтических целей. Типичные пациенты включают в себя животных (например, млекопитающих, таких как мыши, крысы, кролики, отличные от человека приматы и/или люди). В некоторых вариантах осуществления пациентом является человек. Человек включает в себя пре- и постнатальные формы.

**[0093]** *Фармацевтически приемлемый.* Термин «фармацевтически приемлемый», используемый в данном документе, относится к веществам, которые в

рамках здравого медицинского суждения подходят для применения в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения в соответствии с разумным соотношением польза/риск.

[0094] *Стабильный*. Используемый в данном документе термин «стабильный» белок или его грамматические эквиваленты относятся к белку, который сохраняет свою физическую стабильность и/или биологическую активность. В одном варианте осуществления стабильность белка определяют на основе процентного содержания мономерного белка в растворе при низком процентном содержании разрушенного (например, фрагментированного) и/или агрегированного белка. В одном варианте осуществления стабильный сконструированный белок сохраняет или демонстрирует увеличенный период полувыведения по сравнению с белком дикого типа. В одном варианте осуществления стабильный сконструированный белок менее склонен к убиквитинированию, который приводит к протеолизу, по сравнению с белком дикого типа.

[0095] *Субъект*. Используемый в данном документе термин «субъект» относится к человеку или любому отличному от человека животному (например, к мышши, крысе, кролику, собаке, кошке, крупному рогатому скоту, свинье, овце, лошади или примату). Человек включает в себя пре- и постнатальные формы. Во многих вариантах осуществления субъектом является человек. Субъект может являться пациентом, что относится к человеку, обращающемуся к поставщику медицинских услуг для диагностики или лечения заболевания. Термин «субъект» используется в данном документе взаимозаменяемо с «индивидуумом» или «пациентом». Субъект может быть пораженным заболеванием или нарушением или предрасположенным к заболеванию или нарушению, но у него могут проявляться или не проявляться симптомы заболевания или нарушения.

[0096] *Практически*. Используемый в данном документе термин «практически» относится к качественному состоянию проявления полной или почти полной меры или степени представляющих интерес характеристики или свойства. Среднему специалисту в области биологии будет понятно, что биологические и химические явления редко, если вообще когда-либо, подходят к завершению и/или продолжаются

до завершенности или достигают или избегают абсолютного результата. Таким образом, термин «практически» используется в данном документе для охвата потенциального отсутствия завершенности, присущей многим биологическим и химическим явлениям.

[0097] *Лечение.* Используемые в данном документе термины «лечить», «лечение» или «подвергать лечению» относятся к любому способу, применяемому для частичного или полного ослабления, облегчения, смягчения, подавления, предупреждения, задержки начала проявления, уменьшения тяжести и/или снижения частоты возникновения одного или более симптомов или признаков конкретного заболевания, нарушения и/или состояния. Средство лечения можно вводить субъекту, у которого не проявляются признаки заболевания и/или проявляются только ранние признаки заболевания, с целью уменьшения риска развития патологии, ассоциированной с заболеванием.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0098] Настоящее изобретение предусматривает, среди прочего, усовершенствованные способы и фармацевтические композиции для лечения кистозного фиброза с использованием матричной РНК (мРНК), кодирующей сконструированный или мутантный белок регулятора трансмембранной проводимости при кистозном фиброзе (CFTR). В некоторых вариантах осуществления мРНК представляет собой кодон-оптимизированную мРНК. В конкретных вариантах осуществления сконструированные или мутантные белки CFTR достигают более высокой активности или стабильности, чем белок CFTR дикого типа. Раскрытые в данном документе мРНК, кодирующие сконструированные или мутантные белки CFTR, являются особенно применимыми для лечения кистозного фиброза с помощью терапевтических средств на основе мРНК.

### *Кистозный фиброз*

[0099] Настоящее изобретение может быть использовано для лечения субъекта, страдающего от кистозного фиброза или предрасположенного к нему. Кистозный фиброз представляет собой генетическое нарушение, характеризующееся мутациями в гене регулятора трансмембранной проводимости при кистозном фиброзе (CFTR). Белок CFTR функционирует в качестве канала, проходящего через мембрану клеток,

которые производят слизь, пот, слюну, слезы и пищеварительные ферменты. Канал переносит отрицательно заряженные частицы, называемые хлорид-ионами, в клетки и из них. Транспорт хлорид-ионов помогает контролировать движение воды в тканях, что необходимо для продуцирования жидкой, свободно текущей слизи. Слизь представляет собой скользящее вещество, которое смазывает и защищает слизистую оболочку дыхательных путей, пищеварительной системы, репродуктивной системы и других органов и тканей.

**[0100]** Респираторные симптомы кистозного фиброза включают постоянный кашель с образованием густой слизи (мокроты), хрипы, одышку, непереносимость физических упражнений, повторяющиеся инфекции легких и воспаление носовых ходов или заложенность носа. К пищеварительным симптомам кистозного фиброза относятся неприятный запах, жирный стул, плохой набор веса и рост, кишечная непроходимость, особенно у новорожденных (мекониевая непроходимость кишечника), и тяжелый запор.

***Кодон-оптимизированная мРНК, кодирующая CFTR***

**[0101]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы и композиции для доставки кодон-оптимизированной мРНК, кодирующей CFTR, субъекту для лечения кистозного фиброза. Подходящая кодон-оптимизированная мРНК CFTR кодирует любой полноразмерный белок CFTR, фрагмент или часть белка CFTR, которые могут заменять активность встречающегося в природе белка CFTR и/или уменьшать интенсивность, тяжесть и/или частоту одного или более симптомов, ассоциированных с кистозным фиброзом.

**[0102]** В некоторых вариантах осуществления подходящая кодон-оптимизированная последовательность мРНК представляет собой последовательность мРНК, кодирующую белок CFTR человека (hCFTR). Иллюстративная кодон-оптимизированная кодирующая последовательность мРНК CFTR и соответствующая аминокислотная последовательность показаны в **таблице 1**:

**Таблица 1. Иллюстративный кодон-оптимизированный CFTR человека**

<b>SEQ ID NO:1</b>	<b>AUGCAACGCUCUCCUCUUGAAAAGGCCUCGGUGGUGUCCAAGC UCUUCUUCUCGUGGACUAGACCCAUCCUGAGAAAGGGGUACAG ACAGCGCUUGGAGCUGUCCGAUAUCAAAAUCCCUCCGUG GACUCCGCGGACAACCUGUCCGAGAAGCUCGAGAGAGAAUGGG</b>
------------------------	--

ACAGAGAACUCGCCUCAAGAAGAACCCGAAGCUGAUUAAUGC  
GCUUAGGCGGUGCUUUUCUGGGCGGUUCAUGUUCUACGGCAUC  
UCCUCUACCUGGGAGAGGUCACCAAGGCCGUGCAGCCCUGU  
UGCUGGGACGGAUUAUUGCCUCCUACGACCCCGACAACAAGGA  
AGAAAGAAGCAUCGCUAUCUACUUGGGCAUCGGUCUGUGCCUG  
CUUUUCAUCGUCCGGACCCUCUUGUUGCAUCCUGCUAUUUUCG  
GCCUGCAUCACAUUGGCAUGCAGAUAGAAUUGCCAUGUUUC  
CCUGAUCUACAAGAAAACUCUGAAGCUCUCGAGCCGCGUGCUU  
GACAAGAUUCCAUCGGCCAGCUCGUGUCCCUGCUCUCCAACA  
AUCUGAACAAGUUCGACGAGGGCCUCGCCUCGGCCCACUUCGU  
GUGGAUCGCCCCUCUGCAAGUGGGCGCUUCUGAUGGGCCUGAUC  
UGGGAGCUGCUGCAAGCCUCGGCAUUCUGUGGGCUUGGAUUC  
UGAUCGUGCUGGCACUGUUCAGGCCGGACUGGGGGCGGAUGAU  
GAUGAAGUACAGGGACCAGAGAGCCGGAAAGAUUUCGAACGG  
CUGGUGAUCACUUCGGAAAUGAUCGAAAACAUCCAGUCAGUGA  
AGGCCUACUGCUGGGGAAGAGGCCAUGGAAAAGAUUGAAAA  
CCUCCGGCAAACCGAGCUGAAGCUGACCCGCAAGGCCGCUUAC  
GUGCGCUAUUUCACUCGUCCGCUUUCUUCUUCUCCGGGUUCU  
UCGUGGUGUUUCUCUCCGUGCUCCCCUACGCCUGAUUAAGGG  
AAUCAUCCUCAGGAAGAUUCUACCAUUCUUCUGUAUC  
GUGCUCGCAUGGCCGUGACCCGGCAGUUCCAUGGGCCGUGC  
AGACUUGGUACGACUCCUGGGAGCCAUAACAAGAUCAGGA  
CUUCCUUCAAAAGCAGGAGUACAAGACCCUCGAGUACAACCUG  
ACUACUACCGAGGUCGUGAUGGAAAACGUCACCGCCUUUUGGG  
AGGAGGGAUUUGGCGAACUGUUCGAGAAGGCCAAGCAGAACAA  
CAACAACCGCAAGACCUCGAACGGUGACGACUCCUCUUCUUU  
UCAACUUCAGCCUGCUCGGGACGCCCGUGCUGAAGGACAUA  
ACUUCAAGAUUCGAAAGAGGACAGCUCCUGGGCGGUGGCCGGAUC  
GACCGGAGCCGGAAAGACUCCUGCUGAUGGUGAUCAUGGGA  
GAGCUUGAACCUAGCGAGGGAAAGAUCAAGCACUCCGGCCGCA  
UCAGCUUCUGUAGCCAGUUUUCUGGAUCAUGCCCGGAACCAU  
UAAGGAAAACAUCAUCUUCGGCGUGUCCUACGAUGAAUACCGC  
UACCGGUCCGUGAUCAAAGCCUGCCAGCUGGAAGAGGAUAUUU  
CAAAGUUCGCGGAGAAAGAUACAUCGUGCUGGGCGAAGGGGG  
UAUUACCUUGUCGGGGGGCCAGCGGGCUAGAAUCUCGCUGGCC  
AGAGCCGUGUAUAAGGACGCCGACCUGUAUCUCCUGGACUCCC  
CCUUCGGAUACCUUGGACGUCCUGACCGAAAAGGAGAUCUUCGA  
AUCGUGCGUGUGCAAGCUGAUGGCUAACAAGACUCGCAUCCUC  
GUGACCUCCAAAUGGAGCACCUGAAGAAGGCAGACAAGAUUC  
UGAUUCUGCAUGAGGGGUCCUCCUACUUUUACGGCACCUUCUC  
GGAGUUGCAGAAUUGCAGCCCGACUUCUCAUCGAAGCUGAUG  
GGUUGCGACAGCUUCGACCAGUUCUCCGCCGAAAGAAGGAACU  
CGAUCCUGACGGAAACCUUGCACCGCUUCUCUUUGGAAGGCGA  
CGCCCCUGUGUCAUGGACCGAGACUAAGAAGCAGAGCUUCAAG  
CAGACCGGGGAAUUCGGCGAAAAGAGGAAGAACAGCAUCUUGA  
ACCCAUAUAACUCCAUCGCAAGUUCUCAAUCGUGCAAAAAGAC  
GCCACUGCAGAUGAACGGCAUUGAGGAGGACUCCGACGAACCC  
CUUGAGAGGCGCCUGUCCUGGUGCCGGACAGCGAGCAGGGAG

AAGCCAUCCUGCCUCGGAUUUCCGUGAUCUCCACUGGUCGAC  
GCUCCAAGCCC GGCGGCAGUCCGUGCUGAACCUGAUGACC  
CACAGCGUGAACCAGGGCCAAAACAUUCACCGCAAGACUACCG  
CAUCCACCCGGAAAGUGUCCUGGCACCUCAAGCGAAUCUUAC  
CGAGCUCGACAUCUACUCCCGGAGACUGUCGAGGAAACCGGG  
CUCGAAAUUCCGAAGAAUCAACGAGGAGGAUCUGAAAGAGU  
GCUUCUUCGACGAUAUGGAGUCGAUACCCGCCGUGACGACUUG  
GAACACUUUUCUGCGGUACAUCACUGUGCACAAGUCAUUGAUC  
UUCGUGCUGAUUUGGUGCCUGGUGAUUUUCCUGGCCGAGGUCG  
CGGCCUCACUGGUGGUGCUCUGGCUGUUGGGAAACACGCCUCU  
GCAAGACAAGGGAAACUCCACGCACUCGAGAAACAACAGCUAU  
GCCGUGAUUAUCACUCCACCUCUUAUUACGUGUUCUACA  
UCUACGUCGGAGUGGCGGAUACCCUGCUCGCGAUGGGUUUCUU  
CAGAGGACUGCCGUGGUCCACACCUUGAUCACCGUCAGCAAG  
AUUCUUCACCACAAGAUGUUGCAUAGCGUGCUGCAGGCCCCCA  
UGUCCACCCUCAACACUCUGAAGGCCGGAGGCAUUCUGAACAG  
AUUCUCCAAGGACAUCGCUAUCCUGGACGAUCUCCUGCCGCUU  
ACCAUCUUUGACUUAUCCAGCUGCUGCUGAUCGUGAUUGGAG  
CAAUCGCAGUGGUGGCGGUGCUGCAGCCUACAUUUUCGUGGC  
CACUGUGCCGGUCAUUGUGGCGUUAUCAUGCUGCGGGCCUAC  
UCCUCCAAACCAGCCAGCAGCUGAAGCAACUGGAAUCCGAGG  
GACGAUCCCCAUCUUCACUCACCUUGUGACGUCGUUGAAGGG  
ACUGUGGACCCUCCGGGCUUUCGGACGGCAGCCUACUUCGAA  
ACCCUCUUCACAAGGCCUGAACCUCACACCGCCAAUUGGUU  
CCUGUACCUGUCCACCCUGCGGUGGUUCCAGAUGCACAUCGAG  
AUGAUUUUCGUCAUCUUCUUAUCGCGGUCACAUAUCAGCA  
UCCUGACUACCGGAGAGGGAGAGGGACGGGUCGGAAUAAUCCU  
GACCCUCGCCAUGAACAUUAUGAGCACCCUGCAGUGGGGCAGUG  
AACAGCUCGAUCGACGUGGACAGCCUGAUGCGAAGCGUCAGCC  
GCGUGUUAAGUUAUCGACAUGCCUACUGAGGGGAAAACCCAC  
UAAGUCCACUAAGCCCUACAAAAAUGGCCAGCUGAGCAAGGUC  
AUGAUCAU CGAAAACUCCACGUGAAGAAGGACGAUAUUUGGC  
CCUCCGGAGGUCAAUUGACCGUGAAGGACCUGACCGCAAAGUA  
CACCGAGGGAGGAAACGCCAUUCUCGAAAACAUCAGCUUCUCC  
AUUUCGCCGGGACAGCGGGUCGGCCUUCUCGGGCGGACCGGUU  
CCGGGAAGUCAACUCUGCUGUCGGCUUCCUCCGGCUGCUGAA  
UACCGAGGGGGAAAUCCAAAUUGACGGCGUGUCUUGGGAUUCC  
AUUACUCUGCAGCAGUGGCGGAAGGCCUUCGGCGUGAUCCCCC  
AGAAGGUGUUAUCUUCUCGGGUACCUUCCGGAAGAACCUGGA  
UCCUACGAGCAGUGGAGCGACCAAGAAAUCUGGAAGGUCGCC  
GACGAGGUCGGCCUGCGCUCGUGAUUGAACAAUUUCCUGGAA  
AGCUGGACUUCGUGCUCGUCGACGGGGGAUGUGUCCUGUCGCA  
CGGACAUAAGCAGCUAUGUGCCUCGCACGGUCCGUGCUCUCC  
AAGGCCAAGAUUCUGCUGCUGGACGAACCUUCGGCCCACCGG  
AUCCGGUCACCUACCAGAUAUCAGGAGGACCCUGAAGCAGGC  
CUUUGCCGAUUGCACCGUGAUUCUCUGCGAGCACCGCAUCGAG  
GCCAUGCUGGAGUGCCAGCAGUUCUGGUCAUCGAGGAGAACA  
AGGUCCGCCAAUACGACUCCAUAUCAAAGCUCCUCAACGAGCG

	<p>GUCGCUGUUCAGACAAGCUAUUUCACCGUCCGAUAGAGUGAAG                  CUCUUCCCGCAUCGGAACAGCUCAAAGUGCAAUCGAAGCCGC                  AGAUCGCAGCCUUGAAGGAAGAGACUGAGGAAGAGGUGCAGGA                  CACCCGGCUUUA</p>
<p><b>SEQ ID                  NO:2</b></p>	<p><b>AUGCAGCGGUCCCCGCUCGAAAAGGCCAGUGUCGUGUCCAAAC</b>                  UCUUCUUCUCAUGGACUCGGCCUAUCCUUAGAAAGGGGUUUCG                  GCAGAGGCUUGAGUUGUCUGACAUCUACCAGAUCCCCUCGGUA                  GAUUCGGCGGAUAACCUCUCGGAGAAGCUCGAACGGGAAUGGG                  ACCGCGAACUCGCGUCUAAGAAAAACCCGAAGCUCAUCAACGC                  ACUGAGAAGGUGCUUCUUCUGGGCGGUUCAUGUUCUACGGUAUC                  UUCUUGUAUCUCGGGGAGGUCACAAAAGCAGUCCAACCCUGU                  UGUUGGGUCGCAUUAUCGCCUCGUACGACCCCGAUAACAAAGA                  AGAACGGAGCAUCGCGAUCUACCUCGGGAUCGGACUGUGUUUG                  CUUUUCAUCGUCAGAACACUUUUGUUGCAUCCAGCAAUCUUCG                  GCCUCCAUCACAUCGGUAUGCAGAUGCAGAAUCGCUAUGUUUAG                  CUUGAUCUACAAAAGACACUGAAACUCUCGUCGCGGGUGUUG                  GAUAAGAUUUCCAUCGGUCAGUUGGUGUCCUGCUUAGUAAUA                  ACCUCAACAAAUUCGAUGAGGGACUGGCGCUGGCACAUUUCGU                  GUGGAUUGCCCCGUUGCAAGUCGCCUUUUGAUGGGCCUUAUU                  UGGGAGCUGUUGCAGGCAUCUGCCUUUUGUGGCCUGGGGAUUUC                  UGAUUGUGUUGGCAUUGUUUCAGGCUGGGCUUGGGCGGAUGAU                  GAUGAAGUAUCGCGACCAGAGAGCGGGUAAAUCUCGGAAAGA                  CUCGUCAUCACUUCGGAAAUGAUCGAAAACAUCAGUCGGUCA                  AAGCCUAUUGCUGGGGAAGAAGCUAUGGAGAAGAUGAUUGAAA                  ACCUCCGCCAAACUGAGCUGAAACUGACCCGCAAGGCGGGCGUA                  UGUCCGGUAUUUCAAUUCGUCAGCGUUCUUCUUUCCGGGUUC                  UUCGUUGUCUUUCUCUCGGUUUUGCCUUAUGCCUUGAUUAAGG                  GGAUUAUCCUCCGCAAGAUUUUCACCACGAUUUCGUUCUGCAU                  UGUAUUGCGCAUUGGCAGUGACACGGCAAUUUCCGUGGGCCGUG                  CAGACAUGGU AUGACUCGCUUGGAGCGAUCAACAAA AUCCAAG                  ACUUCUUGCAAAAGCAAGAGUACAAGACCCUGGAGUACAUCU                  UACUACUACGGAGGUAGUAAUUGGAGA AUGUGACGGCUUUUUGG                  GAAGAGGGUUUUGGAGAACUGUUUGAGAAAGCAAAGCAGAAU                  AACAAACAACCGCAAGACCUCAAUUGGGGACGAUUCUCCUGUUU                  UCUCGAACUUCUCCCUGCUCGGAACACCCGUGUUGAAGGACAU                  CAUUUCAAGAUUGAGAGGGGACAGCUUCUCGCGGUAGCGGGA                  AGCACUGGUGCGGGAAAACUAGCCUCUUGAUGGUGAUUAUGG                  GGGAGCUUGAGCCCAGCGAGGGGAAGAUUAAACACUCCGGGCG                  UAUCUCAUUCUGUAGCCAGUUUUC AUGGAUCAUGCCCGGAACC                  AUUAAAGAGAAUCAUUAUUCGGAGUAUCCUAUGAUGAGUACC                  GAUACAGAUCGGUCAUUAAGGCGUGCCAGUUGGAAGAGGACAU                  UUCUAAGUUCGCCGAGAAGGAUAACAUCGUCUUGGGAGAAGGG                  GGUAAUACAUUGUCGGGAGGGCAGCGAGCGCGGAUCAGCCUCG                  CGAGAGCGGUAUACAAAGAUGCAGAUUUGUAUCUGCUUGAUUC                  ACCGUUUGGAUACCUCGACGUUUGACAGAAAAGAAAUCUUC                  GAGUCGUGCGUGUGUAAACUUAUGGCUAAUAAGACGAGAAUCC                  UGGUGACAUCAAAAUGGAACACCUUAAGAAGGCGGACAAGAU                  CCUGAUCCUCCACGAAGGAUCGUCCUACUUUACGGCACUUUC</p>

UCAGAGUUGCAAACUUGCAGCCGGACUUCUCAAGCAAACUCA  
UGGGGUGUGACUCAUUCGACCAGUUCAGCGCGGAACGGCGGAA  
CUCGAUCUUGACGGAAACGCUGCACCGAUUCUCGCUUGAGGGU  
GAUGCCCCGGUAUCGUGGACCGAGACAAAGAAGCAGUCGUUUA  
AGCAGACAGGAGAAUUUGGUGAGAAAAGAAAGAACAGUAUCU  
UGAAUCCUAUUAACUCAAUUCGCAAGUUCUCAUUCGUCCAGAA  
AACUCCACUGCAGAUGAAUGGAAUUGAAGAGGAUUCGGACGAA  
CCCCUGGAGCGCAGGCCUUAGCCUCGUGCCGGAUUCAGAGCAAG  
GGGAGGCCAUUCUUCGCCGGAUUUCGGUGAUUUAACCGGACC  
UACACUUCAGGGCGAGGCCGAAGGCCAUCCGUGCUCACCCUCAUG  
ACGCAUUCGGUAAACCAGGGGCAAACAUCACCGCAAACGA  
CGGCCUCAACGAGAAAAGUGUCACUUGCACCCCAGGCCGAAUU  
GACUGAACUCGACAUCUACAGCCGUAGGCCUUUCGCAAGAAACC  
GGACUUGAGAUCAGCGAAGAAUCAAUGAAGAAGAUUUGAAA  
GAGUGUUUCUUUGAUGACAUGGAAUCAAUCCAGCGGUGACAA  
CGUGGAACACAUAUCUUGCGUUACAUCACGGUGCACAAGUCCUU  
GAUUUUCGUCCUCAUCUGGUGUCUCGUGAUCUUUCUCGCUGAG  
GUCGCAGCGUCACUUGUGGUCCUCUGGCUGCUUGGUAUACGC  
CCUUGCAAGACAAAGGCCAAUUCUACACACUCAAGAAACAAUUC  
CUAUGCCGUGAUUAUCACUUCUACAAGCUCGUAAUACGUGUUU  
UACAUCUACGUAGGAGUGGCCGACACUCUCGCUCGCGAUGGGUU  
UCUUCGAGGACUCCACUCGUUCACACGCUUAUCACUGUCUCC  
AAGAUUCUCCACCAUAAGAUGCUCUAUAGCGUACUGCAGGCUC  
CCAUGUCCACCUUGAAUACGCUCAAGGCCGGGAGGUUUUUGAA  
UCGCUUCUCAAAAGAUAUUGCAAUUUUGGAUGACCUUCUGCCC  
CUGACGAUCUUCGACUUCAUCCAGUUGUUGCUGAUCGUGAUUG  
GGGCUAUUGCAGUAGUCGCUGUCCUCCAGCCUACAUUUUUGU  
CGCGACCGUUCGGUGAUCGUGGGCGUUUAUCAUGCUCGGGGCC  
UAUUUCUUGCAGACGUCACAGCAGCUUAAGCAACUGGAGUCUG  
AAGGGAGGUCGCCUAUCUUUACGCAUCUUGUGACCAGUUUGAA  
GGGAUUGUGGACGUUGCGCGCCUUUGGCAGGCAGCCCUACUUU  
GAAACACUGUCCACAAAGCGCUGAAUCUCCAUAACGGCAAUU  
GGUUUUUGUAUUUGAGUACCCUCCGAUGGUUUCAGAUGCAGU  
UGAGAUGAUUUUUGUGAUCUUCUUUAUCGCGGUGACUUUUUUC  
UCCAUCUUGACCACGGGAGAGGGCGAGGGACGGGUCGGUAUUA  
UCCUGACACUCGCCAUGAACAUUAUGAGCACUUUGCAGUGGGC  
AGUGAACAGCUCGAUUGAUGUGGAUAGCCUGAUGAGGUCCGU  
UCGAGGGUCUUUAAGUUCAUCGACAUGCCGACGGAGGGAAAGC  
CCACAAAAGUACGAAACCCUAUAAGAAUGGGCAAUUGAGUAA  
GGUAAUGAUCAUUCGAGAACAGUCACGUGAAGAAGGAUGACAUC  
UGGCCUAGCGGGGGUCAGAUGACCGUGAAGGACCUGACGGCAA  
AAUACACCGAGGGAGGGAACGCAAUCCUUGAAAACAUCUCGUU  
CAGCAUUAGCCCCGGUCAGCGUGUGGGGUUGCUCGGGAGGACC  
GGGUCAGGAAAUCGACGUUGCUCGCGCCUUCUUGAGACUUC  
UGAAUACAGAGGGUGAGAUCAGAUUCGACGGCGUUUCGUGGGA  
UAGCAUCACCUUGCAGCAGUGGCGGAAAGCGUUUGGAGUAAUC  
CCCCAAAAGGUCUUUAUCUUUAGCGGAACCUUCCGAAAGAAUC  
UCGAUCCUUAUGAACAGUGGUCAGAUCAAGAGAUUUGGAAAGU

	<p>CGCGGACGAGGUUGGCCUUCGGAGUGUAAUUCGAGCAGUUUCCG  GGAAAACUCGACUUUGUCCUUGUAGAUGGGGGAUGCGUCCUGU  CGCAUGGGCACAAGCAGCUCAUGUGCCUGGCGCGAUCCGUCCU  CUCUAAAGCGAAAAUUCUUCUCUUGGAUGAACCUUCGGCCCAU  CUGGACCCGGUAAACGU AUCAGAUCAUCAGAAGGACACUUAAGC  AGGCGUUUGCCGACUGCACGGUGAUUCUCUGUGAGCAUCGU AU  CGAGGCCAUGCUCGAAUGCCAGCAAUUUCUUGUCAUCGAAGAG  AAUAAGGUCCGCCAGUACGACUCCA UCCAGAAGCUGCUUAAUG  AGAGAUCAUUGUUCGGCAGGCGAUUUCACCAUCCGAUAGGGU  GAAACUUUUUCCACACAGAAAUUCGUCGAAGUGCAAGUCCAAA  CCGCAGAU CGCGGCCUUGAAAGAAGAGACUGAAGAAGAAGUUC  AAGACACGCGUCUUAA</p>
<p><b>Последова  тельность  белка  CFTR  человека</b></p>	<p>MQRSPLEKASVVS KLFFSWTRPILRKGYRQRLELSDIYQIPSVDSADN  LSEKLEREWDRELASKKNPKLINALRRCFFWRFMFYGFILYLGEVTK  AVQPLLLGRIIASYDPDNKEERSIAIYLGIGLCLLFIVR TLLLHPAIFGL  HHIGMQMRIAMFSLIYKKTLLKSSRVL DKISIGQLVSLLSNNLNKFDE  GLALAHFVWIAPLQVALLMGLIWELLQASAF CGLGFLIVLALFQAGL  GRMMM KYRDQRAGKISERLVITSEMIENIQSVKAYCWE EAMEKMIE  NLRQTELKLRKAA YVRYFNSSAFFSGFFVFLSVLPYALIKGIILR  KIFTTISFCIVLRMAVTRQFPWA VQTWYDSLGA INKIQDFLQKQEK  TLEYNLTTTEVVMENVTA FWEEGFGE LFEKAKQNNNNR KTSNGDD  SLFFSNFSL LGTPVLKDINFKIERGQLLAVAGSTGAGKTSLLMVIMGE  LEPSEGKIKHSGRISFCSQFSWIMP GTIKENIIFGVS YDEYRYSVIKA  CQLEEDISKFAEKDNIVL GEGGITLSSGQRARISLARA VYKDADLYL  LDSPFGYLDV LTEKEIFESCVC KLMANKTRILVTSKMEHLKKADKILI  LHEGSSYFYGTFSELQNLQP DFSSKLMGCDSFDQFSAERRNSIL TETL  HRFSLEGDAPVSWTETKKQSFKQTGEFGEKRKNSILNPINSIRKFSIV  QKTPLQMNGIEEDSDEPLERRLSL VPDSEQGEAILPRISVISTGPTLQA  RRRQSVLNLMTHSV NQGQNIHRKTTASTRKVSLAPQANLTELDIYSR  RLSQETGLEISEEINEEDLKECFDDMESIPAVTTWNTYLRYITVHKS  LIFVLIWCLVIFLAEVAASLVVLWLLGNTPLQDKGNSTHSRNN SYAV  IITSTSSYVFIYVGVADTLLAMGFFRGLPLVHTLITVSKILHHKML  HSV LQAPMSTLNTLKAGGILNRFSKDIAILDDLLPTIFDFIQLLLIVIG  AIAVVA VLQPYIFVATVPVIVAFIMLRAYFLQTSQQLKQLESEGRSPI  FTHLVTSLKGLWTLRAFGRQPYFETLFHKALNLHTANWFLYLSTLR  WFQMRIEMIFVIFIAVTFISILT TGEGEGRVGIILTLAMNIMSTLQWA  VNSSIDVDSL MRSVSRVFKFIDMPTEGKPTKSTKPYKNGQLSKVM IIE  NSHVKKDDIWPSGGQMTVKDLTAKYTEGGNAILENISFSISPGQRVG  LLGRTGSGKSTLLSAFLRLLNTEGEIQIDGVS WDSITLQQWRKAFGVI  PQKVFIFSGTFRKNLDPYEQWSDQEIWKVADEVGLRSVIEQFP GKLD  FVLVDGGCVLSHG HKQLMCLARSVLSKAKILLDEPSAHLDPV TYQI  IRRTLKQAFADCTVILCEHRIEAMLE CQQFLVIEENKVRQYDSIQKLL  NERSLFRQAISPSDRVKLFPHRNSSKCKSKPQIAALKEETEEEVQDTR  L (SEQ ID NO: 3)</p>

[0103]           Дополнительные иллюстративные кодон-оптимизированные последовательности мРНК описаны ниже, например, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8,

обе из которых включают 5'- и 3'- нетранслируемые области, обрамляющие кодон-оптимизированную мРНК, кодирующую hCFTR, и SEQ ID NO: 27 — SEQ ID NO: 40.

Сконструированные или мутантные белки CFTR

[0104] В некоторых вариантах осуществления подходящая последовательность мРНК кодирует сконструированный или мутантный белок CFTR. В некоторых вариантах осуществления последовательность мРНК может быть кодон-оптимизированной. В некоторых вариантах осуществления сконструированный или мутантный белок CFTR может представлять собой модифицированный белок CFTR, содержащий одну или более аминокислотных замен, делеций и/или вставок, которые повышают активность и/или стабильность по сравнению с белком CFTR дикого типа или встречающимся в природе. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления модифицированная аминокислотная последовательность CFTR характеризуется 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95, 98%, 99% или большей идентичностью с CFTR дикого типа. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления модифицированный CFTR кодируется мРНК, которая характеризуется 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95, 98%, 99% или большей идентичностью с мРНК, кодирующей белок CFTR дикого типа.

*Мутации, обеспечивающие получение активированного CFTR*

[0105] CFTR представляет собой один полипептид, содержащий N-концевой мотив лассо, два трансмембранных домена (TMD) и два нуклеотид-связывающих домена (NBD). В отличие от других переносчиков суперсемейства АТФ-связывающей кассеты (ABC), CFTR также содержит цитоплазматический регуляторный (R) домен, состоящий из ~200 остатков, который регулирует активность CFTR. Активность CFTR регулируется зависимым от протеинкиназы А фосфорилированием и АТФ. R-домен содержит 19 предсказанных сайтов для протеинкиназы А (РКА); до шести были обнаружены фосфорилированными *in vivo*. Фосфорилирование R-домена увеличивает вероятность открытия канала CFTR, а также стимулирует гидролиз АТФ с помощью CFTR. Кроме того, устранение гидролиза АТФ продлевает время жизни открытого канала CFTR (активированный CFTR), а мутирование цитозольных петель способствует активности CFTR независимо от АТФ.

[0106] В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR может содержать одну или более модификаций, обеспечивающих конститутивную активность CFTR. В некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций обеспечивают большую активность CFTR по сравнению с активностью белка CFTR дикого типа. В частности, сконструированный белок CFTR может содержать одну или более модификаций, которые имитируют фосфорилированный остаток в R-домене (фосфомиметическая мутация R-домена). В некоторых вариантах осуществления остатки серина (S) или треонина (T) заменяют на остатки аспарагиновой кислоты (D), чтобы имитировать состояния фосфорилирования. В некоторых вариантах осуществления остатки серина (S) или треонина (T) заменяют на остатки глутаминовой кислоты (E). В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR может содержать одну или более модификаций по остаткам S422, S660, S670, S686, T690, S700, S712, S737, S753, S768, T787, T788, S790, S795 и S813. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR может содержать одну или более модификаций, которые включают S422D, S660D, S670D, S686D, T690D, S700D, S712D, S737D, S753D, S768D, T787D, T788D, S790D, S795D и S813D. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит модификации S660D, S737D, S795D и S813D. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит модификации S660D, S686D, S700D, S737D, S795D и S813D. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит модификации S660D, S686D, S700D, S712D, S737D, S768D, S795D и S813D. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит модификации S422D, S660D, S670D, S686D, T690D, S700D, S712D, S753D, T787D, T788D, S790D, S795D и S813D. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит модификации S422D, S660D, S670D, S686D, T690D, S700D, S712D, S737D, S753D, S768D, T787D, T788D, S790D, S795D и S813D.

[0107] В некоторых вариантах осуществления увеличение количества фосфомиметических мутаций CFTR приводит к повышенной чувствительности к активации. В некоторых вариантах осуществления увеличение количества фосфомиметических мутаций CFTR приводит к повышенной чувствительности к активации форсколином. В некоторых вариантах осуществления число

фосфомиметических мутаций CFTR включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных замен.

[0108] В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR имеет низкий иммуногенный потенциал или не имеет иммуногенного потенциала. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR имеет низкий иммуногенный потенциал. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR не имеет иммуногенного потенциала. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR не создает и не усиливает потенциал эпитопов цитотоксических Т-лимфоцитов. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR не создает потенциал эпитопов цитотоксических Т-лимфоцитов. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR не усиливает потенциал эпитопов цитотоксических Т-лимфоцитов. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR не обуславливает повышенной цитотоксичности по сравнению с контрольной средой-носителем.

[0109] В некоторых вариантах осуществления сконструированный кодон-оптимизированный CFTR обладает повышенной активностью по сравнению с CFTR, не являющимся кодон-оптимизированным.

[0110] В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит модификации по остаткам S660 и S737, S795 и S813. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит модификации по остаткам S660, S686, S700, S737 и S795. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит модификации по остаткам S660, S686, S700, S737, S795 и S813. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит модификации по остаткам S422, S660, S670, S686, S690, S700, S712, S737, S753, S768, S787, S788, S790, S795 и S813. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит модификации по остаткам S422, S660, S670, S686, S690, S700, S712, S753, S787, S788, S790, S795 и S813. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит модификации по остаткам S660, S686, S700, S712, S737, S768, S795 и S813. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит

модификации по остатку K978. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит модификации по остатку E1371. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит модификации по остаткам S422, S660, S670, S686, S690, S700, S712, S753, S787, S788, S790, S795, S813 и E1371. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации S660D и S737D, S795D и S813D. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации S660D, S686D, S700D, S737D и S795D. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации S660D, S686D, S700D, S737D, S795D и S813D. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации S422D, S660D, S670D, S686D, S690D, S700D, S712D, S737D, S753D, S768D, S787D, S788D, S790D, S795D и S813D. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации S422A, S660A, S670A, S686A, S690A, S700A, S712A, S737A, S753A, S768A, S787A, S788A, S790A, S795A и S813A. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации S422D, S660D, S670D, S686D, S690D, S700D, S712D, S753D, S787D, S788D, S790D, S795D и S813D. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации S660D, S686D, S700D, S712D, S737D, S768D, S795D и S813D. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутацию K978C. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутацию E1371Q. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации S422A, S660A, S670A, S686A, S690A, S700A, S712A, S753A, S787A, S788A, S790A, S795A, S813A и E1371Q. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации S422D, S660D, S670D, S686D, S690D, S700D, S712D, S753D, S787D, S788D, S790D, S795D, S813D и E1371Q.

[0111] В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR может содержать одну или более модификаций для устранения его АТФазной активности (мутация дефицита гидролиза АТФ). В некоторых вариантах осуществления каталитический остаток в домене NBD2 CFTR заменяется, чтобы устранить его АТФазную активность. В конкретных вариантах осуществления

каталитическим остатком является E1371. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит модификацию E1371Q.

[0112] В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR может содержать модификацию цитозольных петель, которая способствует активности канала CFTR в отсутствие АТФ (мутация, обеспечивающая АТФ-независимую активность). В некоторых вариантах осуществления остаток K978 в цитозольной петле модифицируют для достижения конститутивной активности. В некоторых вариантах осуществления K978 заменяют на цистеин, серин или пролин. В конкретных вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутацию K978C.

[0113] В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR может содержать любые комбинации модификаций для получения белка CFTR, обладающего большей активностью по сравнению с белком CFTR дикого типа.

*Мутации, обеспечивающие увеличение стабильности/ переноса белка CFTR*

[0114] Посттрансляционная модификация может происходить во множестве внутриклеточных сайтов и изменять судьбу нативных и поврежденных белков. Как белки CFTR дикого типа, так и мутантные варианты белка CFTR подвергаются убиквитинированию по нескольким остаткам лизина в белках и в одном или нескольких субклеточных участках. Есть несколько потенциальных остатков лизина, к которым можно добавить убиквитин, в CFTR для стабилизации белка. На белке CFTR есть дополнительные сайты, которые участвуют в инициации протеолиза. Например, убиквитинированные остатки K710, K716 и K1041 стабилизируют CFTR дикого типа, защищая его от протеолиза. Модификации K14R и K68R приводят к увеличению полосы С, соответствующей зрелому CFTR, что может быть усилено ингибированием протеасом (но не лизосом), обеспечивая перенос на поверхность. Количество CFTR в случае мутантного варианта с K1041R было резко снижено и состояло из полос А/В. Мутантный вариант K1218R увеличивает общий CFTR и CFTR клеточной поверхности, который дополнительно накапливается за счет ингибирования протеасом и лизосом.

[0115] В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR может содержать одну или более модификаций, обеспечивающих повышенную стабильность белка CFTR по сравнению с встречающимся в природе белком CFTR (мутантный вариант с повышенной стабильностью). В частности, сконструированный белок CFTR может содержать одну или более модификаций, которые обеспечивают удаление сайта убиквитинирования в белке CFTR. В некоторых вариантах осуществления сайт убиквитинирования представляет собой K14, K68, K710, K716, K1041, K1080 или K1218. В некоторых вариантах осуществления остаток лизина заменяют на остаток аргинина для удаления сайтов убиквитинирования. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит одну или более модификаций K14R, K68R, K710R, K716R, K1041R, K1080R и K1218R.

[0116] В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит модификации по остатку K14. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит модификации по остатку K68. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит модификации по остаткам K14 и K68. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит модификации по остатку K1218. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит модификации по остаткам K68 и K1218. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит модификации по остаткам K14 и K1218. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит модификации по остаткам K14, K68 и K1218. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит модификации по остатку K710. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит модификации по остатку K716. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит модификации по остаткам K710 и K716. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит модификации по остатку K1041. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит модификации по остаткам K710, R716 и K1041.

[0117] В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутацию K14R. В некоторых вариантах осуществления сконструированный

белок CFTR содержит мутацию K68R. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации K14R и K68R. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутацию K1218R. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации K68R и K1218R. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации K14R и K1218R. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации K14R, K68R и K1218R. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутацию K710R. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутацию K716R. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации K710R и K716R. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутацию K1041R. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации K710R, R716R и K1041R.

**[0118]** В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR может содержать любую комбинацию модификаций, обеспечивающих получение мутантных вариантов с имитацией фосфорилированного остатка в R-домене, АТФ-независимой активностью, дефицитом гидролиза АТФ и повышенной стабильностью. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит одну или более мутаций по остаткам K14, K68, S422, S660, S670, S686, S700, K710, S712, K716, S737, S753, S768, T787, T786, S790, S795, S813, K978, K1041, K1080, K1218, E1371 и их комбинации. В конкретных вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит комбинацию мутаций, перечисленных в **таблице 2**.

**[0119]** В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит модификации по остаткам S660, S737, S795, S813 и K14. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит модификации по остаткам S660, S737, S795, S813 и K68. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит модификации по остаткам S660, S737, S795, S813 и K1218. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит модификации по остаткам S660, S737, S795, S813, K14 и K68. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит





S660, S686, S700, S737, S795, K978, E1371, K14 и K1218. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит модификации по остаткам S660, S686, S700, S737, S795, K978, E1371, K68 и K1218. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит модификации по остаткам S660, S686, S700, S737, S795, E1371, K14, K68, K978 и K1218.

[0120] В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации S660D, S737D, S795D, S813D и K14R. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации S660D, S737D, S795D, S813D и K68R. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации S660D, S737D, S795D, S813D и K1218R. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации S660D, S737D, S795D, S813D, K14R и K68R. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации S660D, S737D, S795D, S813D, K14R и K1218R. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации S660D, S737D, S795D, S813D, K68R и K1218R. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации S660D, S737D, S795D, S813D, K14R, K68R и K1218R. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации S660D, S686D, S700D, S737D, S795D и K14R. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации S660D, S686D, S700D, S737D, S795D и K68R. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации S660D, S686D, S700D, S737D, S795D и K1218R. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации S660D, S686D, S700D, S737D, S795D, K14R и K68R. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации S660D, S686D, S700D, S737D, S795D, K14R и K1218R. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации S660D, S686D, S700D, S737D, S795D, K68R и K1218R. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации S660D, S686D, S700D, S737D, S795D, K14R, K68R и K1218R. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации K978C и K14R. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации K978C и K68R. В некоторых вариантах осуществления



сконструированный белок CFTR содержит мутации S660D, S686D, S700D, S737D, S795D, K978C, E1371Q и K68R. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации S660D, S686D, S700D, S737D, S795D, K978C, E1371Q и K1218R. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации S660D, S686D, S700D, S737D, S795D, K978C, E1371Q, K14R и K68R. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации S660D, S686D, S700D, S737D, S795D, K978C, E1371Q, K14R и K1218R. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации S660D, S686D, S700D, S737D, S795D, K978C, E1371Q, K68R и K1218R. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации S660D, S686D, S700D, S737D, S795D, E1371Q, K14R, K68R и K1218R. В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации S660D, S686D, S700D, S737D, S795D, E1371Q, K14R, K68R, K978C и K1218R.

**Таблица 2. Сконструированные белки CFTR**

Сконструированный CFTR	Мутация, обеспечивающая получение активированного CFTR								Мутация, обеспечивающая получение стабильного CFTR		
	S660	S686	S700	S737	S795	S813	K978	E1371	K14	K68	K1218
A											
B	D			D	D	D					
C	D	D	D	D	D						
D							C				
E								Q			
F									R		
G										R	
H									R	R	
I											R
J										R	R
K									R		R
L									R	R	R
M	D			D	D	D			R	R	R

N	D	D	D	D	D				R	R	R
O							C		R	R	R
P								Q	R	R	R
Q	D	D	D	D	D	D		Q			
R	D	D	D	D	D	D		Q	R	R	R
S	D	D	D	D	D	D	C	Q	R	R	R
T	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

\*X = любая аминокислота

[0121] В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации S660D, S737D, S795D и S813D. В некоторых вариантах осуществления мРНК, подходящая для настоящего изобретения, кодирует аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше гомологична SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления мРНК, подходящая для настоящего изобретения, имеет нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентична SEQ ID NO: 45.

[0122] В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутации S660D, S686D, S700D, S737D, S795D и S813D. В некоторых вариантах осуществления мРНК, подходящая для настоящего изобретения, кодирует аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше гомологична SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления мРНК, подходящая для настоящего изобретения, имеет нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентична SEQ ID NO: 46.

[0123] В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутацию K978C. В некоторых вариантах осуществления мРНК, подходящая для настоящего изобретения, кодирует аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше гомологична SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления мРНК, подходящая для настоящего

изобретения, имеет нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентична SEQ ID NO: 47.

**[0124]** В некоторых вариантах осуществления сконструированный белок CFTR содержит мутацию E1371Q. В некоторых вариантах осуществления мРНК, подходящая для настоящего изобретения, кодирует аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше гомологична SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления мРНК, подходящая для настоящего изобретения, имеет нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентична SEQ ID NO: 48.

**Таблица 3. Иллюстративные последовательности сконструированного белка CFTR**

<b>SEQ ID NO:41</b>	MQRSPLEKASVVSKLFFSWTRPILRKGQRLELSDIYQIPSVDSADN LSEKLEREWDRELASKKNPKLINALRRCFFWRFMFYGIFLYLGEVTK AVQPLLLGRIIASYDPDNKEERSIAIYLGIGLCLLFIVRTLHHPAIFGL HHIGMQMRIAMFSLIYKKTLLKSSRVLDKISIGQLVSLLSNNLNKFDE GLALAHFVWIAPLQVALLMGLIWELLQASAFCLGFLIVLALFQAGL GRMMMKEYRDQRAGKISERLVITSEMIENIQSVKAYCWEWEAMEKMIE NLRQTELKLRKAA YVRYFNSSAFFSGFFVFLSVLPYALIKGIILR KIFTTISFCIVLRMAVTRQFPWAVQTWYDSLGAINKIQDFLQKQYK TLEYNLTTTEVVMENVTAFWEEGFGELFEKAKQNNNNRKTSSNGDD SLFFSNFSLGTPVLKDINFKIERGQLLAVAGSTGAGKTSLLMVIMGE LEPSEGKIKHSGRISFCSQFSWIMPGTIKENIIFGVS YDEYRYSVIKA CQLEEDISKFAEKDNIVLGEGGITLSGGQRARISLARAVYKDADLYL LDSPFGYLDVLTEKEIFESCVCCLMANKTRILVTSKMEHLKKADKILI LHEGSSYFYGTSELQNLQPDFSSKLMGCDSFDQFSAERRNDILTETL HRFSLEGDAPVSWTETKKQSFQKQTFGEFGEKRKNSILNPINSIRKFSIV QKTPLQMNGIEEDSDEPLERRLDLVPDSEQGEAILPRISVISTGPTLQA RRRQSVLNLMTHSV NQGQNIHRKTTASTRKVDLAPQANLTELDIYS RRLDQETGLEISEEINEEDLKECFDDMESIPAVTTWNTYLRYITVHK SLIFVLIWCLVIFLAEVAASLVVLWLLGNTPLQDKGNSTHSRNNNSYA VIITSTSSYYVFYIYVGVADTLLAMGFFRGLPLVHTLITVSKILHHKM LHSV LQAPMSTLNTLKAGGILNRFSKDIAILDLLPLTIFDFIQLLLIVI GAIAVVAVLQPYIFVATVPVIVAFIMLRA YFLQTSQQLKQLESEGRSP IFTHLVTSLKGLWTLRAFGRRQPYFETLFHK ALNLHTANWFLYLSTLRWFQMRIEMIFVIFIAVTFISILTTGEGEGRV GIILTLAMNIMSTLQWAVNSSIDVDSL MRSVSRVFKFIDMPTEGKPT KSTKPYKNGQLSKVMIENSHVKKDDIWPSGGQMTVKDLTAKYTEG
---------------------	--

	<p>GNAILENISFSISPGQRVGLLGRTGSGKSTLLSAFLRLLNTEGEIQIDG          VSWDSITLQQWRKAFGVIPQKVFIFSGTFRKNLDPYEQWSDQEIWK          VADEVGLRSVIEQFPGKLD FVLVDGGCVLSHGKQLMCLARSVLSK          AKILLLDEPSAHLDPVTYQIIRRTLKQAFADCTVILCEHRIEAMLECQ          QFLVIEENKVRQYDSIQKLLNERSLFRQAISPSDRVKLFPHRNSSKCK          SKPQIAALKEETEEEVQDTRL (SEQ ID NO: 41)</p>
<p><b>SEQ ID NO:42</b></p>	<p>MQRSPLEKASVVSKLFFSWTRPILRKGYRQRLELSDIYQIPSVDSADN          LSEKLEREWDRRELASKKNPKLINALRRCFFWRFMFYGFILYLGEVTK          AVQPLLLGRIIASYDPDNKEERSIAIYLGIGLCLLFIVRTLLLHPAIFGL          HHIGMQMRIAMFSLIYKKTLLSSRVLDKISIGQLVSLLSNNLNKFDE          GLALAHFVWIAPLQVALLMGLIWELLQASAFCLGLFLIVLALFQAGL          GRMMMKEYRDQRAGKISERLVITSEMIENIQSVKAYCWEEAMEKMIE          NLRQTELKLRKAA YVRYFNSSAFFSGFFVVFLSVLPYALIKGIILR          KIFTTISFCIVLRMAVTRQFPWAVQTWYDSLGAINKIQDFLQKQEYK          TLEYNLTTTEVVMENVTAFWEEGFGELFEKAKQNNNNRKTSSNGDD          SLFFSNFSLLGTPVLKDINFKIERGQLLAVAGSTGAGKTSLLMVIMGE          LEPSEGKIKHSGRISFCSQFSWIMPGTIKENIIFGVSYDEYRYSVIKA          CQLEEDISKFAEKDNIVLGEGGITLSGGQRARISLARA VYKDADLYL          LDSPFGYLDVLTEKEIFESCVCCLMANKTRILVTSKMEHLKKADKILI          LHEGSSYFYGTSELQNLQPDFSSKLMGCDSFDQFSAERRNDILTETL          HRFSLEGDAPVSWTETKKQDFKQTGEFGEKRKNDILNPINSIRKFSIV          QKTPLQMNGIEEDSDEPLERRLDLVPDSEQGEAILPRISVISTGPTLQA          RRRQSVLNLMTHSVNOGQNIHRKTTASTRKVDLAPQANLTELDIYS          RRLDQETGLEISEEINEEDLKECFDDMESIPAVTTWNTYLR YITVHK          SLIFVLIWCLVIFLAEVAASLVVLWLLGNTPLQDKGNSTHSRNN SYA          VIITSTSSYYVFYIYVGVADTLLAMGFFRGLPLVHTLITVSKILHHKM          LHSV LQAPMSTLNTLKAGGILNRFSKDIAILDLLPLTIFDFIQLLLIVI          GAIAVVAVLQPYIFVATVPVIVAFIMLRA YFLQTSQQLKQLESEGRSP          IFTHLVTSLKGLWTLRAFGROPYFETLFHKALNLHTANWFLYLSTLR          WFQMRIEMIFVIFIAVTFISILTTGEGEGRVGIILTLAMNIMSTLQWA          VNSSIDVDSL MRSVSRVFKFIDMPTEGKPTKSTKPYKNGQLSKVMIE          NSHVKKDDIWPSGGQMTVKDLTAKYTEGGNAILENISFSISPGQRVG          LLGRTGSGKSTLLSAFLRLLNTEGEIQIDGVSWDSITLQQWRKAFGVI          PQKVFIFSGTFRKNLDPYEQWSDQEIWKVADEVGLRSVIEQFPGKLD          FVLVDGGCVLSHGKQLMCLARSVLSKAKILLLDEPSAHLDPVTYQI          IIRRTLKQAFADCTVILCEHRIEAMLECQQFLVIEENKVRQYDSIQKLL          NERSLFRQAISPSDRVKLFPHRNSSKCKSKPQIAALKEETEEEVQDTR          L (SEQ ID NO: 42)</p>
<p><b>SEQ ID NO:43</b></p>	<p>MQRSPLEKASVVSKLFFSWTRPILRKGYRQRLELSDIYQIPSVDSADN          LSEKLEREWDRRELASKKNPKLINALRRCFFWRFMFYGFILYLGEVTK          AVQPLLLGRIIASYDPDNKEERSIAIYLGIGLCLLFIVRTLLLHPAIFGL          HHIGMQMRIAMFSLIYKKTLLSSRVLDKISIGQLVSLLSNNLNKFDE          GLALAHFVWIAPLQVALLMGLIWELLQASAFCLGLFLIVLALFQAGL          GRMMMKEYRDQRAGKISERLVITSEMIENIQSVKAYCWEEAMEKMIE          NLRQTELKLRKAA YVRYFNSSAFFSGFFVVFLSVLPYALIKGIILR          KIFTTISFCIVLRMAVTRQFPWAVQTWYDSLGAINKIQDFLQKQEYK</p>

	<p>TLEYNLTTTEVVMENVTAFWEEGFGELFEKAKQNNNNNRKTSNGDD  SLFFSNFSLLGTPVLKDINFKIERGQLLAVAGSTGAGKTSLLMVIMGE  LEPSEGKIKHSGRISFCSQFSWIMPGTIKENIIFGVSYDEYRYSVIKA  CQLEEDISKFAEKDNIVLGEGGITLSSGGQRARISLARAVYKDADLYL  LDSPFGYLDVLTEKEIFESCVCCKLMANKTRILVTSKMEHLKKADKILI  LHEGSSYFYGTFSELQNLQPDFSSKLMGCDSFDQFSAERRNSILTETL  HRFSLEGDAPVSWTETKKQSFKQTGEFGEKRKNSILNPINSIRKFSIV  QKTPLQMNGIEEDSDEPLERRLSLVPDSEQGEAILPRISVISTGPTLQA  RRRQSVLNLMTHSVNOGQNIHRKTTASTRKVSLAPQANLTELDIYSR  RLSQUETGLEISEEINEEDLKECFDDMESIPAVTTWNTYLR YITVHKS  LIFVLIWCLVIFLAEVAASLVVLWLLGNTPLQDKGNSTHSRNNNSYAV  IITSTSSYVFIYVGVADTLLAMGFFRGLPLVHTLITVSKILHHKML  HSV LQAPMSTLNTLKAGGILNRFSCDIAILDLLPLTIFDFIQLLLIVIG  AIAVVAVLQPYIFVATVPVIVAFIMLRAYFLQTSQQLKQLESEGRSPI  FTHLVTSLKGLWTLRAFGRQPYFETLFHKALNLHTANWFLYLSTLR  WFQMRIEMIFVIFIAVTFISILTTGEGEGRVGIILTLAMNIMSTLQWA  VNSSIDVDSL MRSVSRVFKFIDMPTEGKPTKSTKPYKNGQLSKVMIIE  NSHVKKDDIWPSGGQMTVKDLTAKYTEGGNAILENISFSISPGQRVG  LLGRTGSGKSTLLSAFLRLLNTEGEIQIDGVSWDSITLQQWRKAFGVI  PQKVFI FSGTFRKNLDPYEQWSDQEIWKVADEVGLRSVIEQFPGLD  FVLVDGGCVLSHG HKQLMCLARSVLSKAKILLDEPSAHLDPVTYQI  IRRTLKQAFADCTVILCEHRIEAMLECCQFLVIEENKVRQYDSIQKLL  NERSLFRQAISPSDRVKLPHRNSKCKSKPQIAALKEETEEEVQDTR  L (SEQ ID NO: 43)</p>
<p><b>SEQ ID NO:44</b></p>	<p>MQRSPLEKASVVS KLFFSWTRPILRKGYRQRLELSDIYQIPSVDSADN  LSEKLEREWDRELASKKNPKLINALRRCFFWRFMFYGIFLYLGEVTK  AVQPLLLGRIIASYDPDNKEERSIAIYLGIGLCLLFIVRTLLHPAIFGL  HHIGMQMRIAMFSLIYKKTLLKSSRVLDKISIGQLVSLLSNNLNKFDE  GLALAHFVWIAPLQVALLMGLIWELLQASAFGLGFLIVLALFQAGL  GRMMM KYRDQRAGKISERLVITSEMIENIQSVKAYCWEEAMEKMIE  NLRQTELKLRKAA YVRYFNSSAFFSGFFVFLSVLPYALIKGIILR  KIFTTISFCIVLRMAVTRQFPWA VQTWYDSL GAINKIQDFLQKQYK  TLEYNLTTTEVVMENVTAFWEEGFGELFEKAKQNNNNNRKTSNGDD  SLFFSNFSLLGTPVLKDINFKIERGQLLAVAGSTGAGKTSLLMVIMGE  LEPSEGKIKHSGRISFCSQFSWIMPGTIKENIIFGVSYDEYRYSVIKA  CQLEEDISKFAEKDNIVLGEGGITLSSGGQRARISLARAVYKDADLYL  LDSPFGYLDVLTEKEIFESCVCCKLMANKTRILVTSKMEHLKKADKILI  LHEGSSYFYGTFSELQNLQPDFSSKLMGCDSFDQFSAERRNSILTETL  HRFSLEGDAPVSWTETKKQSFKQTGEFGEKRKNSILNPINSIRKFSIV  QKTPLQMNGIEEDSDEPLERRLSLVPDSEQGEAILPRISVISTGPTLQA  RRRQSVLNLMTHSVNOGQNIHRKTTASTRKVSLAPQANLTELDIYSR  RLSQUETGLEISEEINEEDLKECFDDMESIPAVTTWNTYLR YITVHKS  LIFVLIWCLVIFLAEVAASLVVLWLLGNTPLQDKGNSTHSRNNNSYAV  IITSTSSYVFIYVGVADTLLAMGFFRGLPLVHTLITVSKILHHKML  HSV LQAPMSTLNTLKAGGILNRFSDIAILDLLPLTIFDFIQLLLIVIG  AIAVVAVLQPYIFVATVPVIVAFIMLRAYFLQTSQQLKQLESEGRSPI  FTHLVTSLKGLWTLRAFGRQPYFETLFHKALNLHTANWFLYLSTLR</p>

<p>WFQMRIEMIFVIFVIAVTFISILTTGEGEGRVGIILTLAMNIMSTLQWA  VNSSIDVDSL MRSVSRVFKFIDMPTEGKPTKSTKPYKNGQLSKVMIE  NSHVKKDDIWPSGGQMTVKDLTAKYTEGGNAILENISFSISPGQRVG  LLGRTGSGKSTLLSAFLRLLNTEGEIQIDGVSWDSITLQQWRKAFGVI  PQKVFIFSGTFRKNLDPYEQWSDQEIWKVADEVGLRSVIEQFPGKLD  FVLVDGGCVLSHGKQLMCLARSVLSKAKILLDQPSAHLDPVTYQ  IIRRTLKQAFADCTVILCEHRIEAMLECQQFLVIEENKVRQYDSIQKL  LNERSLFRQAISPSDRVKLFPHRNSSKCKSKPQIAALKEETEEEVQD  RL (SEQ ID NO: 44)</p>
---

**Таблица 4. Иллюстративные кодон-оптимизированные последовательности мРНК, кодирующие сконструированный белок CFTR**

<p><b>SEQ ID NO:45</b></p>	<p>ATGCAACGCTCTCCTCTTGAAAAGGCCTCGGTGGTGTCCAAGCTC  TTCTTCTCGTGGACTAGACCCATCCTGAGAAAGGGGTACAGACAG  CGCTTGGAGCTGTCCGATATCTATCAAATCCCTTCCGTGGACTCC  GCGGACAACCTGTCCGAGAAGCTCGAGAGAGAATGGGACAGAG  AACTCGCCTCAAAGAAGAACCCGAAGCTGATTAATGCGCTTAGG  CGGTGCTTTTTCTGGCGGTTTCATGTTCTACGGCATCTTCCTCTACC  TGGGAGAGGTCACCAAGGCCGTGCAGCCCCTGTTGCTGGGACGG  ATTATTGCCTCCTACGACCCCGACAACAAGGAAGAAAGAAGCAT  CGCTATCTACTTGGGCATCGGTCTGTGCCTGCTTTTCATCGTCCGG  ACCCTCTTGTGCATCCTGCTATTTTCGGCCTGCATCACATTGGCA  TGCAGATGAGAATTGCCATGTTTTCCCTGATCTACAAGAAAATC  TGAAGCTCTCGAGCCGCGTGCTTGACAAGATTTCCATCGGCCAGC  TCGTGTCCCTGCTCTCCAACAATCTGAACAAGTTCGACGAGGGCC  TCGCCCTGGCCCACTTCGTGTGGATCGCCCCTCTGCAAGTGGCGC  TTCTGATGGGCCTGATCTGGGAGCTGCTGCAAGCCTCGGCATTCT  GTGGGCTTGGATTCCCTGATCGTGCTGGCACTGTTCCAGGCCGGAC  TGGGGCGGATGATGATGAAGTACAGGGACCAGAGAGCCGGAAA  GATTTCCGAACGGCTGGTGATCACTTCGGAAATGATCGAAAACAT  CCAGTCAGTGAAGGCCTACTGCTGGGAAGAGGCCATGGAAAAGA  TGATTGAAAACCTCCGGCAAACCGAGCTGAAGCTGACCCGCAAG  GCCGCTTACGTGCGCTATTTCAACTCGTCCGCTTTCTTCTTCTCCG  GGTTCTTCGTGGTGTCTCTCCGTGCTCCCCTACGCCCTGATTA  GGGAATCATCCTCAGGAAGATCTTCACCACCATTTCTTCTGTAT  CGTGCTCCGCATGGCCGTGACCCGGCAGTTCCCATGGGCCGTGCA  GACTTGGTACGACTCCCTGGGAGCCATTAACAAGATCCAGGACTT  CCTTCAAAGCAGGAGTACAAGACCCTCGAGTACAACCTGACTA  CTACCGAGGTCGTGATGGAAAACGTCACCGCCTTTTGGGAGGAG  GGATTTGGCGAACTGTTTCGAGAAGGCCAAGCAGAACAACAACA  CCGCAAGACCTCGAACGGTGACGACTCCCTCTTCTTTTCAAACCT  CAGCCTGCTCGGGACGCCCGTGCTGAAGGACATTAACCTTCAAGAT  CGAAAGAGGACAGCTCCTGGCGGTGGCCGGATCGACCGGAGCCG  GAAAGACTTCCCTGCTGATGGTGATCATGGGAGAGCTTGAACCTA</p>
--------------------------------	---

GCGAGGGAAAGATCAAGCACTCCGGCCGCATCAGCTTCTGTAGC  
CAGTTTTCTGATCATGCCCGGAACCATTAAGGAAAACATCATC  
TTCGGCGTGTCTACGATGAATACCGCTACCGGTCCGTGATCAA  
GCCTGCCAGCTGGAAGAGGATATTTCAAAGTTCGCGGAGAAAG  
TAACATCGTGCTGGGCGAAGGGGGTATTACCTTGTGGGGGGCC  
AGCGGGCTAGAATCTCGCTGGCCAGAGCCGTGTATAAGGACGCC  
GACCTGTATCTCCTGGACTCCCCCTTCGGATACCTGGACGTCCTG  
ACCGAAAAGGAGATCTTCGAATCGTGCGTGTGCAAGCTGATGGC  
TAACAAGACTCGCATCCTCGTGACCTCCAAAATGGAGCACCTGA  
AGAAGGCAGACAAGATTCTGATTCTGCATGAGGGGTCCTCCTACT  
TTTACGGCACCTTCTCGGAGTTGCAGAACTTGCAGCCCGACTTCT  
CATCGAAGCTGATGGGTTGCGACAGCTTCGACCAGTTCTCCGCCG  
AAAGAAGGAACGATATCCTGACGGAAACCTTGCACCGCTTCTCTT  
TGGAAGGCGACGCCCTGTGTCATGGACCGAGACTAAGAAGCAG  
AGCTTCAAGCAGACCGGGGAATTCGGCGAAAAGAGGAAGAACA  
GCATCTTGAACCCCATTA ACTCCATCCGCAAGTTCTCAATCGTGC  
AAAAGACGCCACTGCAGATGAACGGCATTGAGGAGGACTCCGAC  
GAACCCCTTGAGAGGCGCCTGGATCTGGTGCCGGACAGCGAGCA  
GGGAGAAGCCATCCTGCCTCGGATTTCCGTGATCTCCACTGGTCC  
GACGCTCCAAGCCCGGGCGGCGGCAGTCCGTGCTGAACCTGATGA  
CCCACAGCGTGAACCAGGGCCAAAACATTCACCGCAAGACTACC  
GCATCCACCCGGAAAGTGGATCTGGCACCTCAAGCGAATCTTACC  
GAGCTCGACATCTACTCCCGGAGACTGGATCAGGAAACCGGGCT  
CGAAATTTCCGAAGAAATCAACGAGGAGGATCTGAAAGAGTGCT  
TCTTCGACGATATGGAGTCGATACCCGCCGTGACGACTTGGAAACA  
CTTATCTGCGGTACATCACTGTGCACAAGTCATTGATCTTCGTGCT  
GATTTGGTGCCTGGTGATTTTCTGGCCGAGGTCGCGGCCTCACT  
GGTGGTGTCTGGCTGTTGGGAAACACGCCTCTGCAAGACAAGG  
GAACTCCACGCACTCGAGAAACAACAGCTATGCCGTGATTATC  
ACTTCCACCTCCTCTTATTACGTGTTCTACATCTACGTCGGAGTGG  
CGGATACCCTGCTCGCGATGGGTTTCTTCAGAGGACTGCCGCTGG  
TCCACACCTTGATACCGTCAGCAAGATTCTTACCACAAGATGT  
TGCATAGCGTGCTGCAGGCCCCCATGTCCACCCTCAACACTCTGA  
AGGCCGGAGGCATTCTGAACAGATTCTCCAAGGACATCGCTATCC  
TGACGATCTCCTGCCGCTTACCATCTTTGACTTCATCCAGCTGCT  
GCTGATCGTGATTGGAGCAATCGCAGTGGTGGCGGTGCTGCAGC  
CTTACATTTTCGTGGCCACTGTGCCGGTCATTGTGGCGTTCATCAT  
GCTGCGGGCCTACTTCTCCAAACCAGCCAGCAGCTGAAGCAACT  
GGAATCCGAGGGACGATCCCCATCTTCACTCACCTTGTGACGTC  
GTTGAAGGGACTGTGGACCCTCCGGGCTTTCGGACGGCAGCCCTA  
CTTCGAAACCCTCTTCCACAAGGCCCTGAACCTCCACACCGCCAA  
TTGGTTCCTGTACCTGTCCACCCTGCGGTGGTTCAGATGCGCAT  
CGAGATGATTTTCGTTCATCTTCTTCATCGCGGTCACATTCATCAGC  
ATCCTGACTACCGGAGAGGGAGAGGGACGGGTCCGAATAATCCT  
GACCCTCGCCATGAACATTATGAGCACCTGCAGTGGGCAGTGA  
ACAGCTCGATCGACGTGGACAGCCTGATGCGAAGCGTCAGCCGC  
GTGTTCAAGTTCATCGACATGCCTACTGAGGGAAAACCCACTAAG  
TCCACTAAGCCCTACAAAATGGCCAGCTGAGCAAGGTCATGAT

	<p>CATCGAAAACCTCCCACGTGAAGAAGGACGATATTTGGCCCTCCG  GAGGTCAAATGACCGTGAAGGACCTGACCGCAAAGTACACCGAG  GGAGGAAACGCCATTCTCGAAAACATCAGCTTCTCCATTTTCGCCG  GGACAGCGGGTTCGGCCTTCTCGGGCGGACCGGTTCCGGGAAGTC  AACTCTGCTGTCGGCTTTCCTCCGGCTGCTGAATACCGAGGGGGA  AATCCAAATTGACGGCGTGTCTTGGGATTCCATTACTCTGCAGCA  GTGGCGGAAGGCCTTCGGCGTGATCCCCAGAAGGTGTTTCATCTT  CTCGGGTACCTTCCGGAAGAACCTGGATCCTTACGAGCAGTGGA  GCGACCAAGAAATCTGGAAGGTCGCCGACGAGGTCGGCCTGCGC  TCCGTGATTGAACAATTCCTGGAAAGCTGGACTTCGTGCTCGTC  GACGGGGGATGTGTCCTGTGCGACGGACATAAGCAGCTCATGTG  CCTCGCACGGTCCGTGCTCTCCAAGGCCAAGATTCTGCTGCTGGA  CGAACCTTCGGCCCACCTGGATCCGGTACCTACCAGATCATCAG  GAGGACCCTGAAGCAGGCCTTTGCCGATTGCACCGTGATTCTCTG  CGAGCACCGCATCGAGGCCATGCTGGAGTGCCAGCAGTTCCTGG  TCATCGAGGAGAACAAGGTCCGCCAATACGACTCCATTCAAAG  CTCCTCAACGAGCGGTCGCTGTTTCAGACAAGCTATTTACCCGTCC  GATAGAGTGAAGCTTTCGCCATCGGAACAGCTCAAAGTGCAA  ATCGAAGCCGCAGATCGCAGCCTTGAAGGAAGAGACTGAGGAAG  AGGTGCAGGACACCCGGCTTTAA (SEQ ID NO: 45)</p>
<p><b>SEQ ID NO:46</b></p>	<p>ATGCAACGCTCTCCTCTTGAAAAGGCCTCGGTGGTGTCCAAGCTC  TTCTTCTCGTGGACTAGACCCATCCTGAGAAAGGGGTACAGACAG  CGTTGGAGCTGTCCGATATCTATCAAATCCCTTCCGTGGACTCC  GCGGACAACCTGTCCGAGAAGCTCGAGAGAGAATGGGACAGAG  AACTCGCCTCAAAGAAGAACCCGAAGCTGATTAATGCGCTTAGG  CGGTGCTTTTTCTGGCGGTTTCATGTTCTACGGCATCTTCCTCTACC  TGGGAGAGGTCACCAAGGCCGTGCAGCCCCTGTTGCTGGGACGG  ATTATTGCCTCCTACGACCCCGACAACAAGGAAGAAAGAAGCAT  CGCTATCTACTTGGGCATCGGTCTGTGCCTGCTTTTCATCGTCCGG  ACCCTCTTGTTGCATCCTGCTATTTTCGGCCTGCATCACATTGGCA  TGCAGATGAGAATTGCCATGTTTTCCCTGATCTACAAGAAAACCTC  TGAAGCTCTCGAGCCGCGTGCTTGACAAGATTTCATCGGCCAGC  TCGTGTCCCTGCTCTCCAACAATCTGAACAAGTTCGACGAGGGCC  TCGCCCTGGCCCACTTCGTGTGGATCGCCCCTCTGCAAGTGGCGC  TTCTGATGGGCCTGATCTGGGAGCTGCTGCAAGCCTCGGCATTCT  GTGGGCTTGGATTCCCTGATCGTGCTGGCACTGTTCCAGGCCGGAC  TGGGGCGGATGATGATGAAGTACAGGGACCAGAGAGCCGGAAA  GATTTCCGAACGGCTGGTGTACTTCGGAAATGATCGAAAACAT  CCAGTCAGTGAAGGCCTACTGCTGGGAAGAGGCCATGGAAAAGA  TGATTGAAAACCTCCGGCAAACCGAGCTGAAGCTGACCCGCAAG  GCCGCTTACGTGCGCTATTTCAACTCGTCCGCTTTCTTCTTCTCCG  GGTCTTTCGTGGTGTCTTCTCCTCGTGCTCCCCTACGCCCTGATTAA  GGGAATCATCTCAGGAAGATCTTACCACCATTTCCTTCTGTAT  CGTGCTCCGCATGGCCGTGACCCGGCAGTTCCCATGGGCCGTGCA  GACTTGGTACGACTCCCTGGGAGCCATTAACAAGATCCAGGACTT  CCTTCAAAGCAGGAGTACAAGACCCTCGAGTACAACCTGACTA  CTACCGAGGTCGTGATGGAAAACGTCACCGCCTTTTGGGAGGAG</p>

GGATTTGGCGAACTGTTTCGAGAAGGCCAAGCAGAACAACAACAA  
CCGCAAGACCTCGAACGGTGACGACTCCCTCTTCTTTCAAACCTT  
CAGCCTGCTCGGGACGCCCGTGCTGAAGGACATTAACCTTCAAGAT  
CGAAAGAGGACAGCTCCTGGCGGTGGCCGGATCGACCGGAGCCG  
GAAAGACTTCCCTGCTGATGGTGATCATGGGAGAGCTTGAACCTA  
GCGAGGGAAAGATCAAGCACTCCGGCCGCATCAGCTTCTGTAGC  
CAGTTTTCTGGATCATGCCCCGAACCATTAAGGAAAACATCATC  
TTCGGCGTGTCTACGATGAATACCGCTACCGGTCCGTGATCAA  
GCCTGCCAGCTGGAAGAGGATATTTCAAAGTTCGCGGAGAAAGA  
TAACATCGTGCTGGGCGAAGGGGGTATTACCTTGTCGGGGGGCC  
AGCGGGCTAGAATCTCGCTGGCCAGAGCCGTGTATAAGGACGCC  
GACCTGTATCTCCTGGACTCCCCCTTCGGATACCTGGACGTCCTG  
ACCGAAAAGGAGATCTTCGAATCGTGCGTGTGCAAGCTGATGGC  
TAACAAGACTCGCATCCTCGTGACCTCCAAAATGGAGCACCTGA  
AGAAGGCAGACAAGATTCTGATTCTGCATGAGGGGTCCTCCTACT  
TTTACGGCACCTTCTCGGAGTTGCAGAACTTGCAGCCCGACTTCT  
CATCGAAGCTGATGGGTTGCGACAGCTTCGACCAGTTCTCCGCCG  
AAAGAAGGAACGATATCCTGACGGAAACCTTGCACCGCTTCTCTT  
TGGAAGGCGACGCCCTGTGTCATGGACCGAGACTAAGAAGCAG  
GATTTCAAGCAGACCGGGGAATTCGGCGAAAAGAGGAAGAACG  
ACATCTTGAACCCCATTAACCTCCATCCGCAAGTTCTCAATCGTGC  
AAAAGACGCCACTGCAGATGAACGGCATTGAGGAGGACTCCGAC  
GAACCCCTTGAGAGGCGCCTGGATCTGGTGCCGGACAGCGAGCA  
GGGAGAAGCCATCCTGCCTCGGATTTCCGTGATCTCCACTGGTCC  
GACGCTCCAAGCCCGGGCGGCGGCAGTCCGTGCTGAACCTGATGA  
CCCACAGCGTGAACCAGGGCCAAAACATTCACCGCAAGACTACC  
GCATCCACCCGGAAAGTGGATCTGGCACCTCAAGCGAATCTTACC  
GAGCTCGACATCTACTCCCGGAGACTGGATCAGGAAACCGGGCT  
CGAAATTTCCGAAGAAATCAACGAGGAGGATCTGAAAGAGTGCT  
TCTTCGACGATATGGAGTCGATACCCGCCGTGACGACTTGGAAAC  
CTTATCTGCGGTACATCACTGTGCACAAGTCATTGATCTTCGTGCT  
GATTTGGTGCCTGGTGATTTTCTGGCCGAGGTCGCGGCCCTCACT  
GGTGGTGTCTGGCTGTTGGGAAACACGCCTCTGCAAGACAAGG  
GAAACTCCACGCACTCGAGAAACAACAGCTATGCCGTGATTATC  
ACTTCCACCTCCTCTTATTACGTGTTCTACATCTACGTCGGAGTGG  
CGGATACCCTGCTCGCGATGGGTTTCTTCAGAGGACTGCCGCTGG  
TCCACACCTTGATCACCGTCAGCAAGATTCTTCACCACAAGATGT  
TGCATAGCGTGCTGCAGGCCCCCATGTCCACCCTCAACACTCTGA  
AGGCCGGAGGCATTCTGAACAGATTCTCCAAGGACATCGCTATCC  
TGGACGATCTCCTGCCGCTTACCATCTTTGACTTCATCCAGCTGCT  
GCTGATCGTGATTGGAGCAATCGCAGTGGTGGCGGTGCTGCAGC  
CTTACATTTTCGTGGCCACTGTGCCGGTCATTGTGGCGTTCATCAT  
GCTGCGGGCCTACTTCCCTCCAAACCAGCCAGCAGCTGAAGCAACT  
GGAATCCGAGGGACGATCCCCATCTTCACTCACCTTGTGACGTC  
GTTGAAGGGACTGTGGACCCTCCGGGCTTTCGGACGGCAGCCCTA  
CTTCGAAACCCTCTTCCACAAGGCCCTGAACCTCCACACCGCCAA  
TTGGTTCCTGTACCTGTCCACCCTGCGGTGGTTCAGATGCGCAT  
CGAGATGATTTTCGTCATCTTCTTCATCGCGGTACATTCATCAGC

	<p>ATCCTGACTACCGGAGAGGGAGAGGGACGGGTTCGGAATAATCCT  GACCCTCGCCATGAACATTATGAGCACCTGCAGTGGGCAGTGA  ACAGCTCGATCGACGTGGACAGCCTGATGCGAAGCGTCAGCCGC  GTGTTCAAGTTCATCGACATGCCTACTGAGGGAAAACCCACTAAG  TCCACTAAGCCCTACAAAAATGGCCAGCTGAGCAAGGTCATGAT  CATCGAAAACCTCCCACGTGAAGAAGGACGATATTTGGCCCTCCG  GAGGTCAAATGACCGTGAAGGACCTGACCGCAAAGTACACCGAG  GGAGGAAACGCCATTCTCGAAAACATCAGCTTCTCCATTTTCGCCG  GGACAGCGGGTTCGGCCTTCTCGGGCGGACCGGTTCCGGGAAGTC  AACTCTGCTGTCGGCTTTCCTCCGGCTGCTGAATACCGAGGGGGA  AATCCAAATTGACGGCGTGTCTTGGGATTCCATTACTCTGCAGCA  GTGGCGGAAGGCCTTCGGCGTGATCCCCCAGAAGGTGTTTCATCTT  CTCGGGTACCTTCCGGAAGAACCTGGATCCTTACGAGCAGTGGA  GCGACCAAGAAATCTGGAAGGTCGCCGACGAGGTCGGCCTGCGC  TCCGTGATTGAACAATTCCTGGAAAGCTGGACTTCGTGCTCGTC  GACGGGGGATGTGTCCTGTTCGCACGGACATAAGCAGCTCATGTG  CCTCGCACGGTCCGTGCTCTCCAAGGCCAAGATTCTGCTGCTGGA  CGAACCTTCGGCCCACCTGGATCCGGTCACCTACCAGATCATCAG  GAGGACCCTGAAGCAGGCCTTTGCCGATTGCACCGTGATTCTCTG  CGAGCACCGCATCGAGGCCATGCTGGAGTGCCAGCAGTTCCCTGG  TCATCGAGGAGAACAAGGTCCGCCAATACGACTCCATTCAAAG  CTCCTCAACGAGCGGTTCGCTGTTTCAGACAAGCTATTTACCGTCC  GATAGAGTGAAGCTCTTCCCGCATCGGAACAGCTCAAAGTGCAA  ATCGAAGCCGCAGATCGCAGCCTTGAAGGAAGAGACTGAGGAAG  AGGTGCAGGACACCCGGCTTTAA (SEQ ID NO: 46)</p>
<p><b>SEQ ID NO:47</b></p>	<p>ATGCAACGCTCTCCTCTTGAAAAGGCCTCGGTGGTGTCCAAGCTC  TTCTTCTCGTGGACTAGACCCATCCTGAGAAAGGGGTACAGACAG  CGCTTGGAGCTGTCCGATATCTATCAAATCCCTTCCGTGGACTCC  GCGGACAACCTGTCCGAGAAGCTCGAGAGAGAATGGGACAGAG  AACTCGCCTCAAAGAAGAACCCGAAGCTGATTAATGCGCTTAGG  CGGTGCTTTTTCTGGCGGTTTCATGTTCTACGGCATCTTCTCTACC  TGGGAGAGGTCACCAAGGCCGTGCAGCCCCTGTTGCTGGGACGG  ATTATTGCCTCCTACGACCCCGACAACAAGGAAGAAAGAAGCAT  CGCTATCTACTTGGGCATCGGTCTGTGCCTGCTTTTCATCGTCCGG  ACCCTCTTGTGTCATCTGCTATTTTCGGCCTGCATCACATTGGCA  TGCAGATGAGAATTGCCATGTTTTCCCTGATCTACAAGAAAACCTC  TGAAGCTCTCGAGCCGCGTGCTTGACAAGATTTCCATCGGCCAGC  TCGTGTCCCTGCTCTCCAACAATCTGAACAAGTTCGACGAGGGCC  TCGCCCTGGCCCACTTCGTGTGGATCGCCCCTCTGCAAGTGGCGC  TTCTGATGGGCCTGATCTGGGAGCTGCTGCAAGCCTCGGCATTCT  GTGGGCTTGGATTCTGATCGTGCTGGCACTGTTCCAGGCCGGAC  TGGGGCGGATGATGATGAAGTACAGGGACCAGAGAGCCGGAAA  GATTTCCGAACGGCTGGTGTGATCACTTCGGAAATGATCGAAAACAT  CCAGTCAGTGAAGGCCTACTGCTGGGAAGAGGCCATGGAAAAGA  TGATTGAAAACCTCCGGCAAACCGAGCTGAAGCTGACCCGCAAG  GCCGCTTACGTGCGCTATTTCAACTCGTCCGCTTTCTTCTTCTCCG  GGTTCTTCGTGGTGTCTTCTCTCCGTGCTCCCCTACGCCCTGATTAA</p>

GGGAATCATCCTCAGGAAGATCTTCACCACCATTTCCTTCTGTAT  
CGTGCTCCGCATGGCCGTGACCCGGCAGTTCCCATGGGCCGTGCA  
GACTTGGTACGACTCCCTGGGAGCCATTAACAAGATCCAGGACTT  
CCTTCAAAGCAGGAGTACAAGACCCTCGAGTACAACCTGACTA  
CTACCGAGGTTCGTGATGGAAAACGTCACCGCCTTTTGGGAGGAG  
GGATTTGGCGAACTGTTTCGAGAAGGCCAAGCAGAACAACAACA  
CCGCAAGACCTCGAACGGTGACGACTCCCTCTTCTTTTCAAACCTT  
CAGCCTGCTCGGGACGCCCGTGCTGAAGGACATTAACTTCAAGAT  
CGAAAGAGGACAGCTCCTGGCGGTGGCCGGATCGACCGGAGCCG  
GAAAGACTTCCCTGCTGATGGTGATCATGGGAGAGCTTGAACCTA  
GCGAGGGAAAGATCAAGCACTCCGGCCGCATCAGCTTCTGTAGC  
CAGTTTTCTGATCATGCCCGGAACCATTAAGGAAAACATCATC  
TTCGGCGTGTCTACGATGAATACCGCTACCGGTCCGTGATCAA  
GCCTGCCAGCTGGAAGAGGATATTTCAAAGTTCGCGGAGAAAGA  
TAACATCGTGCTGGGCGAAGGGGGTATTACCTTGTGGGGGGCC  
AGCGGGCTAGAATCTCGCTGGCCAGAGCCGTGTATAAGGACGCC  
GACCTGTATCTCCTGGACTCCCCCTTCGGATACCTGGACGTCCTG  
ACCGAAAAGGAGATCTTCGAATCGTGCGTGTGCAAGCTGATGGC  
TAACAAGACTCGCATCCTCGTGACCTCCAAAATGGAGCACCTGA  
AGAAGGCAGACAAGATTCTGATTCTGCATGAGGGGTCTCTACT  
TTTACGGCACCTTCTCGGAGTTGCAGAACTTGCAGCCCGACTTCT  
CATCGAAGCTGATGGGTGCGACAGCTTCGACCAGTTCTCCGCCG  
AAAGAAGGAACTCGATCCTGACGGAAACCTTGCACCGCTTCTCTT  
TGGAAGGCGACGCCCTGTGTCATGGACCGAGACTAAGAAGCAG  
AGCTTCAAGCAGACCGGGGAATTCGGCGAAAAGAGGAAGAACA  
GCATCTTGAACCCCATTAACCTCCATCCGCAAGTTCTCAATCGTGC  
AAAAGACGCCACTGCAGATGAACGGCATTGAGGAGGACTCCGAC  
GAACCCCTTGAGAGGCGCTGTCCCTGGTGCCGGACAGCGAGCA  
GGGAGAAGCCATCCTGCCTCGGATTTCCGTGATCTCCACTGGTCC  
GACGCTCCAAGCCCGGCGGCGGCAGTCCGTGCTGAACCTGATGA  
CCCACAGCGTGAACCAGGGCCAAAACATTCACCGCAAGACTACC  
GCATCCACCCGGAAAGTGTCCCTGGCACCTCAAGCGAATCTTACC  
GAGCTCGACATCTACTCCCGGAGACTGTTCGAGGAAACCGGGCT  
CGAAATTTCCGAAGAAATCAACGAGGAGGATCTGAAAGAGTGCT  
TCTTCGACGATATGGAGTCGATACCCGCCGTGACGACTTGGAAACA  
CTTATCTGCGGTACATCACTGTGCACAAGTCATTGATCTTCGTGCT  
GATTTGGTGCCTGGTGAATTTCTCGGCCGAGGTCGCGGCCTCACT  
GGTGGTGTCTGGCTGTTGGGAAACACGCCTCTGCAAGACAAGG  
GAAACTCCACGCACTCGAGAAACAACAGCTATGCCGTGATTATC  
ACTTCCACCTCCTCTTATTACGTGTTCTACATCTACGTCCGAGTGG  
CGGATACCCTGCTCGCGATGGGTTTCTTCAGAGGACTGCCGCTGG  
TCCACACCTTGATCACCGTCAGCAAGATTCTTACCACAAGATGT  
TGCATAGCGTGCTGCAGGCCCCCATGTCCACCCTCAACACTCTGA  
AGGCCGGAGGCATTCTGAACAGATTCTCCTGCGACATCGCTATCC  
TGACGATCTCCTGCCGCTTACCATCTTTGACTTCATCCAGCTGCT  
GCTGATCGTGATTGGAGCAATCGCAGTGGTGGCGGTGCTGCAGC  
CTTACATTTTCGTGGCCACTGTGCCGGTTCATTGTGGCGTTCATCAT  
GCTGCGGGCCTACTTCTCCAAACCAGCCAGCAGCTGAAGCAACT

	<p>GGAATCCGAGGGACGATCCCCCATCTTCACTCACCTTGTGACGTC  GTTGAAGGGACTGTGGACCCTCCGGGCTTTCGGACGGCAGCCCTA  CTTCGAAACCCTCTTCCACAAGGCCCTGAACCTCCACACCGCCAA  TTGGTTCCTGTACCTGTCCACCCTGCGGTGGTTCCAGATGCGCAT  CGAGATGATTTTCGTCATCTTCTTCATCGCGGTCACATTCATCAGC  ATCCTGACTACCGGAGAGGGAGAGGGACGGGTTCGGAATAATCCT  GACCCTCGCCATGAACATTATGAGCACCTGCAGTGGGCAGTGA  ACAGCTCGATCGACGTGGACAGCCTGATGCGAAGCGTCAGCCGC  GTGTTCAAGTTCATCGACATGCCTACTGAGGGAAAACCCACTAAG  TCCACTAAGCCCTACAAAAATGGCCAGCTGAGCAAGGTCATGAT  CATCGAAAACCTCCACGTGAAGAAGGACGATATTTGGCCCTCCG  GAGGTCAAATGACCGTGAAGGACCTGACCGCAAAGTACACCGAG  GGAGGAAACGCCATTCTCGAAAACATCAGCTTCTCCATTTTCGCCG  GGACAGCGGGTTCGGCCTTCTCGGGCGGACCGGTTCCGGGAAGTC  AACTCTGCTGTCGGCTTTCCTCCGGCTGCTGAATACCGAGGGGGA  AATCCAAATTGACGGCGTGTCTTGGGATTCCACTCTGCAGCA  GTGGCGGAAGGCCTTCGGCGTGATCCCCCAGAAGGTGTTTCATCTT  CTCGGGTACCTTCCGGAAGAACCTGGATCCTTACGAGCAGTGGA  GCGACCAAGAAATCTGGAAGGTCGCCGACGAGGTCGGCCTGCGC  TCCGTGATTGAACAATTCCTGGAAAGCTGGACTTCGTGCTCGTC  GACGGGGGATGTGTCCTGTTCGCACGGACATAAGCAGCTCATGTG  CCTCGCACGGTCCGTGCTCTCCAAGGCCAAGATTCTGCTGCTGGA  CGAACCTTCGGCCCACCTGGATCCGGTCACCTACCAGATCATCAG  GAGGACCCTGAAGCAGGCCTTTGCCGATTGCACCGTGATTCTCTG  CGAGCACCGCATCGAGGCCATGCTGGAGTGCCAGCAGTTCTTG  TCATCGAGGAGAACAAGGTCCGCCAATACGACTCCATTCAAAG  CTCCTCAACGAGCGGTCGCTGTTTCAGACAAGCTATTTACCGTCC  GATAGAGTGAAGCTCTTCCCGCATCGGAACAGCTCAAAGTGCAA  ATCGAAGCCGCAGATCGCAGCCTTGAAGGAAGAGACTGAGGAAG  AGGTGCAGGACACCCGGCTTTAA (SEQ ID NO: 47)</p>
<p><b>SEQ ID NO:48</b></p>	<p>ATGCAACGCTCTCCTCTTGAAAAGGCCTCGGTGGTGTCCAAGCTC  TTCTTCTCGTGGACTAGACCCATCCTGAGAAAGGGGTACAGACAG  CGCTTGGAGCTGTCCGATATCTATCAAATCCCTTCCGTGGACTCC  GCGGACAACCTGTCCGAGAAGCTCGAGAGAGAATGGGACAGAG  AACTCGCCTCAAAGAAGAACCCGAAGCTGATTAATGCGCTTAGG  CGGTGCTTTTTCTGGCGGTTTCATGTTCTACGGCATCTTCTCTACC  TGGGAGAGGTCACCAAGGCCGTGCAGCCCCTGTTGCTGGGACGG  ATTATTGCCTCCTACGACCCCGACAACAAGGAAGAAAGAAGCAT  CGCTATCTACTTGGGCATCGGTCTGTGCCTGCTTTTCATCGTCCGG  ACCCTCTTGTGTCATCCTGCTATTTTCGGCCTGCATCACATTGGCA  TGCAGATGAGAATTGCCATGTTTTCCCTGATCTACAAGAAAACCTC  TGAAGCTCTCGAGCCGCGTGCTTGACAAGATTTCATCGGCCAGC  TCGTGTCCCTGCTCTCAACAATCTGAACAAGTTCGACGAGGGCC  TCGCCCTGGCCCACTTCGTGTGGATCGCCCCTCTGCAAGTGGCGC  TTCTGATGGGCCTGATCTGGGAGCTGCTGCAAGCCTCGGCATTCT  GTGGGCTTGGATTCTGATCGTGCTGGCACTGTTCCAGGCCGGAC  TGGGGCGGATGATGATGAAGTACAGGGACCAGAGAGCCGGAAA</p>

GATTTCCGAACGGCTGGTGATCACTTCGGAAATGATCGAAAACAT  
CCAGTCAGTGAAGGCCTACTGCTGGGAAGAGGCCATGGAAAAGA  
TGATTGAAAACCTCCGGCAAACCGAGCTGAAGCTGACCCGCAAG  
GCCGCTTACGTGCGCTATTTCAACTCGTCCGCTTTCTTCTTCCG  
GGTTCTTCGTGGTGTTCCTCCTCCGTGCTCCCCTACGCCCTGATTAA  
GGGAATCATCCTCAGGAAGATCTTCACCACCATTTCCTTCTGTAT  
CGTGCTCCGCATGGCCGTGACCCGGCAGTTCCCATGGGCCGTGCA  
GACTTGGTACGACTCCCTGGGAGCCATTAACAAGATCCAGGACTT  
CCTTCAAAGCAGGAGTACAAGACCCTCGAGTACAACCTGACTA  
CTACCGAGGTTCGTGATGGAAAACGTCACCGCCTTTTGGGAGGAG  
GGATTTGGCGAACTGTTCGAGAAGGCCAAGCAGAACAACAACA  
CCGCAAGACCTCGAACGGTGACGACTCCCTCTTCTTTCAAACCTT  
CAGCCTGCTCGGGACGCCCGTGCTGAAGGACATTAACTTCAAGAT  
CGAAAGAGGACAGCTCCTGGCGGTGGCCGGATCGACCCGGAGCCG  
GAAAGACTTCCCTGCTGATGGTGATCATGGGAGAGCTTGAACCTA  
GCGAGGGAAAGATCAAGCACTCCGGCCGCATCAGCTTCTGTAGC  
CAGTTTTCTGATCATGCCCGGAACCATTAAGGAAAACATCATC  
TTCGGCGTGTCTACGATGAATACCGCTACCGGTCCGTGATCAA  
GCCTGCCAGCTGGAAGAGGATATTTCAAAGTTCGCGGAGAAAGA  
TAACATCGTGCTGGGCGAAGGGGTATTACCTTGTGGGGGGCC  
AGCGGGCTAGAATCTCGCTGGCCAGAGCCGTGTATAAGGACGCC  
GACCTGTATCTCCTGGACTCCCCCTTCGGATACCTGGACGTCCTG  
ACCGAAAAGGAGATCTTCGAATCGTGCGTGTGCAAGCTGATGGC  
TAACAAGACTCGCATCCTCGTGACCTCCAAAATGGAGCACCTGA  
AGAAGGCAGACAAGATTCTGATTCTGCATGAGGGGTCCTCCTACT  
TTTACGGCACCTTCTCGGAGTTGCAGAACTTGCAGCCCGACTTCT  
CATCGAAGCTGATGGGTTGCGACAGCTTCGACCAGTTCTCCGCCG  
AAAGAAGGAACTCGATCCTGACGGAAACCTTGCACCGCTTCTCTT  
TGGAAGGCGACGCCCTGTGTCATGGACCGAGACTAAGAAGCAG  
AGCTTCAAGCAGACCCGGGAATTCGGCGAAAAGAGGAAGAACA  
GCATCTTGAACCCCATTAACTCCATCCGCAAGTTCTCAATCGTGC  
AAAAGACGCCACTGCAGATGAACGGCATTGAGGAGGACTCCGAC  
GAACCCCTTGAGAGGCGCCTGTCCCTGGTGCCGGACAGCGAGCA  
GGGAGAAGCCATCCTGCCTCGGATTTCCGTGATCTCCACTGGTCC  
GACGCTCCAAGCCCGGGCGGCGGCAGTCCGTGCTGAACCTGATGA  
CCCACAGCGTGAACCAGGGCCAAAACATTACCGCAAGACTACC  
GCATCCACCCGGAAAGTGTCCCTGGCACCTCAAGCGAATCTTACC  
GAGCTCGACATCTACTCCCGGAGACTGTCGCAGGAAACCGGGCT  
CGAAATTTCCGAAGAAATCAACGAGGAGGATCTGAAAGAGTGCT  
TCTTCGACGATATGGAGTCGATACCCGCCGTGACGACTTGGAAACA  
CTTATCTGCGGTACATCACTGTGCACAAGTCATTGATCTTCGTGCT  
GATTTGGTGCCTGGTGATTTTCTGGCCGAGGTCGCGGCCTCACT  
GGTGGTGTCTGGCTGTTGGGAAACACGCCTCTGCAAGACAAGG  
GAAACTCCACGCACTCGAGAAACAACAGCTATGCCGTGATTATC  
ACTTCCACCTCCTCTTATTACGTGTTCTACATCTACGTCCGAGTGG  
CGGATACCCTGCTCGCGATGGGTTTCTTCAGAGGACTGCCGCTGG  
TCCACACCTTGATCACCGTCAGCAAGATTCTTACCACAAGATGT  
TGCATAGCGTGCTGCAGGCCCCCATGTCCACCCTCAACACTCTGA

	<p>AGGCCGGAGGCATTCTGAACAGATTCTCCAAGGACATCGCTATCC  TGGACGATCTCCTGCCGCTTACCATCTTTGACTTCATCCAGCTGCT  GCTGATCGTGATTGGAGCAATCGCAGTGGTGGCGGTGCTGCAGC  CTTACATTTTCGTGGCCACTGTGCCGGTCATTGTGGCGTTCATCAT  GCTGCGGGCCTACTTCCTCCAAACCAGCCAGCAGCTGAAGCAACT  GGAATCCGAGGGACGATCCCCCATCTTCACTCACCTTGTGACGTC  GTTGAAGGGACTGTGGACCCTCCGGGCTTTCGGACGGCAGCCCTA  CTTCGAAACCCTCTTCCACAAGGCCCTGAACCTCCACACCGCCAA  TTGGTTCCTGTACCTGTCCACCCTGCGGTGGTTCAGATGCGCAT  CGAGATGATTTTCGTCATCTTCTTCATCGCGGTCACATTCATCAGC  ATCCTGACTACCGGAGAGGGAGAGGGACGGGTCCGAATAATCCT  GACCCTCGCCATGAACATTATGAGCACCTGCAGTGGGCAGTGA  ACAGCTCGATCGACGTGGACAGCCTGATGCGAAGCGTCAGCCGC  GTGTTCAAGTTCATCGACATGCCTACTGAGGGAAAACCCACTAAG  TCCACTAAGCCCTACAAAAATGGCCAGCTGAGCAAGGTCATGAT  CATCGAAAACCTCCACGTGAAGAAGGACGATAATTTGGCCCTCCG  GAGGTCAAATGACCGTGAAGGACCTGACCGCAAAGTACACCGAG  GGAGGAAACGCCATTCTCGAAAACATCAGCTTCTCCATTTCCGCCG  GGACAGCGGGTCCGGCCTTCTCGGGCGGACCGGTTCCGGGAAGTC  AACTCTGCTGTCGGCTTTCCTCCGGCTGCTGAATACCGAGGGGGA  AATCCAAATTGACGGCGTGTCTTGGGATTCCATTACTCTGCAGCA  GTGGCGGAAGGCCTTCGGCGTGATCCCCCAGAAGGTGTTTCATCTT  CTCGGGTACCTTCCGGAAGAACCTGGATCCTTACGAGCAGTGGA  GCGACCAAGAAATCTGGAAGGTCGCCGACGAGGTCGGCCTGCGC  TCCGTGATTGAACAATTTCTGGAAAGCTGGACTTCGTGCTCGTC  GACGGGGGATGTGTCCTGTCGCACGGACATAAGCAGCTCATGTG  CCTCGCACGGTCCGTGCTCTCCAAGGCCAAGATTCTGCTGCTGGA  CCAACCTTCGGCCACCTGGATCCGGTCACCTACCAGATCATCAG  GAGGACCCTGAAGCAGGCCTTTGCCGATTGCACCGTGATTCTCTG  CGAGACCGCATCGAGGCCATGCTGGAGTGCCAGCAGTTCCTGG  TCATCGAGGAGAACAAGGTCCGCCAATACGACTCCATTCAAAG  CTCCTCAACGAGCGGTGCTGTTTCAGACAAGCTATTTACCGTCC  GATAGAGTGAAGCTTTCCTCCGCATCGGAACAGCTCAAAGTGCAA  ATCGAAGCCGCAGATCGCAGCCTTGAAGGAAGAGACTGAGGAAG  AGGTGCAGGACACCCGGCTTTAA (SEQ ID NO: 48)</p>
<p><b>SEQ ID NO: 49</b></p> <p><b>Кодон- оптимизи- рованный hCFTR - K14R E1371Q</b></p>	<p>ATGCAGCGCTCGCCTCTGGAAAAGGCGAGCGTCGTGTCACGGCT  ATTCTTTTCTTGGACCCGGCCATTCTCAGGAAGGGCTACAGGCA  GAGGCTGGAGTTGAGCGACATCTATCAGATTCCTTCCGTGGACAG  CGCCGACAACCTGAGCGAGAAGCTGGAAAGGGAGTGGGACCGC  GAACTGGCAAGCAAAAAGAACCCCAAGCTGATCAATGCCCTGAG  AAGGTGTTTCTTTTGGAGATTCATGTTCTACGGGATCTTTCTGTAT  CTGGGCGAGGTTACAAAGGCTGTGCAGCCCCTGCTGCTCGGCAG  AATCATCGCCTCATAAGATCCAGACAACAAGGAAGAAAGAAGCA  TCGCCATCTACCTGGGCATTGGCCTCTGCCTCCTGTTTATTGTGCG  GACTCTGCTGCTGCACCCAGCAATTTTCGGGTTGCATCATATTGG  CATGCAGATGCGCATTGCTATGTTTTCCCTCATCTACAAAAGAC  ACTGAAACTCAGCTCCCGGGTGTGGACAAGATCTCCATCGGCCA</p>

ACTGGTGTCTCTCCTGAGCAATAACTTGAATAAGTTTCGACGAAGG  
GCTGGCCCTGGCACACTTCGTGTGGATTGCCCCCTGCAGGTGGC  
CCTGCTGATGGGACTGATTTGGGAAGTCTGCTGCAGGCTAGCGCTTT  
CTGCGGCCTGGGGTTCCTGATCGTGTGGCACTGTTTCAGGCAGG  
CCTGGGCCGTATGATGATGAAGTACAGAGACCAGAGGGCCGGGA  
AGATCTCCGAACGGCTCGTTATTACCTCTGAGATGATCGAGAACA  
TTCAGTCTGTGAAAGCCTACTGCTGGGAGGAGGCTATGGAGAAG  
ATGATCGAGAATCTGAGACAGACCGAGCTGAAGCTGACCAGAAA  
GGCCGCCTACGTGAGGTACTTCAACAGCAGTGCCTTCTTCTC  
TGGCTTCTTCGTTGTGTTTCTGAGCGTGTGCCATACGCTCTCATC  
AAAGGCATCATCCTGCGGAAGATCTTACCACCATCAGCTTTTGC  
ATCGTGCTTAGAATGGCCGTGACCCGGCAGTTCCCATGGGCCGTG  
CAAACCTGGTATGATTCCTGGGCGCCATCAACAAAATCCAGGAT  
TTCTGCAGAAGCAGGAATACAAGACACTCGAATATAATCTCAC  
AACTACTGAGGTGGTTATGGAGAACGTGACTGCCTTCTGGGAGG  
AGGGGTTCGGAGAGCTTTTTGAGAAGGCAAAACAGAATAACAAC  
AACCGCAAAACCAGCAACGGCGACGACAGCCTGTTCTTCTCAA  
TTTTTCTCTCCTGGGAACACCCGTCCTCAAAGACATCAACTTTAA  
GATCGAGAGGGGACAGCTGCTCGCAGTCGCCGGATCCACAGGCG  
CCGGCAAGACCTCTCTGCTGATGGTTATCATGGGCGAACTGGAGC  
CATCCGAGGGCAAGATTAAGCACAGTGGAAGAATCTCCTTTTGT  
GCCAGTTCAGTTGGATTATGCCCGGCACTATTAAGGAGAATATCA  
TTTTTGGGGTGAGCTATGATGAGTATCGGTATCGGAGCGTTATCA  
AAGCCTGTCAGCTGGAGGAGGATATCAGCAAATTCGCAGAGAAG  
GATAATATCGTGCTGGGGGAGGGGGGAATCACCTGAGCGGAGG  
CCAGAGAGCCAGAATCTCACTGGCCCGGGCCGTCTACAAGGACG  
CCGACCTTTACCTTCTGGACAGTCCCTTTGGATATCTGGATGTGCT  
GACTGAAAAGGAGATCTTCGAGTCTTGTGTGTGCAAGCTGATGGC  
TAATAAGACCCGGATCCTAGTGACCAGTAAGATGGAGCACCTGA  
AGAAGGCAGACAAGATCTTGATTCTGCACGAGGGATCCTCTTACT  
TTTACGGCACCTTTAGCGAGCTGCAGAATCTCCAGCCCGATTTCT  
CATCTAAGCTGATGGGCTGTGATAGCTTCGACCAGTTCTCTGCCG  
AGCGCAGAAACAGCATCCTGACAGAGACACTGCACCCGGTTTTCA  
CTGGAGGGGCGACGCCCTGTCAGCTGGACCGAGACCAAAAAGCA  
GTCTTTCAAGCAGACAGGCGAGTTCGGCGAGAAGCGCAAAAACA  
GCATCCTGAATCCAATCAACTCTATAAGGAAGTTTAGCATCGTGC  
AGAAGACACCCCTCCAGATGAACGGCATCGAAGAGGACAGTGAC  
GAGCCCCTGGAGCGGCGCCTGAGCCTCGTGCCTGACAGCGAACA  
GGGCGAGGCCATCCTGCCTAGGATCAGCGTGATTTCAACCGGGC  
CAACTGCAGGCTAGGAGAAGACAGTCAGTGCTTAACCTGATG  
ACACATAGCGTGAATCAGGGACAGAACATCCATCGAAAAACCAC  
AGCCTCTACTCGCAAAGTGTCACTGGCTCCTCAGGCTAATCTGAC  
AGAGCTGGACATCTATAGCAGGAGGCTGAGCCAGGAGACAGGCC  
TGGAGATCAGTGAGGAGATCAACGAAGAGGACCTGAAGGAGTGC  
TTTTTCGATGACATGGAGAGTATCCCCGCCGTCACCACCTGGAAT  
ACCTACCTCCGGTACATCACAGTGCACAAGTCCCTCATCTTTGTG  
CTGATTTGGTGCCTCGTGATCTTCTCGCAGAAGTGGCCGCCTCC  
CTGGTGGTGTGCTGTGGCTGTTGGGGAATACTCCACTGCAGGACAAA

	<p>GGCAATTCTACACACAGCAGGAATAATTCCTATGCCGTGATTATC          ACCAGCACATCCTCTTACTACGTGTTCTACATCTACGTGGGAGTG          GCAGATACTCTGCTTGCAATGGGCTTCTTCAGGGGGCTGCCCTG          GTGCACACACTGATCACAGTGTCCAAGATCCTCCACCATAAAATG          CTCCACAGCGTGCTGCAGGCACCCATGAGCACCTGAACACACT          GAAGGCCGGCGGCATCCTGAATCGCTTTTCCAAAGACATCGCCAT          CCTCGACGATCTCCTGCCACTGACCATCTTCGATTTTATCCAGCTG          CTGCTGATCGTGATCGGGGCCATCGCCGTGGTGGCCGTGCTGCAG          CCATACATTTTCGTGGCTACAGTGCCCGTGATCGTTGCCTTTATCA          TGCTGAGAGCCTACTTCTGCAGACTTCTCAGCAGCTGAAGCAGC          TGGAGAGCGAAGGGAGAAGCCCCATCTTCACTCACCTGGTGACA          AGCCTGAAGGGACTCTGGACCCTGAGAGCCTTCGGCCGGCAGCC          CTATTTTCGAGACCCTGTTTACAAGGCCCTCAACCTGCACACAGC          CAACTGGTTTCTCTACCTGTCCACCCTGAGGTGGTTCCAGATGAG          GATTGAAATGATCTTCGTGATTTTTTTTCATCGCCGTGACATTCATT          AGCATTCTGACCACCGGCGAGGGGGAGGGGAGAGTGGGCATCAT          CCTGACCCTTGCCATGAACATTATGTCCACACTGCAGTGGGCCGT          GAATAGTTCAATCGACGTGGACAGTCTGATGAGGTCCGTGAGCC          GGGTGTTC AAGTTCATTGACATGCCACAGAGGGGAAACCCACC          AAAAGCACCAAGCCCTACAAGAACGGGCAGCTGTCCAAGGTTAT          GATCATCGAGAACTCTCACGTGAAGAAGGACGACATTTGGCCCA          GCGGCGGCCAGATGACAGTGAAAGATCTGACCGCCAAATACACC          GAGGGAGGCAACGCCATCCTCGAAAACATTAGCTTCTCTATCAGC          CCTGGACAGAGGGTGGGCCCTGCTGGGCCGGACAGGCTCAGGGAA          GAGTACTCTGCTGTCAGCATTCTGAGGCTCCTGAACACAGAGGG          CGAGATCCAGATTGACGGCGTGTCTGGGACTCCATCACCTGCA          GCAGTGGCGGAAGGCTTTCGGGGTGATCCCCCAGAAGGTGTTCA          TCTTTAGCGGCACTTTCAGAAAGAATCTGGACCCTTATGAGCAGT          GGAGTGACCAGGAGATCTGGAAAGTGGCCGATGAGGTCGGACTG          AGGAGCGTGATCGAGCAGTTTCCAGGGAAGCTGGACTTTGTGCT          GGTGGATGGCGGATGCGTGCTGTCTCACGGCCATAAACAGCTGA          TGTGTCTGGCCCGGTCCGTGCTGTCTAAGGCCAAGATCCTGCTGC          TGGACCAACCCTCCGCCACCTGGACCCCGTGACATAACCAGATCA          TCAGGAGAACTCTCAAGCAGGCCCTTCGCCGACTGTACCGTGATTC          TGTGCGAGCACCGCATTGAAGCTATGCTGGAGTGTGAGCAGTTCC          TGGTGATCGAGGAAAATAAGGTGAGGCAGTACGACAGCATCCAG          AAGCTGCTGAACGAGCGCTCCCTGTTCCGCCAGGCTATCTCCCA          TCAGACCGGGTGAAGCTCTTTCCCCACAGAACTCCTCAAAGTGC          AAGTCCAAGCCCCAGATCGCCGCCCTGAAGGAGGAGACCGAGGA          GGAGGTGCAGGACACCAGGCTGTGA (SEQ ID NO: 49)</p>
<p><b>SEQ ID          NO: 50          Кодон-          оптимизи-          рованный          hCFTR-          13E K14R</b></p>	<p>ATGCAGCGCTCGCCTCTGGAAAAGGCGAGCGTCGTGTCACGGCT          ATTCTTTTCTTGGACCCGGCCATTCTCAGGAAGGGCTACAGGCA          GAGGCTGGAGTTGAGCGACATCTATCAGATTCCTTCCGTGGACAG          CGCCGACAACCTGAGCGAGAAGCTGGAAAGGGAGTGGGACCGC          GAACTGGCAAGCAAAAAGAACCCCAAGCTGATCAATGCCCTGAG          AAGGTGTTTCTTTTGGAGATTCATGTTCTACGGGATCTTTCTGTAT          CTGGGCGAGGTTACAAAGGCTGTGCAGCCCCTGCTGCTCGGCAG</p>

AATCATCGCCTCATACGATCCAGACAACAAGGAAGAAAGAAGCA  
TCGCCATCTACCTGGGCATTGGCCTCTGCCTCCTGTTTATTGTGCG  
GACTCTGCTGCTGCACCCAGCAATTTTCGGGTTGCATCATATTGG  
CATGCAGATGCGCATTGCTATGTTTTCCCTCATCTACAAAAGAC  
ACTGAAACTCAGCTCCCGGGTGCTGGACAAGATCTCCATCGGCCA  
ACTGGTGTCTCTCCTGAGCAATAACTTGAATAAGTTCGACGAAGG  
GCTGGCCCTGGCACACTTCGTGTGGATTGCCCCCTGCAGGTGGC  
CCTGCTGATGGGACTGATTTGGGAAGTGTGCAGGCTAGCGCTTT  
CTGCGGCCTGGGGTTCCTGATCGTGCTGGCACTGTTTCAGGCAGG  
CCTGGGCCGTATGATGATGAAGTACAGAGACCAGAGGGCCGGGA  
AGATCTCCGAACGGCTCGTTATTACCTCTGAGATGATCGAGAACA  
TTCAGTCTGTGAAAGCCTACTGCTGGGAGGAGGCTATGGAGAAG  
ATGATCGAGAATCTGAGACAGACCGAGCTGAAGCTGACCAGAAA  
GGCCGCCTACGTGAGGTAACAACAGCAGTGCCTTCTTCTTCTC  
TGGCTTCTTCGTTGTGTTTCTGAGCGTGCTGCCATACGCTCTCATC  
AAAGGCATCATCCTGCGGAAGATCTTCACCACCATCAGCTTTTGC  
ATCGTGCTTAGAATGGCCGTGACCCGGCAGTTCCCATGGGCCGTG  
CAAACCTGGTATGATTCCTGGGCGCCATCAACAAAATCCAGGAT  
TTCCTGCAGAAGCAGGAATACAAGACACTCGAATATAATCTCAC  
AACTACTGAGGTGGTTATGGAGAACGTGACTGCCTTCTGGGAGG  
AGGGGTTTCGGAGAGCTTTTTGAGAAGGCAAAACAGAATAACAAC  
AACCGCAAAACCGAGAACGGCGACGACAGCCTGTTCTTCTCCAA  
TTTTTCTCTCCTGGGAACACCCGTCTCAAAGACATCAACTTTAA  
GATCGAGAGGGGACAGCTGCTCGCAGTCGCCGGATCCACAGGCG  
CCGGCAAGACCTCTCTGCTGATGGTTATCATGGGCGAACTGGAGC  
CATCCGAGGGCAAGATTAAGCACAGTGGAAGAATCTCCTTTTGTA  
GCCAGTTCAGTTGGATTATGCCCGGCACTATTAAGGAGAATATCA  
TTTTTGGGGTGAGCTATGATGAGTATCGGTATCGGAGCGTTATCA  
AAGCCTGTCAGCTGGAGGAGGATATCAGCAAATTCGCAGAGAAG  
GATAATATCGTGCTGGGGGAGGGGGGAATCACCTGAGCGGAGG  
CCAGAGAGCCAGAATCTCACTGGCCCGGGCCGTCTACAAGGACG  
CCGACCTTTACCTTCTGGACAGTCCCTTTGGATATCTGGATGTGCT  
GACTGAAAAGGAGATCTTCGAGTCTTGTGTGTGCAAGCTGATGGC  
TAATAAGACCCGGATCCTAGTGACCAGTAAGATGGAGCACCTGA  
AGAAGGCAGACAAGATCTTGATTCTGCACGAGGGATCCTCTTACT  
TTTACGGCACCTTTAGCGAGCTGCAGAATCTCCAGCCCGATTTCT  
CATCTAAGCTGATGGGCTGTGATAGCTTCGACCAGTTCTCTGCCG  
AGCGCAGAAACGAAATCCTGACAGAGACACTGCACCGGTTTGAG  
CTGGAGGGCGACGCCCTGTGAGCTGGACCGAGACCAAAAAGCA  
GGAATCAAGCAGGAGGGCGAGTTCGGCGAGAAGCGCAAAAAC  
GAAATCCTGAATCCAATCAACTCTATAAGGAAGTTTGAAATCGTG  
CAGAAGACACCCCTCCAGATGAACGGCATCGAAGAGGACAGTGA  
CGAGCCCCTGGAGCGGGCGCCTGAGCCTCGTGCCTGACAGCGAAC  
AGGGCGAGGCCATCCTGCCTAGGATCGAGGTGATTTCAACCGGG  
CCAACACTGCAGGCTAGGAGAAGACAGTCAGTGCTTAACCTGAT  
GACACATAGCGTGAATCAGGGACAGAACATCCATCGAAAAGAAG  
AAGCCGAAACTCGCAAAGTGGAGCTGGCTCCTCAGGCTAATCTG  
ACAGAGCTGGACATCTATAGCAGGAGGCTGGAACAGGAGACAGG

	<p>CCTGGAGATCAGTGAGGAGATCAACGAAGAGGACCTGAAGGAGT  GCTTTTTTCGATGACATGGAGAGTATCCCCGCCGTCACCACCTGGA  ATACCTACCTCCGGTACATCACAGTGCACAAGTCCCTCATCTTTG  TGCTGATTTGGTGCCTCGTGATCTTTCTCGCAGAAGTGGCCGCCT  CCCTGGTGGTGTGTGGCTGTTGGGGAATACTCCACTGCAGGACA  AAGGCAATTCTACACACAGCAGGAATAATTCCTATGCCGTGATTA  TCACCAGCACATCCTCTTACTACGTGTTCTACATCTACGTGGGAG  TGGCAGATACTCTGCTTGCAATGGGCTTCTTCAGGGGGCTGCCCC  TGGTGCACACACTGATCACAGTGTCCAAGATCCTCCACCATAAAA  TGCTCCACAGCGTGCTGCAGGCACCCATGAGCACCTGAACACA  CTGAAGGCCGGCGGCATCCTGAATCGCTTTTCCAAAGACATCGCC  ATCCTCGACGATCTCCTGCCACTGACCATCTTCGATTTTATCCAGC  TGCTGCTGATCGTGATCGGGGCCATCGCCGTGGTGGCCGTGCTGC  AGCCATACATTTTCGTGGCTACAGTGCCCGTGATCGTTGCCTTTAT  CATGCTGAGAGCCTACTTCTGCAGACTTCTCAGCAGCTGAAGCA  GCTGGAGAGCGAAGGGAGAAGCCCCATCTTCACTCACCTGGTGA  CAAGCCTGAAGGGACTCTGGACCCTGAGAGCCTTCGGCCGGCAG  CCCTATTTTCGAGACCCTGTTTCACAAGGCCCTCAACCTGCACACA  GCCAACTGGTTTCTCTACCTGTCCACCCTGAGGTGGTTCCAGATG  AGGATTGAAATGATCTTCGTGATTTTTTTCATCGCCGTGACATTCA  TTAGCATTCTGACCACCGGCGAGGGGGAGGGGAGAGTGGGCATC  ATCCTGACCCTTGCCATGAACATTATGTCCACACTGCAGTGGGCC  GTGAATAGTTCAATCGACGTGGACAGTCTGATGAGGTCCGTGAG  CCGGGTGTTCAAGTTCATTGACATGCCACAGAGGGGAAACCCA  CCAAAAGCACCAAGCCCTACAAGAACGGGCAGCTGTCCAAGGTT  ATGATCATCGAGAACTCTCACGTGAAGAAGGACGACATTTGGCC  CAGCGGCCGGCCAGATGACAGTGAAAGATCTGACCGCCAAATACA  CCGAGGGGAGGCAACGCCATCCTCGAAAACATTAGCTTCTCTATCA  GCCCTGGACAGAGGGTGGGCCTGCTGGGCCGGACAGGCTCAGGG  AAGAGTACTCTGCTGTCAGCATTCTGAGGCTCCTGAACACAGAG  GGCGAGATCCAGATTGACGGCGTGTCTGAGGACTCCATCACCTG  CAGCAGTGGCGGAAGGCTTTCGGGGTGATCCCCAGAAGGTGTT  CATCTTTAGCGGCACTTTCAGAAAGAATCTGGACCCTTATGAGCA  GTGGAGTGACCAGGAGATCTGGAAAGTGGCCGATGAGGTCCGAC  TGAGGAGCGTGATCGAGCAGTTTCCAGGGAAGCTGGACTTTGTG  CTGGTGGATGGCGGATGCGTGCTGTCTACGGCCATAAACAGCTG  ATGTGTCTGGCCCCGGTCCGTGCTGTCTAAGGCCAAGATCCTGCTG  CTGGACGAACCCTCCGCCACCTGGACCCCGTGACATAACCAGATC  ATCAGGAGAACTCTCAAGCAGGCCTTCGCCGACTGTACCGTGATT  CTGTGCGAGCACCGCATTGAAGCTATGCTGGAGTGTCAGCAGTTC  CTGGTGATCGAGGAAAATAAGGTGAGGCAGTACGACAGCATCCA  GAAGCTGCTGAACGAGCGTCCCTGTTCCGCCAGGCTATCTCCCC  ATCAGACCGGGTGAAGCTCTTCCCCACAGAACTCCTCAAAGTG  CAAGTCCAAGCCCCAGATCGCCGCCCTGAAGGAGGAGACCGAGG  AGGAGGTGCAGGACACCAGGCTGTGA (SEQ ID NO: 50)</p>
<p><b>SEQ ID NO: 51</b></p>	<p>ATGCAGCGCTCGCCTCTGGAAAAGGCGAGCGTCGTGTACGGCT  ATTCTTTTCTTGGACCCGGCCATTCTCAGGAAGGGCTACAGGCA  GAGGCTGGAGTTGAGCGACATCTATCAGATTCTTCCGTGGACAG</p>

<b>Кодон- оптимизи- рованный hCFTR- 15E K14R</b>	CGCCGACAACCTGAGCGAGAAGCTGGAAAGGGAGTGGGACCGC GAACTGGCAAGCAAAAAGAACCCCAAGCTGATCAATGCCCTGAG AAGGTGTTTCTTTTGGAGATTCATGTTCTACGGGATCTTTCTGTAT CTGGGCGAGGTTACAAAGGCTGTGCAGCCCCTGCTGCTCGGCAG AATCATCGCCTCATAACGATCCAGACAACAAGGAAGAAAGAAGCA TCGCCATCTACCTGGGCATTGGCCTCTGCCTCCTGTTTATTGTGCG GACTCTGCTGCTGCACCCAGCAATTTTCGGGTTCATCATATTGG CATGCAGATGCGCATTGCTATGTTTTCCCTCATCTACAAAAGAC ACTGAAACTCAGCTCCCGGGTGTGGACAAGATCTCCATCGGCCA ACTGGTGTCTCTCCTGAGCAATAACTTGAATAAGTTCGACGAAGG GCTGGCCCTGGCACACTTCGTGTGGATTGCCCCCTGCAGGTGGC CCTGCTGATGGGACTGATTTGGGAAGTGTGCAGGCTAGCGCTTT CTGCGGCCTGGGGTTCCTGATCGTGTGGCACTGTTTCAGGCAGG CCTGGGCCGTATGATGATGAAGTACAGAGACCAGAGGGCCGGGA AGATCTCCGAACGGCTCGTTATTACCTCTGAGATGATCGAGAACA TTCAGTCTGTGAAAGCCTACTGCTGGGAGGAGGCTATGGAGAAG ATGATCGAGAATCTGAGACAGACCGAGCTGAAGCTGACCAGAAA GGCCGCTACGTGAGGTAACAACAGCAGTGCCTTCTTCTTCTC TGGCTTCTTCGTTGTGTTTCTGAGCGTGTGCCATACGCTCTCATC AAAGGCATCATCCTGCGGAAGATCTTCACCACCATCAGCTTTTGC ATCGTGCTTAGAATGGCCGTGACCCGGCAGTTCATGGGCCGTG CAAACCTGGTATGATTCCTGGGCGCCATCAACAAAATCCAGGAT TTCCTGCAGAAGCAGGAATAACAAGACACTCGAATATAATCTCAC AACTACTGAGGTGGTTATGGAGAACGTGACTGCCTTCTGGGAGG AGGGGTTTCGGAGAGCTTTTTGAGAAGGCAAAACAGAATAACAAC AACCGCAAAACCGAGAACGGCGACGACAGCCTGTTCTTCTCCAA TTTTTCTCTCCTGGGAACACCCGTCTCAAAGACATCAACTTTAA GATCGAGAGGGGACAGCTGCTCGCAGTCGCCGGATCCACAGGCG CCGGCAAGACCTCTCTGCTGATGGTTATCATGGGCGAACTGGAGC CATCCGAGGGCAAGATTAAGCACAGTGAAGAATCTCCTTTTGTG GCCAGTTCAGTTGGATTATGCCCGGCACTATTAAGGAGAATATCA TTTTTGGGGTGAGCTATGATGAGTATCGGTATCGGAGCGTTATCA AAGCCTGTCAGCTGGAGGAGGATATCAGCAAATTCGCAGAGAAG GATAATATCGTGCTGGGGGAGGGGGGAATCACCTGAGCGGAGG CCAGAGAGCCAGAATCTCACTGGCCCGGGCCGTCTACAAGGACG CCGACCTTTACCTTCTGGACAGTCCCTTTGGATATCTGGATGTGCT GACTGAAAAGGAGATCTTCGAGTCTTGTGTGTGCAAGCTGATGGC TAATAAGACCCGGATCCTAGTGACCAGTAAGATGGAGCACCTGA AGAAGGCAGACAAGATCTTGATTCTGCACGAGGGATCCTCTTACT TTTACGGCACCTTTAGCGAGCTGCAGAATCTCCAGCCCGATTTCT CATCTAAGCTGATGGGCTGTGATAGCTTCGACCAGTTCTCTGCCG AGCGCAGAAACGAAATCCTGACAGAGACACTGCACCGGTTTGAG CTGGAGGGCGACGCCCTGTGAGCTGGACCGAGACCAAAAAGCA GGAATCAAGCAGGAGGGCGAGTTCGGCGAGAAGCGCAAAAAC GAAATCCTGAATCCAATCAACTCTATAAGGAAGTTTGAAATCGTG CAGAAGACACCCCTCCAGATGAACGGCATCGAAGAGGACAGTGA CGAGCCCCTGGAGCGGGCGCCTGGAACCTCGTGCCTGACAGCGAAC AGGGCGAGGCCATCCTGCCTAGGATCGAGGTGATTTCAACCGGG
--	---

CCAACACTGCAGGCTAGGAGAAGACAGGAAGTGCTTAACCTGAT  
GACACATAGCGTGAATCAGGGACAGAACATCCATCGAAAAGAAG  
AAGCCGAAACTCGCAAAGTGGAGCTGGCTCCTCAGGCTAATCTG  
ACAGAGCTGGACATCTATAGCAGGAGGCTGGAACAGGAGACAGG  
CCTGGAGATCAGTGAGGAGATCAACGAAGAGGACCTGAAGGAGT  
GCTTTTTTCGATGACATGGAGAGTATCCCCGCCGTCACCACCTGGA  
ATACCTACCTCCGGTACATCACAGTGCACAAGTCCCTCATCTTTG  
TGCTGATTTGGTGCCTCGTGATCTTTCTCGCAGAAGTGGCCGCCCT  
CCCTGGTGGTGTGTGGCTGTTGGGGAATACTCCACTGCAGGACA  
AAGGCAATTCTACACACAGCAGGAATAATTCCATGCCGTGATTA  
TCACCAGCACATCCTCTTACTACGTGTTCTACATCTACGTGGGAG  
TGGCAGATACTCTGCTTGCAATGGGCTTCTTCAGGGGGCTGCCCC  
TGGTGCACACACTGATCACAGTGTCCAAGATCCTCCACCATAAAA  
TGCTCCACAGCGTGCTGCAGGCACCCATGAGCACCTGAACACA  
CTGAAGGCCGGCGGCATCCTGAATCGCTTTTCCAAAGACATCGCC  
ATCCTCGACGATCTCCTGCCACTGACCATCTTCGATTTTATCCAGC  
TGCTGCTGATCGTGATCGGGGCCATCGCCGTGGTGGCCGTGCTGC  
AGCCATACATTTTTCGTGGCTACAGTGCCCGTGATCGTTGCCTTTAT  
CATGCTGAGAGCCTACTTCTGCAGACTTCTCAGCAGCTGAAGCA  
GCTGGAGAGCGAAGGGAGAAGCCCCATCTTCACTCACCTGGTGA  
CAAGCCTGAAGGGACTCTGGACCCTGAGAGCCTTCGGCCGGCAG  
CCCTATTTTCGAGACCCTGTTTCACAAGGCCCTCAACCTGCACACA  
GCCAACTGGTTTCTCTACCTGTCCACCCTGAGGTGGTTCCAGATG  
AGGATTGAAATGATCTTCGTGATTTTTTTCATCGCCGTGACATTC  
TTAGCATTCTGACCACCGGCGAGGGGGAGGGGAGAGTGGGCATC  
ATCCTGACCCTTGCCATGAACATTATGTCCACACTGCAGTGGGCC  
GTGAATAGTTCAATCGACGTGGACAGTCTGATGAGGTCCGTGAG  
CCGGGTGTTCAAGTTCATTGACATGCCACAGAGGGGAAACCCA  
CCAAAAGCACCAAGCCCTACAAGAACGGGCAGCTGTCCAAGGTT  
ATGATCATCGAGAACTCTCACGTGAAGAAGGACGACATTTGGCC  
CAGCGGCCGGCCAGATGACAGTGAAAGATCTGACCGCCAAATACA  
CCGAGGGAGGCAACGCCATCCTCGAAAACATTAGCTTCTCTATCA  
GCCCTGGACAGAGGGTGGGCCTGCTGGGCCGGACAGGCTCAGGG  
AAGAGTACTCTGCTGTCAGCATTCTGAGGCTCCTGAACACAGAG  
GGCGAGATCCAGATTGACGGCGTGTCTGAGGACTCCATCACCTG  
CAGCAGTGGCGGAAGGCTTTCGGGGTGATCCCCAGAAGGTGTT  
CATCTTTAGCGGCACTTTCAGAAAGAATCTGGACCCTTATGAGCA  
GTGGAGTGACCAGGAGATCTGGAAAGTGGCCGATGAGGTCCGAC  
TGAGGAGCGTGATCGAGCAGTTTCCAGGGAAGCTGGACTTTGTG  
CTGGTGGATGGCGGATGCGTGCTGTCTCACGGCCATAAACAGCTG  
ATGTGTCTGGCCCCGGTCCGTGCTGTCTAAGGCCAAGATCCTGCTG  
CTGGACGAACCCTCCGCCACCTGGACCCCGTGACATAACCAGATC  
ATCAGGAGAACTCTCAAGCAGGCCTTCGCCGACTGTACCGTGATT  
CTGTGCGAGACCGCATTGAAGCTATGCTGGAGTGTGACAGTTC  
CTGGTGTGATCGAGGAAAATAAGGTGAGGCAGTACGACAGCATCCA  
GAAGCTGCTGAACGAGCGCTCCCTGTTCCGCCAGGCTATCTCCCC  
ATCAGACCGGGTGAAGCTTTTCCCCACAGAACTCCTCAAAGTG

	CAAGTCCAAGCCCCAGATCGCCGCCCTGAAGGAGGAGACCGAGGAGGAGGTGCAGGACACCAGGCTGTGA (SEQ ID NO: 51)
<b>SEQ ID NO: 52</b>  <b>Кодон-оптимизированный hCFTR-13E</b>	ATGCAGCGCTCGCCTCTGGAAAAGGCGAGCGTCGTGTCAAAGCT ATTCTTTTCTTGGACCCGGCCATTCTCAGGAAGGGCTACAGGCA GAGGCTGGAGTTGAGCGACATCTATCAGATTCCTTCCGTGGACAG CGCCGACAACCTGAGCGAGAAGCTGGAAAGGGAGTGGGACCGC GAACTGGCAAGCAAAAAGAACCCCAAGCTGATCAATGCCCTGAG AAGGTGTTTCTTTTGGAGATTCATGTTCTACGGGATCTTTCTGTAT CTGGGCGAGGTTACAAAGGCTGTGCAGCCCCTGCTGCTCGGCAG AATCATCGCCTCATAACGATCCAGACAACAAGGAAGAAAGAAGCA TCGCCATCTACCTGGGCATTGGCCTCTGCCTCCTGTTTATTGTGCG GACTCTGCTGCTGCACCCAGCAATTTTCGGGTTGCATCATATTGG CATGCAGATGCGCATTGCTATGTTTTCCCTCATCTACAAAAGAC ACTGAAACTCAGCTCCCGGGTGCTGGACAAGATCTCCATCGGCCA ACTGGTGTCTCTCCTGAGCAATAACTTGAATAAGTTCGACGAAGG GCTGGCCCTGGCACACTTCGTGTGGATTGCCCCCTGCAGGTGGC CCTGCTGATGGGACTGATTTGGGAAGTGTGCAGGCTAGCGCTTT CTGCGGCCTGGGGTTCCTGATCGTGTGGCACTGTTTCAGGCAGG CCTGGGCCGTATGATGATGAAGTACAGAGACCAGAGGGCCGGGA AGATCTCCGAACGGCTCGTTATTACCTCTGAGATGATCGAGAACA TTCAGTCTGTGAAAGCCTACTGCTGGGAGGAGGCTATGGAGAAG ATGATCGAGAATCTGAGACAGACCGAGCTGAAGCTGACCAGAAA GGCCGCTACGTGAGGTAACAACAGCAGTGCCTTCTTCTTCTC TGGCTTCTTCGTTGTGTTTCTGAGCGTGCTGCCATACGCTCTCATC AAAGGCATCATCCTGCGGAAGATCTTACCACCATCAGCTTTTGC ATCGTGCTTAGAATGGCCGTGACCCGGCAGTTCCCATGGGCCGTG CAAATTTGGTATGATTCCTGGGCGCCATCAACAAAATCCAGGAT TTCTGAGAGAGCAGGAATACAAGACACTCGAATATAATCTCAC AACTACTGAGGTGGTTATGGAGAACGTGACTGCCTTCTGGGAGG AGGGGTTTCGGAGAGCTTTTTGAGAAGGCAAAACAGAATAACAAC AACCGCAAAACCGAGAACGGCGACGACAGCCTGTTCTTCTCAA TTTTTCTCTCCTGGGAACACCCGTCTCAAAGACATCAACTTTAA GATCGAGAGGGGACAGCTGCTCGCAGTCGCCGGATCCACAGGCG CCGGCAAGACCTCTCTGCTGATGGTTATCATGGGCGAACTGGAGC CATCCGAGGGCAAGATTAAGCACAGTGGAAGAATCTCCTTTTGTA GCCAGTTCAGTTGGATTATGCCCGGCACTATTAAGGAGAATATCA TTTTTGGGGTGAGCTATGATGAGTATCGGTATCGGAGCGTTATCA AAGCCTGTCAGCTGGAGGAGGATATCAGCAAATTCGCAGAGAAG GATAATATCGTGCTGGGGGAGGGGGGAATCACCTGAGCGGAGG CCAGAGAGCCAGAATCTCACTGGCCCCGGCCGTCTACAAGGACG CCGACCTTTACCTTCTGGACAGTCCCTTTGGATATCTGGATGTGCT GACTGAAAAGGAGATCTTCGAGTCTTGTGTGTGCAAGCTGATGGC TAATAAGACCCGGATCCTAGTGACCAGTAAGATGGAGCACCTGA AGAAGGCAGACAAGATCTTGATTCTGCACGAGGGATCCTTACT TTTACGGCACCTTTAGCGAGCTGCAGAATCTCCAGCCCGATTTCT CATCTAAGCTGATGGGCTGTGATAGCTTCGACCAGTTCTCTGCCG AGCGCAGAAACGAAATCCTGACAGAGACACTGCACCCGGTTTGAG

CTGGAGGGCGACGCCCTGTCAGCTGGACCGAGACCAAAAAGCA  
GGAATTCAAGCAGGAGGGCGAGTTCGGCGAGAAGCGCAAAAAC  
GAAATCCTGAATCCAATCAACTCTATAAGGAAGTTTGAAATCGTG  
CAGAAGACACCCCTCCAGATGAACGGCATCGAAGAGGACAGTGA  
CGAGCCCCTGGAGCGGCGCCTGAGCCTCGTGCCTGACAGCGAAC  
AGGGCGAGGCCATCCTGCCTAGGATCGAGGTGATTTCAACCGGG  
CCAACACTGCAGGCTAGGAGAAGACAGTCAGTGCTTAACCTGAT  
GACACATAGCGTGAATCAGGGACAGAACATCCATCGAAAAGAAG  
AAGCCGAAACTCGCAAAGTGGAGCTGGCTCCTCAGGCTAATCTG  
ACAGAGCTGGACATCTATAGCAGGAGGCTGGAACAGGAGACAGG  
CCTGGAGATCAGTGAGGAGATCAACGAAGAGGACCTGAAGGAGT  
GCTTTTTTCGATGACATGGAGAGTATCCCCGCCGTCACCACCTGGA  
ATACCTACCTCCGGTACATCACAGTGCACAAGTCCCTCATCTTTG  
TGCTGATTTGGTGCCTCGTGATCTTTCTCGCAGAAGTGGCCGCCCT  
CCCTGGTGGTGTGCTGTGGCTGTTGGGGAATACTCCACTGCAGGACA  
AAGGCAATTCTACACACAGCAGGAATAATTCCTATGCCGTGATTA  
TCACCAGCACATCCTCTTACTACGTGTTCTACATCTACGTGGGAG  
TGGCAGATACTCTGCTTGCAATGGGCTTCTTCAGGGGGCTGCCCC  
TGGTGCACACACTGATCACAGTGTCCAAGATCCTCCACCATAAAA  
TGCTCCACAGCGTGCTGCAGGCACCCATGAGCACCTGAACACA  
CTGAAGGCCGGCGGCATCCTGAATCGCTTTTCCAAAGACATCGCC  
ATCCTCGACGATCTCCTGCCACTGACCATCTTCGATTTTATCCAGC  
TGCTGCTGATCGTGATCGGGGCCATCGCCGTGGTGGCCGTGCTGC  
AGCCATACATTTTCGTGGCTACAGTGCCCGTGATCGTTGCCTTTAT  
CATGCTGAGAGCCTACTTCTGACAGACTTCTCAGCAGCTGAAGCA  
GCTGGAGAGCGAAGGGAGAAGCCCCATCTTCACTCACCTGGTGA  
CAAGCCTGAAGGGACTCTGGACCCTGAGAGCCTTCGGCCGGCAG  
CCCTATTTTCGAGACCCTGTTTCACAAGGCCCTCAACCTGCACACA  
GCCAACTGGTTTTCTTACCTGTCCACCCTGAGGTGGTTCCAGATG  
AGGATTGAAATGATCTTCGTGATTTTTTTTCATCGCCGTGACATTCA  
TTAGCATTCTGACCACCGGCGAGGGGGAGGGGAGAGTGGGCATC  
ATCCTGACCCTTGCCATGAACATTATGTCCACACTGCAGTGGGCC  
GTGAATAGTTCAATCGACGTGGACAGTCTGATGAGGTCCGTGAG  
CCGGGTGTTCAAGTTCATTGACATGCCACAGAGGGGAAACCCA  
CCAAAAGCACCAAGCCCTACAAGAACGGGCAGCTGTCCAAGGTT  
ATGATCATCGAGA ACTCTCACGTGAAGAAGGACGACATTTGGCC  
CAGCGGCCGGCCAGATGACAGTGAAAGATCTGACCGCCAAATACA  
CCGAGGGAGGCAACGCCATCCTCGAAAACATTAGCTTCTCTATCA  
GCCCTGGACAGAGGGTGGGCCTGCTGGGCCGGACAGGCTCAGGG  
AAGAGTACTCTGCTGTCAGCATTCTGAGGCTCCTGAACACAGAG  
GGCGAGATCCAGATTGACGGCGTGTCTGGGACTCCATCACCCCTG  
CAGCAGTGGCGGAAGGCTTTCGGGGTGATCCCCCAGAAGGTGTT  
CATCTTTAGCGGCACTTTCAGAAAGAATCTGGACCCTTATGAGCA  
GTGGAGTGACCAGGAGATCTGGAAAGTGGCCGATGAGGTCCGGAC  
TGAGGAGCGTGATCGAGCAGTTTCCAGGGAAGCTGGACTTTGTG  
CTGGTGGATGGCGGATGCGTGCTGTCTCACGGCCATAAACAGCTG  
ATGTGTCTGGCCCGGTCCGTGCTGTCTAAGGCCAAGATCCTGCTG  
CTGGACGAACCCTCCGCCACCTGGACCCCGTGACATAACCAGATC

	ATCAGGAGAACTCTCAAGCAGGCCTTCGCCGACTGTACCGTGATT CTGTGCGAGCACCGCATTGAAGCTATGCTGGAGTGTGACAGCAGTTC CTGGTGATCGAGGAAAATAAGGTGAGGCAGTACGACAGCATCCA GAAGCTGCTGAACGAGCGCTCCCTGTTCCGCCAGGCTATCTCCCC ATCAGACCGGGTGAAGCTCTTCCCCACAGAACTCCTCAAAGTG CAAGTCCAAGCCCCAGATCGCCGCCCTGAAGGAGGAGACCGAGG AGGAGGTGCAGGACACCAGGCTGTGA (SEQ ID NO: 52)
--	---

[0125] В некоторых вариантах осуществления подходящая последовательность мРНК может представлять собой последовательность мРНК, кодирующую гомолог или аналог белка CFTR человека (hCFTR). Например, гомолог или аналог белка hCFTR может представлять собой модифицированный белок hCFTR, содержащий одну или более аминокислотных замен, делеций и/или вставок по сравнению с белком hCFTR дикого типа или встречающимся в природе белком hCFTR при сохранении значительной активности белка hCFTR. В некоторых вариантах осуществления мРНК, подходящая для настоящего изобретения, кодирует аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше гомологична SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 или SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления мРНК, подходящая для настоящего изобретения, кодирует белок, практически идентичный сконструированному белку hCFTR. В некоторых вариантах осуществления мРНК, подходящая для настоящего изобретения, кодирует аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентична SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 или SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления мРНК, подходящая для настоящего изобретения кодирует фрагмент или часть сконструированного белка hCFTR. В некоторых вариантах осуществления мРНК, подходящая для настоящего изобретения, кодирует фрагмент или часть сконструированного белка hCFTR, при этом фрагмент или часть белка все еще обеспечивают активность CFTR, подобную таковой у полноразмерного сконструированного белка. В некоторых вариантах осуществления мРНК, подходящая для настоящего изобретения, имеет нуклеотидную последовательность,

которая на по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентична SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 48.

[0126] В некоторых вариантах осуществления мРНК, подходящая для настоящего изобретения, имеет нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 40.

[0127] В некоторых вариантах осуществления подходящая мРНК кодирует слитый белок, содержащий полноразмерный сконструированный белок hCFTR, фрагмент или часть сконструированного белка hCFTR, слитые с другим белком (например, продукт слияния с N- или C-концом). В некоторых вариантах осуществления мРНК белка, слитого с продуктом мРНК, кодирующей полноразмерный сконструированный белок hCFTR, фрагмент или часть сконструированного белка hCFTR, кодирует сигнальную последовательность или последовательность, обеспечивающую нацеливание на клетку.

```
ATGCAGAGGAGCCCACTGGAGAAAGCCTCCGTGGTGAGTAAACTCTTTTTTAGT
TGGACCAGACCCATCCTGCGAAAAGGATACAGGCAGCGCCTCGAGTTGTCAGA
TATCTACCAGATTCCTTCTGTGGACTCAGCTGACAATTTGAGTGAGAAGCTGGA
GCGGGAGTGGGATAGAGAGCTGGCGAGCAAAAAAACCCCAAGCTTATCAATG
CTCTGCGCCGCTGCTTTTTCTGGAGGTTTCATGTTTTATGGGATCTTCCTGTACCT
GGGGGAGGTCACCAAAGCTGTTTCAGCCGCTCCTTCTTGGCCGCATCATCGCCAG
STATGACCCTGATAATAAAGAAGAAAGGTCTATTGCTATTTATCTGGGAATTGG
CCTCTGCTTGCTCTTCATCGTCCGCACCCTTCTGCTGCACCCTGCCATTTTTGGCC
TTCACCACATCGGCATGCAAATGAGAATTGCCATGTTCTCCCTCATTTACAAAA
AGACCCTGAAACTTTCCTCAAGAGTGTTAGATAAAATATCCATTGGTCAGCTGG
TCAGCCTGCTGTCCAACAATCTTAACAAATTTGATGAAGGCTTGGCGCTGGCCC
```

ACTTCGTGTGGATTGCACCTCTGCAGGTGGCCCTGTTGATGGGACTTATATGGG  
AGCTGCTTCAAGCCTCTGCTTTCTGTGGGCTGGGCTTTTTGATTGTACTGGCACT  
TTTTCAGGCTGGGCTCGGAAGAATGATGATGAAATACAGAGATCAGCGGGCCG  
GGAAGATATCAGAGCGACTTGTGATCACCAGTGAAATGATTGAAAATATTCAG  
AGCGTGAAAGCCTACTGCTGGGAAGAAGCCATGGAGAAGATGATTGAGAACCT  
GAGGCAGACAGAGCTCAAGCTCACTCGGAAGGCTGCTTATGTTTCGCTATTTCAA  
CAGCAGCGCCTTCTTCTTCAGTGGCTTCTTTGTTGTCTTCTGTCTGTTCTGCCAT  
ATGCACTGATAAAAGGCATTATTTTACGAAAGATCTTCACCACCATCAGTTTTT  
GCATCGTTCTCAGGATGGCCGTCACAAGACAGTTCCTCCCTGGGCTGTGCAGACCT  
GGTACGATTCCCTGGGGGCCATCAACAAGATTCAAGATTTCTTGCAAAAACAAG  
AATATAAACTTTAGAATACAACCTCACCACCACTGAAGTGGTCATGGAAAATG  
TGACAGCCTTTTGGGAGGAGGGTTTTGGAGAATTGTTTCGAGAAGGCCAAAGCAG  
AATAACAACAACAGGAAGACGAGCAATGGGGACGACTCTCTCTTCTTCAGCAA  
CTTTTCACTGCTCGGGACCCCTGTGTTGAAAGATATAAACTTCAAGATCGAGAG  
GGCCAGCTCTTGGCTGTGGCAGGCTCCACTGGAGCTGGTAAAACATCTCTTCT  
CATGGTGATCATGGGGGAACTGGAGCCTTCCGAAGGAAAATCAAGCACAGTG  
GGAGAATCTCATTCTGCAGCCAGTTTTCTGGATCATGCCCGGCACCATTAAGG  
AAAACATCATATTTGGAGTGTCTATGATGAGTACCGCTACCGGTCAGTCATCA  
AAGCCTGTCAGTTGGAGGAGGACATCTCCAAGTTTGCAGAGAAAGACAACATT  
GTGCTTGGAGAGGGGGGTATCACTCTTCTGGAGGACAAAGAGCCAGGATCTCT  
TTGGCCCGGGCAGTCTACAAGGATGCAGACCTCTACTTGTTGGACAGTCCCTTC  
GGCTACCTCGACGTGCTGACTGAAAAAGAAATTTTTGAAAGCTGTGTGTGCAAA  
CTGATGGCAAACAAGACCAGGATTCTTGTCACCAGCAAGATGGAACATCTGAA  
GAAAGCGGACAAAATTCTGATTCTGCATGAAGGGAGCTCCTACTTCTATGGAAC  
ATTTAGCGAGCTTCAGAACCTACAGCCAGACTTCTCCTCCAAATTAATGGGCTG  
TGACTCCTTCGACCAGTTCTCTGCAGAAAGAAGAACTCTATACTCACAGAGAC  
CCTCCACCGCTTCTCCCTTGAGGGAGATGCCCCAGTTTCTTGGACAGAAACCAA  
GAAGCAGTCCTTTAAGCAGACTGGCGAGTTTGGTGAAAAGAGGAAAAATTCAA  
TTCTCAATCCAATTAACAGTATTCGCAAGTTCAGCATTGTCCAGAAGACACCCC  
TCCAGATGAATGGCATCGAAGAAGATAGTGACGAGCCGCTGGAGAGACGGCTG  
AGTCTGGTGCCAGATTCAGAACAGGGGGAGGCCATCCTGCCCCGGATCAGCGT  
CATTTCCACAGGCCCCACATTACAAGCACGGCGCCGGCAGAGTGTTTTAAATCT

CATGACCCATTCAAGTGAACCAGGGCCAAAATATCCACAGGAAGACTACAGCTT  
CTACCCGGAAAGTGTCTCTGGCCCCTCAGGCCAATCTGACCGAGCTGGACATCT  
ACAGCAGGAGGCTCTCCCAGGAAACAGGGCTGGAAATATCTGAAGAGATTAAT  
GAAGAGGATCTTAAAGAGTGCTTCTTTGATGACATGGAGAGCATCCCCGCGGTG  
ACCACATGGAACACCTACCTTAGATATATTACTGTCCACAAGAGCCTCATATTT  
GTCCTCATCTGGTGCCTGGTTATTTTCCTCGCTGAGGTGGCGGCCAGTCTTGTTG  
TGCTCTGGCTGCTGGGCAACACTCCTCTCCAGGACAAGGGCAATAGTACTCACA  
GCAGAAATAATTCTTATGCCGTCATCATTACAAGCACCTCCAGCTACTACGTGT  
TCTACATCTATGTGGGCGTGGCTGACACCCTCCTGGCCATGGGTTTCTTCCGGGG  
CCTGCCTTTGGTGCACACCCTCATCACAGTGTCAAAAATTCTGCACCATAAAAT  
GCTTCATTCTGTCCTGCAGGCACCCATGAGCACTTTGAACACATTGAAGGCTGG  
CGGCATCCTCAACAGATTTTCTAAAGATATTGCTATCCTGGATGATCTCCTCCCC  
CTGACAATCTTTGACTTTATCCAGCTTCTGCTGATCGTGATTGGAGCCATAGCAG  
TGGTTGCTGTCCTGCAGCCCTACATTTTTGTGGCCACCGTGCCCGTGATTGTTGC  
CTTTATTATGCTCAGAGCTTACTTCCTGCAAACCTTCTCAACAGCTCAAACAGCTA  
GAATCTGAGGGCCGGAGCCCCATTTTTACCCACCTGGTGACTTCCCTGAAGGGA  
CTGTGGACTCTGAGAGCATTTCGGGCGACAGCCTTACTTTGAGACACTGTTCCAC  
AAGGCCCTGAACTTGCACACTGCCAACTGGTTTCTTTACCTGAGCACACTCCGC  
TGGTTCCAGATGCGGATAGAGATGATCTTCGTCATCTTTTTTATAGCTGTAACCT  
TCATTTCTATCCTTACAACAGGAGAAGGAGAGGGCAGGGTGGGAATCATCCTCA  
CGCTGGCTATGAACATAATGTCCACCTTGCAGTGGGCCCGTGAATTCCAGTATAG  
ATGTGGATTCTCTAATGAGGAGTGTCTCCCGGGTGTTTAAATTCATTGATATGCC  
TACTGAGGGGAAACCCACCAAGTCAACAAAACCTTATAAGAATGGACAGCTGA  
GCAAGGTGATGATAATTGAGAACAGCCACGTGAAGAAGGATGACATTTGGCCC  
AGCGGGGGCCAGATGACTGTGAAGGACCTGACGGCCAAGTACACCGAAGGTGG  
AAATGCCATTTTGGAAAACATCAGCTTCTCAATCTCTCCTGGGCAGAGAGTTGG  
ATTGCTGGGTCGCACGGGCAGCGGCAAATCAACCCTGCTCAGTGCCTTCCTTCG  
GCTCCTGAATACAGAAGGCGAAATCCAAATTGACGGGGTGAGCTGGGACAGCA  
TCACCCTGCAGCAGTGGAGAAAAGCATTGTTGGGGTCATTCCACAGAAAGTTTTCA  
TCTTCTCTGGCACTTTCAGAAAGAACCTGGACCCCTATGAGCAGTGGAGCGACC  
AGGAGATCTGGAAGGTTGCAGATGAAGTTGGCCTGCGGAGTGTGATAGAACAA  
TTTCTGGCAAGCTGGATTTTGTGCTGGTAGATGGAGGCTGCGTGCTGTCCCAC

GGCCACAAACAGCTGATGTGCCTCGCCCGCTCCGTTCTTTCAAAGGCCAAAATC  
TTGCTTTTGGATGAGCCCAGTGCTCACCTCGACCCAGTGACCTATCAGATAATC  
CGCAGGACCTTAAAGCAAGCTTTTGCCGACTGCACCGTCATACTGTGTGAGCAC  
CGGATTGAAGCAATGCTGGAATGCCAGCAGTTTCTGGTGATCGAGGAGAATAA  
GGTCCGGCAGTACGACAGCATCCAGAAGTTGTTGAATGAGCGCAGCCTTTTCCG  
CCAGGCCATCTCCCCATCTGACAGAGTCAAGCTGTTTCCACATAGGAACTCCTC  
TAAGTGCAAGTCCAAGCCCCAGATCGCTGCCCTCAAGGAGGAACTGAGGAAG  
AGGTGCAGGATACCCGCCTGTGA (**SEQ ID NO: 21**)

ATGCAGAGGAGCCCACTGGAGAAAGCCTCCGTGGTGAGTAAACTCTTTTTTAGT  
TGGACCAGACCCATCCTGCGAAAAGGATACAGGCAGCGCCTCGAGTTGTCTGAT  
ATCTACCAGATTCCTTCTGTGGACTCAGCTGACAATTTGAGTGAGAAGCTGGAG  
CGGGAGTGGGATAGAGAGCTGGCGAGCAAAAAAACCCCAAGCTTATCAATGC  
TCTGCGCCGCTGCTTTTTCTGGAGGTTTCATGTTTTATGGGATCTTCCTGTACCTG  
GGGGAGGTCACCAAAGCTGTTTCAGCCGCTCCTTCTTGGCCGCATCATCGCCAGC  
TATGACCCTGATAATAAAGAAGAAAGGTCTATTGCTATTTATCTGGGAATTGGC  
CTCTGCTTGCTCTTCATCGTCCGCACCCTTCTGCTGCACCCTGCCATTTTTGGCCT  
TCACCACATCGGCATGCAAATGAGAATTGCCATGTTCTCCCTCATTACAAAA  
GACCCTGAAACTTTCCTCAAGAGTGTTAGATAAAAATATCCATTGGTCAGCTGGT  
CAGCCTGCTGTCCAACAATCTTAACAAATTTGATGAAGGCTTGGCGCTGGCCCA  
CTTCGTGTGGATTGCACCTCTGCAGGTGGCCCTGTTGATGGGACTTATATGGGA  
GCTGCTTCAAGCCTCTGCTTTCTGTGGGCTGGGCTTTTTGATTGTACTGGCACTT  
TTTCAGGCTGGGCTCGGAAGAATGATGATGAAATACAGAGATCAGCGGGCCGG  
GAAGATTTTCAGAGCGACTTGTGATCACCAGTGAAATGATTGAAAATATTCAGAG  
CGTGAAAGCCTACTGCTGGGAAGAAGCCATGGAGAAGATGATTGAGAACCTGA  
GGCAGACAGAGCTCAAGCTCACTCGGAAGGCTGCTTATGTTTCGCTATTTCAACA  
GCAGCGCCTTCTTCTTCAGTGGCTTCTTTGTTGTCTTCCTGTCTGTTCTGCCATAT  
GCACTGATAAAAGGCATTATTTTACGAAAGATCTTCACCACCATCAGTTTTTGC  
ATCGTTCTCAGGATGGCCGTCACAAGACAGTTCCCCTGGGCTGTGCAGACCTGG  
TACGATTCCTTGGGGGCCATCAACAAGATTCAAGATTTCTTGCAAAAACAAGAA  
TATAAACTTTAGAATACAACCTCACCACCACTGAAGTGGTCATGGAAAATGTG  
ACAGCCTTTTGGGAGGAGGGTTTTGGAGAATTGTTTCGAGAAGGCAAAGCAGAA  
TAACAACAACAGGAAGACGAGCAATGGGGACGACTCTCTCTTCTTCAGCAACTT

TTCAGTCTCGGGACCCCTGTGTTGAAAGATATAAACTTCAAGATCGAGAGGGG  
CCAGCTCTTGGCTGTGGCAGGCTCCACTGGAGCTGGTAAAACATCTCTTCTCAT  
GGTGATCATGGGGGAACTGGAGCCTTCCGAAGGAAAAATCAAGCACAGTGGGA  
GAATCTCATTCTGCAGCCAGTTTTCTGGATCATGCCCGGCACCATTAAGGAAA  
ACATCATATTTGGAGTGTCTTATGATGAGTACCGCTACCGGTCAGTCATCAAAG  
CCTGTCAGTTGGAGGAGGACATCTCCAAGTTTGCAGAGAAAGACAACATTGTGC  
TTGGAGAGGGGGGTATCACTCTTTCTGGAGGACAAAGAGCCAGGATCTCTTTGG  
CCCGGGCAGTCTACAAGGATGCAGACCTCTACTTGTGGACAGTCCCTTCGGCT  
ACCTCGACGTGCTGACTGAAAAAGAAATTTTTGAAAGCTGTGTGTGCAAACCTGA  
TGGCAAACAAGACCAGGATTCTTGTCAACCAGCAAGATGGAACATCTGAAGAAA  
GCGGACAAAATTCTGATTCTGCATGAAGGGAGCTCCTACTTCTATGGAACATTT  
AGCGAGCTTCAGAACCTACAGCCAGACTTCTCCTCCAAATTAATGGGCTGTGAC  
TCCTTCGACCAGTTCTCTGCAGAAAGAAGAACTCTATACTCACAGAGACCCTC  
CACCGCTTCTCCCTTGAGGGAGATGCCCCAGTTTCTTGGACAGAAACCAAGAAG  
CAGTCCTTTAAGCAGACTGGCGAGTTTGGTGAAAAGAGGAAAAATTCAATTCTC  
AATCCAATTAACAGTATTCGCAAGTTCAGCATTGTCCAGAAGACACCCCTCCAG  
ATGAATGGCATCGAAGAAGATAGTGACGAGCCGCTGGAGAGACGGCTGAGTCT  
GGTGCCAGATTCAGAACAGGGGGAGGCCATCCTGCCCCGGATCAGCGTCATTT  
CACAGGCCCCACATTACAAGCACGGCGCCGGCAGAGTGTTTTAAATCTCATGAC  
CCATTAGTGAACCAGGGCCAAAATATCCACAGGAAGACTACAGCTTCTACCCG  
GAAAGTGTCTCTGGCCCCTCAGGCCAATCTGACCGAGCTGGACATCTACAGCAG  
GAGGCTCTCCAGGAAACAGGGCTGGAAATATCTGAAGAGATTAATGAAGAGG  
ATCTTAAAGAGTGCTTCTTTGATGACATGGAGAGCATCCCCGCGGTGACCACAT  
GGAACACCTACCTTAGATATATACTGTCCACAAGAGCCTCATATTTGTCCTCAT  
CTGGTGCCTGGTTATTTTCTCGCTGAGGTGGCGGCCAGTCTTGTTGTGCTCTGG  
CTGCTGGGCAACACTCCTCTCCAGGACAAGGGCAATAGTACTCACAGCAGAAA  
TAATTCTTATGCCGTCATCATTACAAGCACCTCCAGCTACTACGTGTTCTACATC  
TATGTGGGCGTGGCTGACACCCTCCTGGCCATGGGTTTCTTCCGGGGCCTGCCTT  
TGGTGCACACCCTCATCACAGTGTCAAAAATTCTGCACCATAAAATGCTTCATT  
CTGTCCTGCAGGCACCCATGAGCACTTTGAACACATTGAAGGCTGGCGGCATCC  
TCAACAGATTTTCTAAAGATATTGCTATCCTGGATGATCTCCTCCCCCTGACAAT  
CTTTGACTTTATCCAGCTTCTGCTGATCGTGATTGGAGCCATAGCAGTGGTTGCT

GTCCTGCAGCCCTACATTTTTGTGGCCACCGTGCCCGTGATTGTTGCCTTTATTA  
TGCTCAGAGCTTACTTCCTGCAAACCTTCTCAACAGCTCAAACAGCTAGAATCTG  
AGGGCCGGAGCCCCATTTTTACCCACCTGGTGACTTCCCTGAAGGGACTGTGGA  
CTCTGAGAGCATTTCGGGCGACAGCCTTACTTTGAGACACTGTTCCACAAGGCC  
TGAACCTGCACACTGCCAACTGGTTTCTTTACCTGAGCACACTCCGCTGGTTCCA  
GATGCGGATAGAGATGATCTTCGTCATCTTTTTTATAGCTGTAACCTTCATTTCT  
ATCCTTACAACAGGAGAAGGAGAGGGCAGGGTGGGAATCATCCTCACGCTGGC  
TATGAACATAATGTCCACCTTGCAGTGGGCCGTGAATTCCAGTATAGATGTGGA  
TTCTCTAATGAGGAGTGTCTCCCGGGTGTTTAAATTCATTGATATGCCTACTGAG  
GGGAAACCCACCAAGTCAACAAAACCTTATAAGAATGGACAGCTGAGCAAGGT  
GATGATAATTGAGAACAGCCACGTGAAGAAGGATGACATTTGGCCCAGCGGGG  
GCCAGATGACTGTGAAGGACCTGACGGCCAAGTACACCGAAGGTGGAAATGCC  
ATTTTGGAAAACATCAGCTTCTCAATCTCTCCTGGGCAGAGAGTTGGATTGCTG  
GGTCGCACGGGCAGCGGCAAATCAACCCTGCTCAGTGCCTTCCTTCGGCTCCTG  
AATACAGAAGGCGAAATCCAAATTGACGGGGTGTGAGCTGGGACAGCATCACCT  
GCAGCAGTGGAGAAAAGCATTGTTGGGGTTCATTCCACAGAAAGTTTTTCATCTTCTC  
TGGCACTTTCAGAAAGAACCTGGACCCCTATGAGCAGTGGAGCGACCAGGAGA  
TCTGGAAGGTTGCAGATGAAGTTGGCCTGCGGAGTGTGATAGAACAATTCCTG  
GCAAGCTGGATTTTGTGCTGGTAGATGGAGGCTGCGTGCTGTCCCACGGCCACA  
AACAGCTGATGTGCCTCGCCCGCTCCGTTCTTTCAAAGGCCAAAATCTTGCTTTT  
GGATGAGCCCAGTGCTCACCTTGACCCAGTGACCTATCAGATAATCCGCAGGAC  
CTTAAAGCAAGCTTTTGGCCGACTGCACCGTCATACTGTGTGAGCACCGGATTGA  
AGCAATGCTGGAATGCCAGCAGTTTCTGGTGATCGAGGAGAATAAGGTCCGGC  
AGTACGACAGCATCCAGAAGTTGTTGAATGAGCGCAGCCTTTTCCGCCAGGCCA  
TCTCCCCATCTGACAGAGTCAAGCTGTTTCCACATAGGAACTCCTCTAAGTGCA  
AGTCCAAGCCCCAGATCGCTGCCCTCAAGGAGGAACTGAGGAAGAGGTGCAG  
GATACCCGCCTGTGA (SEQ ID NO: 22)

ATGCAGAGGAGCCCACTGGAGAAAGCCTCCGTGGTGAGTAACTCTTTTTTGT  
TGGACCAGACCCATCCTGCGAAAAGGATACAGGCAGCGCCTCGAGTTGTCAGA  
TATCTACCAGATTCCTTCTGTGGACTCAGCTGACAATTTGAGTGAGAAGCTGGA  
GCGGGAGTGGGATAGAGAGCTGGCGAGCAAAAAAACCCCAAGCTTATCAATG  
CTCTGCGCCGCTGCTTTTTCTGGAGGTTTCATGTTTTATGGGATCTTCCTGTACCT

GGGGGAGGTCACCAAAGCTGTTTCAGCCGCTCCTTCTTGGCCGCATCATCGCCAG  
CTATGACCCTGATAATAAAGAAGAAAGGTCTATTGCTATTTATCTGGGAATTGG  
CCTCTGCTTGCTCTTCATCGTCCGCACCCTTCTGCTGCACCCTGCCATTTTTGGCC  
TTCACCACATCGGCATGCAAATGAGAATTGCCATGTTCTCCCTCATTTACAAA  
AGACCCTGAAACTTTCCTCAAGAGTGTTAGATAAAAATATCCATTGGTCAGCTGG  
TCAGCCTGCTGTCCAACAATCTTAACAATTTGATGAAGGCTTGGCGCTGGCCC  
ACTTCGTGTGGATTGCACCTCTGCAGGTGGCCCTGTTGATGGGACTTATATGGG  
AGCTGCTTCAAGCCTCTGCTTTCTGTGGGCTGGGCTTTTTGATTGTACTGGCACT  
TTTTCAGGCTGGGCTCGGAAGAATGATGATGAAATACAGAGATCAGCGGGCCG  
GGAAGATATCAGAGCGACTTGTGATCACCAGTGAAATGATTGAAAATATTCAG  
AGCGTGAAAGCCTACTGCTGGGAAGAAGCCATGGAGAAGATGATTGAGAACCT  
GAGGCAGACAGAGCTCAAGCTCACTCGGAAGGCTGCTTATGTTTCGCTATTTCAA  
CAGCAGCGCCTTCTTCTTCAGTGGCTTCTTTGTTGTCTTCCTGTCTGTTCTGCCAT  
ATGCACTGATAAAAAGGCATTATTTTACGAAAGATCTTCACCACCATCAGTTTTT  
GCATCGTTCTCAGGATGGCCGTCACAAGACAGTTCCTCCCTGGGCTGTGCAGACCT  
GGTACGATTCTTGGGGGCCATCAACAAGATTCAAGATTTCTTGCAAAAACAAG  
AATATAAACTTTAGAATACAACCTCACCACCCTGAAGTGGTCATGGAAAATG  
TGACAGCCTTTTGGGAGGAGGGTTTTGGAGAATTGTTTCGAGAAGGCAAAGCAG  
AATAACAACAACAGGAAGACGAGCAATGGGGACGACTCTCTCTTCTTCAGCAA  
CTTTTCACTGCTCGGGACCCCTGTGTTGAAAGATATAAACTTCAAGATCGAGAG  
GGGCCAGCTCTTGGCTGTGGCAGGCTCCACTGGAGCTGGTAAAACATCTCTTCT  
CATGGTGATCATGGGGGAACTGGAGCCTTCCGAAGGAAAAATCAAGCACAGTG  
GGAGAATCTCATTCTGCAGCCAGTTTTCTGGATCATGCCCGGCACCATTAAGG  
AAAACATCATATTTGGAGTGTCTATGATGAGTACCGCTACCGGTCAGTCATCA  
AAGCCTGTCAGTTGGAGGAGGACATCTCCAAGTTTGCAGAGAAAGACAACATT  
GTGCTTGGAGAGGGGGGTATCACTCTTTCTGGAGGACAAAGAGCCAGGATCTCT  
TTGGCCCGGGCAGTCTACAAGGATGCAGACCTCTACTTGTGGACAGTCCCTTC  
GGCTACCTCGACGTGCTGACTGAAAAAGAAATTTTTGAAAGCTGTGTGTGCAAA  
CTGATGGCAAACAAGACCAGGATTCTTGTACCAGCAAGATGGAACATCTGAA  
GAAAGCGGACAAAATTCTGATTCTGCATGAAGGGAGCTCCTACTTCTATGGAAC  
ATTTAGCGAGCTTCAGAACCTACAGCCAGACTTCTCCTCAAATTAATGGGCTG  
TGACTCCTTCGACCAGTTCTCTGCAGAAAGAAGAACTCTATACTCACAGAGAC

CCTCCACCGCTTCTCCCTTGAGGGAGATGCCCCAGTTTCTTGGACAGAAACCAA  
GAAGCAGTCCTTTAAGCAGACTGGCGAGTTTGGTGAAAAGAGGAAAAATTCAA  
TTCTCAATCCAATTAACAGTATTCGCAAGTTCAGCATTGTCCAGAAGACACCCC  
TCCAGATGAATGGCATCGAAGAAGATAGTGACGAGCCGCTGGAGAGACGGCTG  
AGTCTGGTGCCAGATTCAGAACAGGGGGAGGCCATCCTGCCCCGGATCAGCGT  
CATTTCCACAGGCCCCACATTACAAGCACGGCGCCGGCAGAGTGTTTTAAATCT  
CATGACCCATTCAGTGAACCAGGGCCAAAATATCCACAGGAAGACTACAGCTT  
CTACCCGGAAAGTGTCTCTGGCCCCTCAGGCCAATCTGACCGAGCTGGACATCT  
ACAGCAGGAGGCTCTCCCAGGAAACAGGGCTTGAAATATCTGAAGAGATTAAT  
GAAGAGGATCTTAAAGAGTGCTTCTTTGATGACATGGAGAGCATCCCCGCGGTG  
ACCACATGGAACACCTACCTTAGATATATTACTGTCCACAAGAGCCTCATATTT  
GTCCTCATCTGGTGCCTGGTTATTTTCTCGCTGAGGTGGCGGCCAGTCTTGTTG  
TGCTCTGGCTGCTGGGCAACACTCCTCTCCAGGACAAGGGCAATAGTACACACA  
GCAGAAATAATTCTTATGCCGTCATCATTACAAGCACCTCCAGCTACTACGTGT  
TCTACATCTATGTGGGCGTGGCTGACACCCTCCTGGCCATGGGTTTCTTCCGGGG  
CCTGCCTTTGGTGCACACCCTCATCACAGTGTCAAAAATTCTGCACCATAAAAT  
GCTTCATTCTGTCCTGCAGGCACCCATGAGCACTTTGAACACATTGAAGGCTGG  
CGGCATCCTCAACAGATTTTCTAAAGATATTGCTATCCTGGATGATCTCCTCCCC  
CTGACAATCTTTGACTTTATCCAGCTTCTGCTGATCGTGATTGGAGCCATAGCAG  
TGGTTGCTGTCCTGCAGCCCTACATTTTTGTGGCCACCGTGCCCGTGATTGTTGC  
CTTTATTATGCTCAGAGCTTACTTCCTGCAAACCTTCTCAACAGCTCAAACAGCTA  
GAATCTGAGGGCCGGAGCCCCATTTTTACCCACCTGGTGACTTCCCTGAAGGGA  
CTGTGGACTCTGAGAGCATTTCGGGCGACAGCCTTACTTTGAGACACTGTTCCAC  
AAGGCCCTGAACTTGCACACTGCCAACTGGTTTCTTTACCTGAGCACACTCCGC  
TGGTTCCAGATGCGGATAGAGATGATCTTCGTCATCTTTTTTATAGCTGTAACCT  
TCATTTCTATCCTTACAACAGGAGAAGGAGAGGGCAGGGTGGGAATCATCCTCA  
CGCTGGCTATGAACATAATGTCCACCTTGCAGTGGGCCGTGAATTCCAGTATAG  
ATGTGGATTCTCTAATGAGGAGTGTCTCCCGGGTGTTTAAATTCATTGATATGCC  
TACTGAGGGGAAACCCACCAAGTCAACAAAACCTTATAAGAATGGACAGCTGA  
GCAAGGTGATGATAATTGAGAACAGCCACGTGAAGAAGGATGACATTTGGCCC  
AGCGGGGGCCAGATGACTGTGAAGGACCTGACGGCCAAGTACACCGAAGGTGG  
AAATGCCATTTTGAAAACATCAGCTTCTCAATCTCTCCTGGGCAGAGAGTTGG

ATTGCTGGGTCGCACGGGCAGCGGCAAATCAACCCTGCTCAGTGCCTTCCTTCG  
GCTCCTGAATACAGAAGGCGAAATCCAAATTGACGGGGTGAGCTGGGACAGCA  
TCACCCTGCAGCAGTGGAGAAAAGCATTGGGGTCATTCCACAGAAAGTTTTCA  
TCTTCTCTGGCACTTTCAGAAAGAACCTGGACCCCTATGAGCAGTGGAGCGACC  
AGGAGATCTGGAAGGTTGCAGATGAAGTTGGCCTGCGGAGTGTGATAGAACAA  
TTTCCTGGCAAGCTGGATTTTGTGCTGGTAGATGGAGGCTGCGTGCTGTCCCAC  
GGCCACAAACAGCTGATGTGCCTCGCCCGCTCCGTTCTTTCAAAGGCCAAAATC  
TTGCTTTTGGATGAGCCCAGTGCTCACCTTGACCCAGTGACCTATCAGATAATCC  
GCAGGACCTTAAAGCAAGCTTTTGCCGACTGCACCGTCATACTGTGTGAGCACC  
GGATTGAAGCAATGCTGGAATGCCAGCAGTTTCTGGTGATCGAGGAGAATAAG  
GTCCGGCAGTACGACAGCATCCAGAAGTTGTTGAATGAGCGCAGCCTTTTCCGC  
CAGGCCATCTCCCCATCTGACAGAGTCAAGCTGTTTCCACATAGGAACTCCTCT  
AAGTGCAAGTCCAAGCCCCAGATCGCTGCCCTCAAGGAGGAAACTGAGGAAGA  
GGTGCAGGATACCCGCCTGTGA (SEQ ID NO: 23)

ATGCAGAGGAGCCCACTGGAGAAAGCCTCCGTGGTGAGTAAACTCTTTTTTAGT  
TGGACCAGACCCATCCTGCGAAAAGGATACAGGCAGCGCCTCGAGTTGTCAGA  
TATCTACCAGATTCCTTCTGTGGACTCAGCTGACAATTTGAGTGAGAAGCTGGA  
GCGGGAGTGGGATAGAGAGCTGGCGAGCAAAAAAAAAACCCCAAGCTTATCAATG  
CTCTGCGCCGCTGCTTTTTTCTGGAGGTTTCATGTTTTATGGGATCTTCCTGTACCT  
GGGGGAGGTCACCAAAGCTGTTTCAGCCGCTCCTTCTTGGCCGCATCATCGCCAG  
CTATGACCCTGATAATAAAGAAGAAAGGTCTATTGCTATTTATCTGGGAATTGG  
CCTCTGCTTGCTCTTCATCGTCCGCACCCTTCTGCTGCACCCTGCCATTTTTGGCC  
TTCACCACATCGGCATGCAAATGAGAATTGCCATGTTCTCCCTCATTTACAAA  
AGACCCTGAAACTTTCCTCAAGAGTGTTAGATAAAATATCCATTGGTCAGCTGG  
TCAGCCTGCTGTCCAACAATCTTAACAATTTGATGAAGGCTTGGCGCTGGCCC  
ACTTCGTGTGGATTGCACCTCTGCAGGTGGCCCTGTTGATGGGACTTATATGGG  
AGCTGCTTCAAGCCTCTGCTTTTCTGTGGGCTGGGCCTTTTTGATTGTA  
TTTTCAGGCTGGGCTCGGAAGAATGATGATGAAATACAGAGATCAGCGGGCCG  
GGAAGATATCAGAGCGACTTGTGATCACCAGTGAAATGATTGAAAATATTCAG  
AGCGTGAAAGCCTACTGCTGGGAAGAAGCCATGGAGAAGATGATTGAGAACCT  
GAGGCAGACAGAGCTCAAGCTCACTCGGAAGGCTGCTTATGTTTCGCTATTTCAA  
CAGCAGCGCCTTCTTCTTCAGTGGCTTCTTTGTTGTCTTCCTGTCTGTTCTGCCAT

ATGCACTGATAAAAAGGCATTATTTTACGAAAGATCTTCACCACCATCAGTTTTT  
GCATCGTTCTCAGGATGGCCGTCACAAGACAGTTCCCCTGGGCTGTGCAGACCT  
GGTACGATTCCCTGGGGGCCATCAACAAGATTCAAGATTTCTTGCAAAAACAAG  
AATATAAACTTTAGAAATACAACCTCACCACCACTGAAGTGGTCATGGAAAATG  
TGACAGCCTTTTGGGAGGAGGGTTTTGGAGAATTGTTTCGAGAAGGCAAAGCAG  
AATAACAACAACAGGAAGACGAGCAATGGGGACGACTCTCTCTTCTTCAGCAA  
CTTTTCACTGCTCGGGACCCCTGTGTTGAAAGATATAAACTTCAAGATCGAGAG  
GGGCCAGCTCTTGGCTGTGGCAGGCTCCACTGGAGCTGGTAAAACATCTCTTCT  
CATGGTGATCATGGGGGAACTGGAGCCTTCCGAAGGAAAAATCAAGCACAGTG  
GGAGAATCTCATTCTGCAGCCAGTTTTCTGGATCATGCCCCGGCACCATTAAGG  
AAAACATCATATTTGGAGTGTCTATGATGAGTACCGCTACCGGTCAGTCATCA  
AAGCCTGTCAGTTGGAGGAGGACATCTCCAAGTTTGCAGAGAAAGACAACATT  
GTGCTTGGAGAGGGGGGTATCACTCTTCTGGAGGACAAAGAGCCAGGATCTCT  
TTGGCCCCGGGCAGTCTACAAGGATGCAGACCTCTACTTGTTGGACAGTCCCTTC  
GGCTACCTCGACGTGCTGACTGAAAAAGAAATTTTTGAAAGCTGTGTGTGCAAA  
CTGATGGCAAACAAGACCAGGATTCTTGTACCAGCAAGATGGAACATCTGAA  
GAAAGCGGACAAAATTCTGATTCTGCATGAAGGGAGCTCCTACTTCTATGGAAC  
ATTTAGCGAGCTTCAGAACCTACAGCCAGACTTCTCCTCCAAATTAATGGGCTG  
TGACTCCTTCGACCAGTTCTCTGCAGAAAGAAGAACTCTATACTCACAGAGAC  
CCTCCACCGCTTCTCCCTTGAGGGAGATGCCCCAGTTTCTTGGACAGAAACCAA  
GAAGCAGTCCTTTAAGCAGACTGGCGAGTTTGGTGAAAAGAGGAAAAATTCAA  
TTCTCAATCCAATTAACAGTATTCGCAAGTTCAGCATTGTCCAGAAGACACCCC  
TCCAGATGAATGGCATCGAAGAAGATAGTGACGAGCCGCTGGAGAGACGGCTG  
AGTCTGGTGCCAGATTCAGAACAGGGGGAGGCCATCCTGCCCCGGATCAGCGT  
CATTTCCACAGGCCCCACATTACAAGCACGGCGCCGGCAGAGTGTTTTAAATCT  
CATGACCCATTCAGTGAACCAGGGCCAAAATATCCACAGGAAGACTACAGCTT  
CTACCCGGAAAGTGTCTCTGGCCCCTCAGGCCAATCTGACCGAGCTGGACATCT  
ACAGCAGGAGGCTCTCCAGGAAACAGGGCTGGAAATATCTGAAGAGATTAAT  
GAAGAGGATCTTAAAGAGTGCTTCTTTGATGACATGGAGAGCATCCCCGCGGTG  
ACCACATGGAACACCTACCTTAGATATATTACTGTCCACAAGAGCCTCATATTT  
GTCCTCATCTGGTGCCTGGTTATTTTCTCGCTGAGGTGGCGGCCAGTCTTGTG  
TGCTCTGGCTGCTGGGCAACACTCCTCTCCAGGACAAGGGCAATAGTACTCACA

GCAGAAATAATTCTTATGCCGTCATCATTACAAGCACCTCCAGCTACTACGTGT  
TCTACATCTATGTGGGCGTGGCTGACACCCTCCTGGCCATGGGTTTCTTCCGGGG  
CCTGCCTTTGGTGCACACCCTCATCACAGTGTCAAAAATTCTGCACCATAAAAT  
GCTTCATTCTGTCCTGCAGGCACCCATGAGCACTTTGAACACATTGAAGGCTGG  
CGGCATCCTCAACAGATTTTCTAAAGATATTGCTATCCTGGATGATCTCCTCCCC  
CTGACAATCTTTGACTTTATCCAGCTTCTGCTGATCGTGATTGGAGCCATAGCAG  
TGGTTGCTGTCCTGCAGCCCTACATTTTTGTGGCCACCGTGCCCGTGATTGTTGC  
CTTTATTATGCTCAGAGCTTACTTCCTGCAAACCTTCTCAACAGCTCAAACAGCTA  
GAATCTGAGGGCCGGAGCCCCATTTTTACCCACCTGGTGACTTCCCTGAAGGGA  
CTGTGGACTCTGAGAGCATTTCGGGCGACAGCCTTACTTTGAGACACTGTTCCAC  
AAGGCCCTGAACTTGCACACTGCCAACTGGTTTCTTTACCTGAGCACACTCCGC  
TGGTTCCAGATGCGGATAGAGATGATCTTCGTCATCTTTTTTATAGCTGTAACCT  
TCATTTCTATCCTTACAACAGGAGAAGGAGAGGGCAGGGTGGGAATCATCCTCA  
CGCTGGCTATGAACATAATGTCCACCTTGCAGTGGGCCCGTGAATTCCAGTATAG  
ATGTGGATTCTCTAATGAGGAGTGTCTCCCGGGTGTTTAAATTCATTGATATGCC  
AACTGAGGGGAAACCCACCAAGTCAACAAAACCTTATAAGAATGGACAGCTGA  
GCAAGGTGATGATAATTGAGAACAGCCACGTGAAGAAGGATGACATTTGGCCC  
AGCGGGGGCCAGATGACTGTGAAGGACCTGACGGCCAAGTACACCGAAGGTGG  
AAATGCCATTTTGGAAAACATCAGCTTCTCAATCTCTCCTGGGCAGAGAGTTGG  
ATTGCTGGGTCGCACGGGCAGCGGCAAATCAACCCTGCTCAGTGCCTTCCTTCG  
GCTCCTGAATACAGAAGGCGAAATCCAAATTGACGGGGTGAGCTGGGACAGCA  
TCACCCTGCAGCAGTGGAGAAAAGCATTGTTGGGGTCAATCCACAGAAAGTTTTCA  
TCTTCTCTGGCACTTTCAGAAAGAACCTGGACCCCTATGAGCAGTGGAGCGACC  
AGGAGATCTGGAAGGTTGCAGATGAAGTTGGCCTGCGGAGTGTGATAGAACAA  
TTTCTGGAAGCTGGATTTTGTGCTGGTAGATGGAGGCTGCGTGCTGTCCCAC  
GGCCACAAACAGCTGATGTGCCTCGCCCGCTCCGTTCTTTCAAAGGCCAAAATC  
TTGCTTTTGGATGAGCCCAGTGCTCACCTCGACCCAGTGACCTATCAGATAATC  
CGCAGGACCTTAAAGCAAGCTTTTGCCGACTGCACCGTCATACTGTGTGAGCAC  
CGGATTGAAGCAATGCTGGAATGCCAGCAGTTTCTGGTGATCGAGGAGAATAA  
GGTCCGGCAGTACGACAGCATCCAGAAGTTGTTGAATGAGCGCAGCCTTTTCCG  
CCAGGCCATCTCCCCATCTGACAGAGTCAAGCTGTTTCCACATAGGAACTCCTC

TAAGTGCAAGTCCAAGCCCCAGATCGCTGCCCTCAAGGAGGAAACTGAGGAAG  
AGGTGCAGGATACCCGCCTGTGA (SEQ ID NO: 24)

ATGCAGAGGAGCCCCTGGAGAAAGCCTCCGTGGTGAGTAAACTCTTTTTTAGT  
TGGACCAGACCCATCCTGCGAAAAGGATACAGGCAGCGCCTCGAGTTGTCAGA  
TATCTACCAGATTCTTCTGTGGACTCAGCTGACAATTTGAGTGAGAAGCTGGA  
GCGGGAGTGGGATAGAGAGCTGGCGAGCAAAAAAAAAACCCCAAGCTTATCAATG  
CTCTGCGCCGCTGCTTTTTCTGGAGGTTTCATGTTTTATGGGATCTTCCTGTACCT  
GGGGGAGGTCACCAAAGCTGTTTCAGCCGCTCCTTCTTGGCCGCATCATCGCCAG  
CTATGACCCTGATAATAAAGAAGAAAGGTCTATTGCTATTTATCTGGGAATTGG  
CCTCTGCTTGCTCTTCATCGTCCGCACCCTTCTGCTGCACCCTGCCATTTTTGGCC  
TTCACCACATCGGCATGCAAATGAGAATTGCCATGTTCTCCCTCATTTACAAA  
AGACCCTGAAACTTTCCTCAAGAGTGTTAGATAAAAATATCCATTGGTCAGCTGG  
TCAGCCTGCTGTCCAACAATCTTAACAAATTTGATGAAGGCTTGGCGCTGGCCC  
ACTTCGTGTGGATTGCACCTCTGCAGGTGGCCCTGTTGATGGGACTTATATGGG  
AGCTGCTTCAAGCCTCTGCTTTCTGTGGGCTGGGCTTTTTGATTGTACTGGCACT  
TTTTCAGGCTGGGCTCGGAAGAATGATGATGAAATACAGAGATCAGCGGGCCG  
GGAAGATATCAGAGCGACTTGTGATCACCAGTGAAATGATTGAAAATATTCAG  
AGCGTGAAAGCCTACTGCTGGGAAGAAGCCATGGAGAAGATGATTGAGAACCT  
GAGGCAGACAGAGCTCAAGCTCACTCGGAAGGCTGCTTATGTTTCGCTATTTCAA  
CAGCAGCGCCTTCTTCTTCAGTGGCTTCTTTGTTGTCTTCCTGTCTGTTCTGCCAT  
ATGCACTGATAAAAAGGCATTATTTTACGAAAGATCTTCACCACCATCAGTTTTT  
GCATCGTTCTCAGGATGGCCGTCACAAGACAGTTCCCCTGGGCTGTGCAGACCT  
GGTACGATTCTTGGGGGCCATCAACAAGATTCAAGATTTCTTGCAAAAACAAG  
AATATAAACTTTAGAATACAACCTCACCACCCTGAAGTGGTCATGGAAAATG  
TGACAGCCTTTTGGGAGGAGGGTTTTGGAGAATTGTTTCGAGAAGGCAAAGCAG  
AATAACAACAACAGGAAGACGAGCAATGGGGACGACTCTCTCTTCTTCAGCAA  
CTTTTCACTGCTCGGGACCCCTGTGTTGAAAGATATAAACTTCAAGATCGAGAG  
GGGCCAGCTCTTGGCTGTGGCAGGCTCCACTGGAGCTGGTAAAACATCTCTTCT  
CATGGTGATCATGGGGGAACTGGAGCCTTCCGAAGGAAAAATCAAGCACAGTG  
GGAGAATCTCATTCTGCAGCCAGTTTTCTGGATCATGCCCGGCACCATTAAGG  
AAAACATCATATTTGGAGTGTCTATGATGAGTACCGCTACCGGTCAGTCATCA  
AAGCCTGTCAGTTGGAGGAGGACATCTCCAAGTTTGCAGAGAAAGACAACATT

GTGCTTGGAGAGGGGGGTATCACTCTTTCTGGAGGACAAAGAGCCAGGATCTCT  
TTGGCCCCGGGCAGTCTACAAGGATGCAGACCTCTACTTGTTGGACAGTCCCTTC  
GGCTACCTCGACGTGCTGACTGAAAAAGAAATTTTTGAAAGCTGTGTGTGCAAA  
CTGATGGCAAACAAGACCAGGATTCTTGTCAACCAGCAAGATGGAACATCTGAA  
GAAAGCGGACAAAATTCTGATTCTGCATGAAGGGAGCTCCTACTTCTATGGAAC  
ATTTAGCGAGCTTCAGAACCTACAGCCAGACTTCTCCTCCAAATTAATGGGCTG  
TGACTCCTTCGACCAGTTCTCTGCAGAAAGAAGAACTCTATACTCACAGAGAC  
CCTCCACCGCTTCTCCCTTGAGGGAGATGCCCCAGTTTCTTGACAGAAACCAA  
GAAGCAGTCCTTTAAGCAGACTGGCGAGTTTGGTGAAAAGAGGAAAAATTCAA  
TTCTCAATCCTATTAACAGTATTCGCAAGTTCAGCATTGTCCAGAAGACACCCCT  
CCAGATGAATGGCATCGAAGAAGATAGTGACGAGCCGCTGGAGAGACGGCTGA  
GTCTGGTGCCAGATTCAGAACAGGGGGAGGCCATCCTGCCCCGGATCAGCGTC  
ATTTCCACAGGCCCCACATTACAAGCACGGCGCCGGCAGAGTGTTTTAAATCTC  
ATGACCCATTCAGTGAACCAGGGCCAAAATATCCACAGGAAGACTACAGCTTCT  
ACCCGGAAAGTGTCTCTGGCCCCTCAGGCCAATCTGACCGAGCTGGACATCTAC  
AGCAGGAGGCTCTCCAGGAAACAGGGCTTGAAATATCTGAAGAGATTAATGA  
AGAGGATCTTAAAGAGTGCTTCTTTGATGACATGGAGAGCATCCCCGCGGTGAC  
CACATGGAACACCTACCTTAGATATATTACTGTCCACAAGAGCCTCATATTTGT  
CCTCATCTGGTGCCTGGTTATTTTCCTCGCTGAGGTGGCGGCCAGTCTTGTTGTG  
CTCTGGCTGCTGGGCAAACTCCTCTCCAGGACAAGGGCAATAGTACTCACAGC  
AGAAATAATTCTTATGCCGTCATCATTACAAGCACCTCCAGCTACTACGTGTTCT  
ACATCTATGTGGGCGTGGCTGACACCCTCCTGGCCATGGGTTTCTTCCGGGGCC  
TGCCTTTGGTGCACACCCTCATCACAGTGTCAAAAATTCTGCACCATAAAATGC  
TTCATTCTGTCCTGCAGGCACCCATGAGCACTTTGAACACATTGAAGGCTGGCG  
GCATCCTCAACAGATTTTCTAAAGATATTGCTATCCTGGATGATCTCCTCCCCCT  
GACAATCTTTGACTTTATCCAGCTTCTGCTGATCGTGATTGGAGCCATAGCAGTG  
GTTGCTGTCCTGCAGCCCTACATTTTTGTGGCCACCGTGCCCGTGATTGTTGCCT  
TTATTATGCTCAGAGCTTACTTCCTGCAAACCTTCTCAACAGCTCAAACAGCTAG  
AATCTGAGGGCCGGAGCCCCATTTTTACCCACCTGGTGACTTCCCTGAAGGGAC  
TGTGGACTCTGAGAGCATTCTGGGCGACAGCCTTACTTTGAGACACTGTTCCACA  
AGGCCCTGAACTTGCACACTGCCAACTGGTTTCTTTACCTGAGCACACTCCGCT  
GGTTCCAGATGCGGATAGAGATGATCTTCGTCATCTTTTTTATAGCTGTAACCTT

CATTTCTATCCTTACAACAGGAGAAGGAGAGGGCAGGGTGGGAATCATCCTCA  
CGCTGGCTATGAACATAATGTCCACCTTGCAGTGGGCCGTGAATTCCAGTATAG  
ATGTGGATTCTCTAATGAGGAGTGTCTCCCGGGTGTTTAAATTCATTGATATGCC  
TACTGAGGGGAAACCCACCAAGTCAACAAAACCTTATAAGAATGGACAGCTGA  
GCAAGGTGATGATAATTGAGAACAGCCACGTGAAGAAGGATGACATTTGGCCC  
AGCGGGGGCCAGATGACTGTGAAGGACCTGACGGCCAAGTACACCGAAGGTGG  
AAATGCCATTTTGGAAAACATCAGCTTCTCAATCTCTCCTGGGCAGAGAGTTGG  
ATTGCTGGGTCGCACGGGCAGCGGCAAATCAACCCTGCTCAGTGCCTTCCTTCG  
GCTCCTGAATACAGAAGGCGAAATCCAAATTGACGGGGTGAGCTGGGACAGCA  
TCACCCTGCAGCAGTGGAGAAAAGCATTGTTGGGGTCATTCCACAGAAAGTTTTCA  
TCTTCTCTGGCACTTTCAGAAAGAACCTGGACCCCTATGAGCAGTGGAGCGACC  
AGGAGATCTGGAAGGTTGCAGATGAAGTTGGCCTGCGGAGTGTGATAGAACAA  
TTTCCTGGCAAGCTGGATTTTGTGCTGGTAGATGGAGGCTGCGTGCTGTCCCAC  
GGCCACAAACAGCTGATGTGCCTCGCCCGCTCCGTTCTTTCAAAGGCCAAAATC  
TTGCTTTTGGATGAGCCCAGTGCTCACCTCGACCCAGTGACCTATCAGATAATC  
CGCAGGACCTTAAAGCAAGCTTTTGGCGACTGCACCGTCATACTGTGTGAGCAC  
CGGATTGAAGCAATGCTGGAATGCCAGCAGTTTCTGGTGATCGAGGAGAATAA  
GGTCCGGCAGTACGACAGCATCCAGAAGTTGTTGAATGAGCGCAGCCTTTTCCG  
CCAGGCCATCTCCCCATCTGACAGAGTCAAGCTGTTTCCACATAGGAACTCCTC  
TAAGTGCAAGTCCAAGCCCCAGATCGCTGCCCTCAAGGAGGAAACTGAGGAAG  
AGGTGCAGGATAACCCGCCTGTGA (SEQ ID NO: 25)

ATGCAGAGGAGCCCACTGGAGAAAGCCTCCGTGGTGAGTAAACTCTTTTTTAGT  
TGGACCAGACCCATCCTGCGAAAAGGATACAGGCAGCGCCTCGAGTTGTCAGA  
TATCTACCAGATTCCTTCTGTGGACTCAGCTGACAATTTGAGTGAGAAGCTGGA  
GCGGGAGTGGGATAGAGAGCTGGCGAGCAAAAAAACCCCAAGCTTATCAATG  
CTCTGCGCCGCTGCTTTTTCTGGAGGTTTCATGTTTTATGGGATCTTCCTGTACCT  
GGGGGAGGTCACCAAAGCTGTTTCAGCCGCTCCTTCTTGGCCGCATCATCGCCAG  
CTATGACCCTGATAATAAAGAAGAAAGGTCTATTGCTATTTATCTGGGAATTGG  
CCTCTGCTTGCTCTTCATCGTCCGCACCCTTCTGCTGCACCCTGCCATTTTTGGCC  
TTCACCACATCGGCATGCAAATGAGAATTGCCATGTTCTCCCTCATTTACAAA  
AGACCCTGAAACTTTCCTCAAGAGTGTTAGATAAAATATCCATTGGTCAGCTGG  
TCAGCCTGCTGTCCAACAATCTTAACAATTTGATGAAGGCTTGGCGCTGGCCC

ACTTCGTGTGGATTGCACCTCTGCAGGTGGCCCTGTTGATGGGACTTATATGGG  
AGCTGCTTCAAGCCTCTGCTTTCTGTGGGCTGGGCTTTTTGATTGTACTGGCACT  
TTTTCAGGCTGGGCTCGGAAGAATGATGATGAAATACAGAGATCAGCGGGCCG  
GGAAGATTTTCAGAGCGACTTGTGATCACCAGTGAAATGATTGAAAATATTCAGA  
GCGTGAAAGCCTACTGCTGGGAAGAAGCCATGGAGAAGATGATTGAGAACCTG  
AGGCAGACAGAGCTCAAGCTCACTCGGAAGGCTGCTTATGTTTCGCTATTTCAAC  
AGCAGCGCCTTCTTCTTCAGTGGCTTCTTTGTTGTCTTCCTGTCTGTTCTGCCATA  
TGCACTGATAAAAGGCATTATTTTACGAAAGATCTTCACCACCATCAGTTTTTGC  
ATCGTTCTCAGGATGGCCGTCACAAGACAGTTCCCCTGGGCTGTGCAGACCTGG  
TACGATTCCTTGGGGGCCATCAACAAGATTCAAGATTTCTTGCAAAAACAAGAA  
TATAAACTTTAGAAATACAACCTCACCACCACTGAAGTGGTCATGGAAAATGTG  
ACAGCCTTTTGGGAGGAGGGTTTTGGAGAATTGTTTCGAGAAGGCAAAGCAGAA  
TAACAACAACAGGAAGACGAGCAATGGGGACGACTCTCTCTTCTTCAGCAACTT  
TTCAGTCTCGGGACCCCTGTGTTGAAAGATATAAACTTCAAGATCGAGAGGGG  
CCAGCTCTTGGCTGTGGCAGGCTCCACTGGAGCTGGTAAAACATCTCTTCTCAT  
GGTGATCATGGGGGAACTGGAGCCTTCCGAAGGAAAAATCAAGCACAGTGGGA  
GAATCTCATTCTGCAGCCAGTTTTCTGGATCATGCCCCGGCACCATTAAGGAAA  
ACATCATATTTGGAGTGTCTTATGATGAGTACCGCTACCGGTCAGTCATCAAAG  
CCTGTCAAGTTGGAGGAGGACATCTCCAAGTTTGCAGAGAAAGACAACATTGTGC  
TTGGAGAGGGGGGTATCACTCTTTCTGGAGGACAAAGAGCCAGGATCTCTTTGG  
CCCGGGCAGTCTACAAGGATGCAGACCTCTACTTGTGGACAGTCCCTTCGGCT  
ACCTCGACGTGCTGACTGAAAAAGAAATTTTTGAAAGCTGTGTGTGCAAACCTGA  
TGGCAAACAAGACCAGGATTCTTGTACCAGCAAGATGGAACATCTGAAGAAA  
GCGGACAAAATTCTGATTCTGCATGAAGGGAGCTCCTACTTCTATGGAACATTT  
AGCGAGCTTCAGAACCTACAGCCAGACTTCTCCTCCAAATTAATGGGCTGTGAC  
TCCTTCGACCAGTTCTCTGCAGAAAGAAGAACTCTATACTCACAGAGACCCTC  
CACCGCTTCTCCCTTGAGGGAGATGCCCCAGTTTCTTGGACAGAAACCAAGAAG  
CAGTCCTTTAAGCAGACTGGCGAGTTTGGTGAAAAGAGGAAAAATTCAATTCTC  
AATCCAATTAACAGTATTCGCAAGTTCAGCATTGTCCAGAAGACACCCCTCCAG  
ATGAATGGCATCGAAGAAGATAGTGACGAGCCGCTGGAGAGACGGCTGAGTCT  
GGTGCCAGATTCAGAACAGGGGGAGGCCATCCTGCCCCGGATCAGCGTCATTTTC  
CACAGGCCCCACATTACAAGCACGGCGCCGGCAGAGTGTTTTAAATCTCATGAC

CCATTCAGTGAACCAGGGCCAAAATATCCACAGGAAGACTACAGCTTCTACCCG  
GAAAGTGTCTCTGGCCCCCTCAGGCCAATCTGACCGAGCTGGACATCTACAGCAG  
GAGGCTCTCCCAGGAAACAGGGCTGGAAATATCTGAAGAGATTAATGAAGAGG  
ATCTTAAAGAGTGCTTCTTTGATGACATGGAGAGCATCCCCGCGGTGACCACAT  
GGAACACCTACCTTAGATATATTACTGTCCACAAGAGCCTCATATTTGTCCTCAT  
CTGGTGCCTGGTTATTTTCCTCGCTGAGGTGGCGGCCAGTCTTGTTGTGCTCTGG  
CTGCTGGGCAACACTCCTCTCCAGGACAAGGGCAATAGTACTCACAGCAGAAA  
TAATTCTTATGCCGTCATCATTACAAGCACCTCCAGCTACTACGTGTTCTACATC  
TATGTGGGCGTGGCTGACACCCTCCTGGCCATGGGTTTCTTCCGGGGCCTGCCTT  
TGGTGCACACCCTCATCACAGTGTCAAAAATTCTGCACCATAAAATGCTTCATT  
CTGTCCTGCAGGCACCCATGAGCACTTTGAACACATTGAAGGCTGGCGGCATCC  
TCAACAGATTTTCTAAAGATATTGCTATCCTGGATGATCTCCTCCCCCTGACAAT  
CTTTGACTTTATCCAGCTTCTGCTGATCGTGATTGGAGCCATAGCAGTGGTTGCT  
GTCCTGCAGCCCTACATTTTTGTGGCCACCGTGCCCGTGATTGTTGCCTTTATTA  
TGCTCAGAGCTTACTTCCTGCAAACCTTCTCAACAGCTCAAACAGCTAGAATCTG  
AGGGCCGGAGCCCCATTTTTACCCACCTGGTGACTTCCCTGAAGGGACTGTGGA  
CTCTGAGAGCATTTCGGGCGACAGCCTTACTTTGAGACACTGTTCCACAAGGCC  
TGAACCTTGCACACTGCCAACTGGTTTCTTTACCTGAGCACACTCCGCTGGTTCCA  
GATGCGGATAGAGATGATCTTCGTCATCTTTTTTATAGCTGTAACCTTCATTTCT  
ATCCTTACAACAGGAGAAGGAGAGGGCAGGGTGGGAATCATCCTCACGCTGGC  
TATGAACATAATGTCCACCTTGCAGTGGGCCGTGAATTCCAGTATAGATGTGGA  
TTCTCTAATGAGGAGTGTCTCCCGGGTGTTTAAATTCATTGATATGCCAACTGAG  
GGGAAACCCACCAAGTCAACAAAACCTTATAAGAATGGACAGCTGAGCAAGGT  
GATGATAATTGAGAACAGCCACGTGAAGAAGGATGACATTTGGCCCAGCGGGG  
GCCAGATGACTGTGAAGGACCTGACGGCCAAGTACACCGAAGGTGGAAATGCC  
ATTTTGGAAAACATCAGCTTCTCAATCTCTCCTGGGCAGAGAGTTGGATTGCTG  
GGTCGCACGGGCAGCGGCAAATCAACCCTGCTCAGTGCCTTCCTTCGGCTCCTG  
AATACAGAAGGCGAAATCCAAATTGACGGGGTGAGCTGGGACAGCATCACCCCT  
GCAGCAGTGGAGAAAAGCATTGTTGGGGTCATTCCACAGAAAGTTTTTCATCTTCTC  
TGGCACTTTCAGAAAGAACCTGGACCCCTATGAGCAGTGGAGCGACCAGGAGA  
TCTGGAAGGTTGCAGATGAAGTTGGCCTGCGGAGTGTGATAGAACAATTCCTG  
GCAAGCTGGATTTTGTGCTGGTAGATGGAGGCTGCGTGCTGTCCCACGGCCACA

AACAGCTGATGTGCCTCGCCCGCTCCGTTCTTTCAAAGGCCAAAATCTTGCTTTT  
GGATGAGCCCAGTGCTCACCTCGACCCAGTGACCTATCAGATAATCCGCAGGAC  
CTTAAAGCAAGCTTTTGCCGACTGCACCGTCATACTGTGTGAGCACCGGATTGA  
AGCAATGCTGGAATGCCAGCAGTTTCTGGTGATCGAGGAGAATAAGGTCCGGC  
AGTACGACAGCATCCAGAAGTTGTTGAATGAGCGCAGCCTTTTCCGCCAGGCCA  
TCTCCCCATCTGACAGAGTCAAGCTGTTTCCACATAGGAACTCCTCTAAGTGCA  
AGTCCAAGCCCCAGATCGCTGCCCTCAAGGAGGAACTGAGGAAGAGGTGCAG  
GATACCCGCCTGTGA (SEQ ID NO: 26)

ATGCAGAGGAGCCCACTGGAGAAAGCCTCCGTGGTGAGTAAACTCTTTTTTATG  
TGGACCAGACCCATCCTGCGAAAAGGATACAGGCAGCGCCTCGAGTTGTCTGAT  
ATCTACCAGATTCCTTCTGTGGACTCAGCTGACAATTTGAGTGAGAAGCTGGAG  
CGGGAGTGGGATAGAGAGCTGGCGAGCAAAAAAAAAACCCAAGCTTATCAATGC  
TCTGCGCCGCTGCTTTTTCTGGAGGTTTCATGTTTTATGGGATCTTCCTGTACCTG  
GGGGAGGTCACCAAAGCTGTTTCAGCCGCTCCTTCTTGGCCGCATCATCGCCAGC  
TATGACCCTGATAATAAAGAAGAAAGGTCTATTGCTATTTATCTGGGAATTGGC  
CTCTGCTTGCTCTTCATCGTCCGCACCCTTCTGCTGCACCCTGCCATTTTTGGCCT  
TCACCACATCGGCATGCAAATGAGAATTGCCATGTTCTCCCTCATTACAAAA  
GACCCTGAAACTTTCCTCAAGAGTGTTAGATAAAAATATCCATTGGTCAGCTGGT  
CAGCCTGCTGTCCAACAATCTTAACAAATTTGATGAAGGCTTGGCGCTGGCCCA  
CTTCGTGTGGATTGCACCTCTGCAGGTGGCCCTGTTGATGGGACTTATATGGGA  
GCTGCTTCAAGCCTCTGCTTTCTGTGGGCTGGGCTTTTTGATTGTACTGGCACTT  
TTTCAGGCTGGGCTCGGAAGAATGATGATGAAATACAGAGATCAGCGGGCCGG  
GAAGATATCAGAGCGACTTGTGATCACCAGTGAAATGATTGAAAATATTCAGA  
GCGTGAAAGCCTACTGCTGGGAAGAAGCCATGGAGAAGATGATTGAGAACCTG  
AGGCAGACAGAGCTCAAGCTCACTCGGAAGGCTGCTTATGTTTCGCTATTTCAAC  
AGCAGCGCCTTCTTCTTCAGTGGCTTCTTTGTTGTCTTCCTGTCTGTTCTGCCATA  
TGCACTGATAAAAAGGCATTATTTTACGAAAGATCTTCACCACCATCAGTTTTTGC  
ATCGTTCTCAGGATGGCCGTCACAAGACAGTTCCCCTGGGCTGTGCAGACCTGG  
TACGATTCTTGGGGGCCATCAACAAGATTCAAGATTTCTTGCAAAAACAAGAA  
TATAAACTTTAGAATACAACCTCACCACCACTGAAGTGGTCATGGAAAATGTG  
ACAGCCTTTTGGGAGGAGGGTTTTGGAGAATTGTTTCGAGAAGGCAAAGCAGAA  
TAACAACAACAGGAAGACGAGCAATGGGGACGACTCTCTCTTCTTCAGCAACTT

TTCAGTCTCGGGACCCCTGTGTTGAAAGATATAAACTTCAAGATCGAGAGGGG  
CCAGCTCTTGGCTGTGGCAGGCTCCACTGGAGCTGGTAAAACATCTCTTCTCAT  
GGTGATCATGGGGGAACTGGAGCCTTCCGAAGGAAAAATCAAGCACAGTGGGA  
GAATCTCATTCTGCAGCCAGTTTTCTGGATCATGCCCGGCACCATTAAGGAAA  
ACATCATATTTGGAGTGTCTTATGATGAGTACCGCTACCGGTCCGTCATCAAAG  
CCTGTCAGTTGGAGGAGGACATCTCCAAGTTTGCAGAGAAAGACAACATTGTGC  
TTGGAGAGGGGGGTATCACTCTTTCTGGAGGACAAAGAGCCAGGATCTCTTTGG  
CCCGGGCAGTCTACAAGGATGCAGACCTCTACTTGTGGACAGTCCCTTCGGCT  
ACCTCGACGTGCTGACTGAAAAAGAAATTTTTGAAAGCTGTGTGTGCAAACCTGA  
TGGCAAACAAGACCAGGATTCTTGTCAACCAGCAAGATGGAACATCTGAAGAAA  
GCGGACAAAATTCTGATTCTGCATGAAGGGAGCTCCTACTTCTATGGAACATTT  
AGCGAGCTTCAGAACCTACAGCCAGACTTCTCCTCCAAATTAATGGGCTGTGAC  
TCCTTCGACCAGTTCTCTGCAGAAAGAAGAACTCTATACTCACAGAGACCCTC  
CACCGCTTCTCCCTTGAGGGAGATGCCCCAGTTTCTTGGACAGAAACCAAGAAG  
CAGTCCTTTAAGCAGACTGGCGAGTTTGGTGAAAAGAGGAAAAATTCAATTCTC  
AATCCAATTAACAGTATTCGCAAGTTCAGCATTGTCCAGAAGACACCCCTCCAG  
ATGAATGGCATCGAAGAAGATAGTGACGAGCCGCTGGAGAGACGGCTGAGTCT  
GGTGCCAGATTCAGAACAGGGGGAGGCCATCCTGCCCCGGATCAGCGTCATTT  
CACAGGCCCCACATTACAAGCACGGCGCCGGCAGAGTGTTTTAAATCTCATGAC  
CCATTAGTGAACCAGGGCCAAAATATCCACAGGAAGACTACAGCTTCTACCCG  
GAAAGTGTCTCTGGCCCCTCAGGCCAATCTGACCGAGCTGGACATCTACAGCAG  
GAGGCTCTCCAGGAAACAGGGCTTGAAATATCTGAAGAGATTAATGAAGAGG  
ATCTTAAAGAGTGCTTCTTTGATGACATGGAGAGCATCCCCGCGGTGACCACAT  
GGAACACCTACCTTAGATATATACTGTCCACAAGAGCCTCATATTTGTCCTCAT  
CTGGTGCCTGGTTATTTTCTCGCTGAGGTGGCGGCCAGTCTTGTGTGCTCTGG  
CTGCTGGGCAACACTCCTCTCCAGGACAAGGGCAATAGTACTCACAGCAGAAA  
TAATTCTTATGCCGTCATCATTACAAGCACCTCCAGCTACTACGTGTTCTACATC  
TATGTGGGCGTGGCTGACACCCTCCTGGCCATGGGTTTCTTCCGGGGCCTGCCTT  
TGGTGCACACCCTCATCACAGTGTCAAAAATTCTGCACCATAAAATGCTTCATT  
CTGTCCTGCAGGCACCCATGAGCACTTTGAACACATTGAAGGCTGGCGGCATCC  
TCAACAGATTTTCTAAAGATATTGCTATCCTGGATGATCTCCTCCCCCTGACAAT  
CTTTGACTTTATCCAGCTTCTGCTGATCGTGATTGGAGCCATAGCAGTGGTTGCT

GTCCTGCAGCCCTACATTTTTGTGGCCACCGTGCCCGTGATTGTTGCCTTTATTA  
TGCTCAGAGCTTACTTCCTGCAAACCTTCTCAACAGCTCAAACAGCTAGAATCTG  
AGGGCCGGAGCCCCATTTTTACCCACCTGGTGACTTCCCTGAAGGGACTGTGGA  
CTCTGAGAGCATTTCGGGCGACAGCCTTACTTTGAGACACTGTTCCACAAGGCC  
TGAACCTGCACACTGCCAACTGGTTTCTTTACCTGAGCACACTCCGCTGGTTCCA  
GATGCGGATAGAGATGATCTTCGTCATCTTTTTTATAGCTGTAACCTTCATTTCT  
ATCCTTACAACAGGAGAAGGAGAGGGCAGGGTGGGAATCATCCTCACGCTGGC  
TATGAACATAATGTCCACCTTGCAGTGGGCCGTGAATTCCAGTATAGATGTGGA  
TTCTCTAATGAGGAGTGTCTCCCGGGTGTAAATTTCATTGATATGCCTACTGAG  
GGGAAACCCACCAAGTCAACAAAGCCTTATAAGAATGGACAGCTGAGCAAGGT  
GATGATAATTGAGAACAGCCACGTGAAGAAGGATGACATTTGGCCCAGCGGGG  
GCCAGATGACTGTGAAGGACCTGACGGCCAAGTACACCGAAGGTGGAAATGCC  
ATTTTGGAAAACATCAGCTTCTCAATCTCTCCTGGGCAGAGAGTTGGATTGCTG  
GGTCGCACGGGCAGCGGCAAATCAACCCTGCTCAGTGCCTTCCTTCGGCTCCTG  
AATACAGAAGGCGAAATCCAAATTGACGGGGTGTGAGCTGGGACAGCATCACCT  
GCAGCAGTGGAGAAAAGCATTGTTGGGGTTCATTCCACAGAAAGTTTTTCATCTTCTC  
TGGCACTTTCAGAAAGAACCTGGACCCCTATGAGCAGTGGAGCGACCAGGAGA  
TCTGGAAGGTTGCAGATGAAGTTGGCCTGCGGAGTGTGATAGAACAATTCCTG  
GCAAGCTGGATTTTGTGCTGGTAGATGGAGGCTGCGTGCTGTCCCACGGCCACA  
AACAGCTGATGTGCCTCGCCCGCTCCGTTCTTTCAAAGGCCAAAATCTTGCTTTT  
GGATGAGCCCAGTGCTCACCTCGACCCAGTGACCTATCAGATAATCCGCAGGAC  
CTTAAAGCAAGCTTTTGGCGACTGCACCGTCATACTGTGTGAGCACCGGATTGA  
AGCAATGCTGGAATGCCAGCAGTTTCTGGTGATCGAGGAGAATAAGGTCCGGC  
AGTACGACAGCATCCAGAAGTTGTTGAATGAGCGCAGCCTTTTCCGCCAGGCCA  
TCTCCCCATCTGACAGAGTCAAGCTGTTTCCACATAGGAACTCCTCTAAGTGCA  
AGTCCAAGCCCCAGATCGCTGCCCTCAAGGAGGAACTGAGGAAGAGGTGCAG  
GATACCCGCCTGTGA (SEQ ID NO: 27)

ATGCAGAGGAGCCCCTGGAGAAAGCCTCCGTGGTGAGTAACTCTTTTTTGTAGT  
TGGACCAGACCCATCCTGCGAAAAGGATACAGGCAGCGCCTCGAGTTGTCAGA  
TATCTACCAGATTCCTTCTGTGGACTCAGCTGACAATTTGAGTGAGAAGCTGGA  
GCGGGAGTGGGATAGAGAGCTGGCGAGCAAAAAAACCCTAAGCTTATCAATG  
CTCTGCGCCGCTGCTTTTTCTGGAGGTTTCATGTTTTATGGGATCTTCCTGTACCT

GGGGGAGGTCACCAAAGCTGTTTCAGCCGCTCCTTCTTGGCCGCATCATCGCCAG  
CTATGACCCTGATAATAAAGAAGAAAGGTCTATTGCTATTTATCTGGGAATTGG  
CCTCTGCTTGCTCTTCATCGTCCGCACCCTTCTGCTGCACCCTGCCATTTTTGGCC  
TTCACCACATCGGCATGCAAATGAGAATTGCCATGTTCTCCCTCATTTACAAA  
AGACCCTGAAACTTTCCTCAAGAGTGTTAGATAAAAATATCCATTGGTCAGCTGG  
TCAGCCTGCTGTCCAACAATCTTAACAATTTGATGAAGGCTTGGCGCTGGCCC  
ACTTCGTGTGGATTGCACCTCTGCAGGTGGCCCTGTTGATGGGACTTATATGGG  
AGCTGCTTCAAGCCTCTGCTTTCTGTGGGCTGGGCTTTTTGATTGTACTGGCACT  
TTTTCAGGCTGGGCTCGGAAGAATGATGATGAAATACAGAGATCAGCGGGCCG  
GGAAGATATCAGAGCGACTTGTGATCACCAGTGAAATGATTGAAAATATTCAG  
AGCGTGAAAGCCTACTGCTGGGAAGAAGCCATGGAGAAGATGATTGAGAACCT  
GAGGCAGACAGAGCTCAAGCTCACTCGGAAGGCTGCTTATGTTTCGCTATTTCAA  
CAGCAGCGCCTTCTTCTTCAGTGGCTTCTTTGTTGTCTTCCTGTCTGTTCTGCCAT  
ATGCACTGATAAAAAGGCATTATTTTACGAAAGATCTTCACCACCATCAGTTTTT  
GCATCGTTCTCAGGATGGCCGTCACAAGACAGTTCCTCCCTGGGCTGTGCAGACCT  
GGTACGATTCTTGGGGGCCATCAACAAGATTCAAGATTTCTTGCAAAAACAAG  
AATATAAACTTTAGAATACAACCTCACCACCCTGAAGTGGTCATGGAAAATG  
TGACAGCCTTTTGGGAGGAGGGTTTTGGAGAATTGTTTCGAGAAGGCAAAGCAG  
AATAACAACAACAGGAAGACGAGCAATGGGGACGACTCTCTCTTCTTCAGCAA  
CTTTTCACTGCTCGGGACCCCTGTGTTGAAAGATATAAACTTCAAGATCGAGAG  
GGGCCAGCTCTTGGCTGTGGCAGGCTCCACTGGAGCTGGTAAAACATCTCTTCT  
CATGGTGATCATGGGGGAACTGGAGCCTTCCGAAGGAAAAATCAAGCACAGTG  
GGAGAATCTCATTCTGCAGCCAGTTTTCTGGATCATGCCCGGCACCATTAAGG  
AAAACATCATATTTGGAGTGTCTATGATGAGTACCGCTACCGGTCAGTCATCA  
AAGCCTGTCAGTTGGAGGAGGACATCTCCAAGTTTGCAGAGAAAGACAACATT  
GTGCTTGGAGAGGGGGGTATCACTCTTTCTGGAGGACAAAGAGCCAGGATCTCT  
TTGGCCCGGGCAGTCTACAAGGATGCAGACCTCTACTTGTGGACAGTCCCTTC  
GGCTACCTCGACGTGCTGACTGAAAAAGAAATTTTTGAAAGCTGTGTGTGCAAA  
CTGATGGCAAACAAGACCAGGATTCTTGTACCAGCAAGATGGAACATCTGAA  
GAAAGCGGACAAAATTCTGATTCTGCATGAAGGGAGCTCCTACTTCTATGGAAC  
ATTTAGCGAGCTTCAGAACCTACAGCCAGACTTCTCCTCAAATTAATGGGCTG  
TGACTCCTTCGACCAGTTCTCTGCAGAAAGAAGAACTCTATACTCACAGAGAC

CCTCCACCGCTTCTCCCTTGAGGGAGATGCCCCAGTTTCTTGGACAGAAACCAA  
GAAGCAGTCCTTTAAGCAGACTGGCGAGTTTGGTGAAAAGAGGAAAAATTCAA  
TTCTCAATCCTATTAACAGTATTCGCAAGTTCAGCATTGTCCAGAAGACACCCCT  
CCAGATGAATGGCATCGAAGAAGATAGTGACGAGCCGCTGGAGAGACGGCTGA  
GTCTGGTGCCAGATTCAGAACAGGGGGAGGCCATCCTGCCCCGGATCAGCGTC  
ATTTCCACAGGCCCCACATTACAAGCACGGCGCCGGCAGAGTGTTTTAAATCTC  
ATGACCCATTCAGTGAACCAGGGCCAAAATATCCACAGGAAGACTACAGCTTCT  
ACCCGGAAAGTGTCTCTGGCCCCTCAGGCCAATCTGACCGAGCTGGACATCTAC  
AGCAGGAGGCTCTCCCAGGAAACAGGGCTTGAAATATCTGAAGAGATTAATGA  
AGAGGATCTTAAAGAGTGCTTCTTTGATGACATGGAGAGCATCCCCGCGGTGAC  
CACATGGAACACCTACCTTAGATATATTACTGTCCACAAGAGCCTCATATTTGT  
CCTCATCTGGTGCCTGGTTATTTTCCTCGCTGAGGTGGCGGCCAGTCTTGTTGTG  
CTCTGGCTGCTGGGCAACACTCCTCTCCAGGACAAGGGCAATAGTACACACAGC  
AGAAATAATTCTTATGCCGTCATCATTACAAGCACCTCCAGCTACTACGTGTTCT  
ACATCTATGTGGGCGTGGCTGACACCCTCCTGGCCATGGGTTTCTTCCGGGGCC  
TGCCTTTGGTGCACACCCTCATCACAGTGTCAAAAATTCTGCACCATAAAATGC  
TTCATTCTGTCCTGCAGGCACCCATGAGCACTTTGAACACATTGAAGGCTGGCG  
GCATCCTCAACAGATTTTCTAAAGATATTGCTATCCTGGATGATCTCCTCCCCCT  
GACAATCTTTGACTTTATCCAGCTTCTGCTGATCGTGATTGGAGCCATAGCAGTG  
GTTGCTGTCCTGCAGCCCTACATTTTTGTGGCCACCGTGCCCGTGATTGTTGCCT  
TTATTATGCTCAGAGCTTACTTCCTGCAAACCTTCTCAACAGCTCAAACAGCTAG  
AATCTGAGGGCCGGAGCCCCATTTTTACCCACCTGGTGACTTCCCTGAAGGGAC  
TGTGGACTCTGAGAGCATTGCGGGCGACAGCCTTACTTTGAGACACTGTTCCACA  
AGGCCCTGAACTTGCACACTGCCAACTGGTTTCTTTACCTGAGCACACTCCGCT  
GGTTCCAGATGCGGATAGAGATGATCTTCGTCATCTTTTTTATAGCTGTAACCTT  
CATTTCTATCCTTACAACAGGAGAAGGAGAGGGCAGGGTGGGAATCATCCTCA  
CGCTGGCTATGAACATAATGTCCACCTTGCAGTGGGCCGTGAATTCCAGTATAG  
ATGTGGATTCTCTAATGAGGAGTGTCTCCCGGGTGTTTAAATTCATTGATATGCC  
TACTGAGGGGAAACCCACCAAGTCAACAAAACCTTATAAGAATGGACAGCTGA  
GCAAGGTGATGATAATTGAGAACAGCCACGTGAAGAAGGATGACATTTGGCCC  
AGCGGGGGCCAGATGACTGTGAAGGACCTGACGGCCAAGTACACCGAAGGTGG  
AAATGCCATTTTGAAAACATCAGCTTCTCAATCTCTCCTGGGCAGAGAGTTGG

ATTGCTGGGTCGCACGGGCAGCGGCAAATCAACCCTGCTCAGTGCCTTCCTTCG  
GCTCCTGAATACAGAAGGCGAAATCCAAATTGACGGGGTGAGCTGGGACAGCA  
TCACCCTGCAGCAGTGGAGAAAAGCATTGTTGGGGTCATTCCACAGAAAGTTTTCA  
TCTTCTCTGGCACTTTCAGAAAGAACCTGGACCCCTATGAGCAGTGGAGCGACC  
AGGAGATCTGGAAGGTTGCAGATGAAGTTGGCCTGCGGAGTGTGATAGAACAA  
TTTCCTGGCAAGCTGGATTTTGTGCTGGTAGATGGAGGCTGCGTGCTGTCCCAC  
GGCCACAAACAGCTGATGTGCCTCGCCCGCTCCGTTCTTTCAAAGGCCAAAATC  
TTGCTTTTGGATGAGCCCAGTGCTCACCTCGACCCAGTGACCTATCAGATAATC  
CGCAGGACCTTAAAGCAAGCTTTTGCCGACTGCACCGTCATACTGTGTGAGCAC  
CGGATTGAAGCAATGCTGGAATGCCAGCAGTTTCTGGTGATCGAGGAGAATAA  
GGTCCGGCAGTACGACAGCATCCAGAAGTTGTTGAATGAGCGCAGCCTTTTCCG  
CCAGGCCATCTCCCCATCTGACAGAGTCAAGCTGTTTCCACATAGGAACTCCTC  
TAAGTGCAAGTCCAAGCCCCAGATCGCTGCCCTCAAGGAGGAAACTGAGGAAG  
AGGTGCAGGATAACCCGCCTGTGA (SEQ ID NO: 28)

ATGCAGAGGAGCCCACTGGAGAAAGCCTCCGTGGTGAGTAAACTCTTTTTTAGT  
TGGACCAGACCCATCCTGCGAAAAGGATACAGGCAGCGCCTCGAGTTGTCAGA  
TATCTACCAGATTCCTTCTGTGGACTCAGCTGACAATTTGAGTGAGAAGCTGGA  
GCGGGAGTGGGATAGAGAGCTGGCGAGCAAAAAAAAAACCCCAAGCTTATCAATG  
CTCTGCGCCGCTGCTTTTTTCTGGAGGTTTCATGTTTTATGGGATCTTCCTGTACCT  
GGGGGAGGTCACCAAAGCTGTTTCAGCCGCTCCTTCTTGGCCGCATCATCGCCAG  
CTATGACCCTGATAATAAAGAAGAAAGGTCTATTGCTATTTATCTGGGAATTGG  
CCTCTGCTTGCTCTTCATCGTCCGCACCCTTCTGCTGCACCCTGCCATTTTTGGCC  
TTCACCACATCGGCATGCAAATGAGAATTGCCATGTTCTCCCTCATTTACAAA  
AGACCCTGAAACTTTCCTCAAGAGTGTTAGATAAAATATCCATTGGTCAGCTGG  
TCAGCCTGCTGTCCAACAATCTTAACAATTTGATGAAGGCTTGGCGCTGGCCC  
ACTTCGTGTGGATTGCACCTCTGCAGGTGGCCCTGTTGATGGGACTTATATGGG  
AGCTGCTTCAAGCCTCTGCTTTTCTGTGGGCTGGGCCTTTTTGATTGTA  
ACTGGCACT  
TTTTTCAGGCTGGGCTCGGAAGAATGATGATGAAATACAGAGATCAGCGGGCCG  
GGAAGATATCAGAGCGACTTGTGATCACCAGTGAAATGATTGAAAATATTCAG  
AGCGTGAAAGCCTACTGCTGGGAAGAAGCCATGGAGAAGATGATTGAGAACCT  
GAGGCAGACAGAGCTCAAGCTCACTCGGAAGGCTGCTTATGTTTCGCTATTTCAA  
CAGCAGCGCCTTCTTCTTCAGTGGCTTCTTTGTTGTCTTCCTGTCTGTTCTGCCAT

ATGCACTGATAAAAAGGCATTATTTTACGAAAGATCTTCACCACCATCAGTTTTT  
GCATCGTTCTCAGGATGGCCGTCACAAGACAGTTCCCCTGGGCTGTGCAGACCT  
GGTACGATTCCCTGGGGGCCATCAACAAGATTCAAGATTTCTTGCAAAAACAAG  
AATATAAACTTTAGAAATACAACCTCACCACCACTGAAGTGGTCATGGAAAATG  
TGACAGCCTTTTGGGAGGAGGGTTTTGGAGAATTGTTTCGAGAAGGCAAAGCAG  
AATAACAACAACAGGAAGACGAGCAATGGGGACGACTCTCTCTTCTTCAGCAA  
CTTTTCACTGCTCGGGACCCCTGTGTTGAAAGATATAAACTTCAAGATCGAGAG  
GGGCCAGCTCTTGGCTGTGGCAGGCTCCACTGGAGCTGGTAAAACATCTCTTCT  
CATGGTGATCATGGGGGAACTGGAGCCTTCCGAAGGAAAAATCAAGCACAGTG  
GGAGAATCTCATTCTGCAGCCAGTTTTCTGGATCATGCCCCGGCACCATTAAGG  
AAAACATCATATTTGGAGTGTCTATGATGAGTACCGCTACCGGTCCGTCATCA  
AAGCCTGTCAGTTGGAGGAGGACATCTCCAAGTTTGCAGAGAAAGACAACATT  
GTGCTTGGAGAGGGGGGTATCACTCTTCTGGAGGACAAAGAGCCAGGATCTCT  
TTGGCCCCGGGCAGTCTACAAGGATGCAGACCTCTACTTGTTGGACAGTCCCTTC  
GGCTACCTCGACGTGCTGACTGAAAAAGAAATTTTTGAAAGCTGTGTGTGCAAA  
CTGATGGCAAACAAGACCAGGATTCTTGTACCAGCAAGATGGAACATCTGAA  
GAAAGCGGACAAAATTCTGATTCTGCATGAAGGGAGCTCCTACTTCTATGGAAC  
ATTTAGCGAGCTTCAGAACCTACAGCCAGACTTCTCCTCCAAATTAATGGGCTG  
TGACTCCTTCGACCAGTTCTCTGCAGAAAGAAGAACTCTATACTCACAGAGAC  
CCTCCACCGCTTCTCCCTTGAGGGAGATGCCCCAGTTTCTTGGACAGAAACCAA  
GAAGCAGTCCTTTAAGCAGACTGGCGAGTTTGGTGAAAAGAGGAAAAATTCAA  
TTCTCAATCCAATTAACAGTATTCGCAAGTTCAGCATTGTCCAGAAGACACCCC  
TCCAGATGAATGGCATCGAAGAAGATAGTGACGAGCCGCTGGAGAGACGGCTG  
AGTCTGGTGCCAGATTCAGAACAGGGGGAGGCCATCCTGCCCCGGATCAGCGT  
CATTTCCACAGGCCCCACATTACAAGCACGGCGCCGGCAGAGTGTTTTAAATCT  
CATGACCCATTCAGTGAACCAGGGCCAAAATATCCACAGGAAGACTACAGCTT  
CTACCCGGAAAGTGTCTCTGGCCCCTCAGGCCAATCTGACCGAGCTGGACATCT  
ACAGCAGGAGGCTCTCCAGGAAACAGGGCTGGAAATATCTGAAGAGATTAAT  
GAAGAGGATCTTAAAGAGTGCTTCTTTGATGACATGGAGAGCATCCCCGCGGTG  
ACCACATGGAACACCTACCTTAGATATATTACTGTCCACAAGAGCCTCATATTT  
GTCCTCATCTGGTGCCTGGTTATTTTCTCGCTGAGGTGGCGGCCAGTCTTGTG  
TGCTCTGGCTGCTGGGCAACACTCCTCTCCAGGACAAGGGCAATAGTACTCACA

GCAGAAATAATTCTTATGCCGTCATCATTACAAGCACCTCCAGCTACTACGTGT  
TCTACATCTATGTGGGCGTGGCTGACACCCTCCTGGCCATGGGTTTCTTCCGGGG  
CCTGCCTTTGGTGCACACCCTCATCACAGTGTCAAAAATTCTGCACCATAAAAT  
GCTTCATTCTGTCCTGCAGGCACCCATGAGCACTTTGAACACATTGAAGGCTGG  
CGGCATCCTCAACAGATTTTCTAAAGATATTGCTATCCTGGATGATCTCCTCCCC  
CTGACAATCTTTGACTTTATCCAGCTTCTGCTGATCGTGATTGGAGCCATAGCAG  
TGGTTGCTGTCCTGCAGCCCTACATTTTTGTGGCCACCGTGCCCGTGATTGTTGC  
CTTTATTATGCTCAGAGCTTACTTCCTGCAAACCTTCTCAACAGCTCAAACAGCTA  
GAGTCTGAGGGCCGGAGCCCCATTTTTACCCACCTGGTGACTTCCCTGAAGGGA  
CTGTGGACTCTGAGAGCATTTCGGGCGACAGCCTTACTTTGAGACACTGTTCCAC  
AAGGCCCTGAACTTGCACACTGCCAACTGGTTTCTTTACCTGAGCACACTCCGC  
TGGTTCCAGATGCGGATAGAGATGATCTTCGTCATCTTTTTTATAGCTGTAACCT  
TCATTTCTATCCTTACAACAGGAGAAGGAGAGGGCAGGGTGGGAATCATCCTCA  
CGCTGGCTATGAACATAATGTCCACCTTGCAGTGGGCCCGTGAATTCCAGTATAG  
ATGTGGATTCTCTAATGAGGAGTGTCTCCCGGGTGTTTAAATTCATTGATATGCC  
TACTGAGGGGAAACCCACCAAGTCAACAAAACCTTATAAGAATGGACAGCTGA  
GCAAGGTGATGATAATTGAGAACAGCCACGTGAAGAAGGATGACATTTGGCCC  
AGCGGGGGCCAGATGACTGTGAAGGACCTGACGGCCAAGTACACCGAAGGTGG  
AAATGCCATTTTGGAAAACATCAGCTTCTCAATCTCTCCTGGGCAGAGAGTTGG  
ATTGCTGGGTCGCACGGGCAGCGGCAAATCAACCCTGCTCAGTGCCTTCCTTCG  
GCTCCTGAATACAGAAGGCGAAATCCAAATTGACGGGGTGAGCTGGGACAGCA  
TCACCCTGCAGCAGTGGAGAAAAGCATTGTTGGGGTCAATCCACAGAAAGTTTTCA  
TCTTCTCTGGCACTTTCAGAAAGAACCTGGACCCCTATGAGCAGTGGAGCGACC  
AGGAGATCTGGAAGGTTGCAGATGAAGTTGGCCTGCGGAGTGTGATAGAACAA  
TTTCTGGAAGCTGGATTTTGTGCTGGTAGATGGAGGCTGCGTGCTGTCCCAC  
GGCCACAAACAGCTGATGTGCCTCGCCCGCTCCGTTCTTTCAAAGGCCAAAATC  
TTGCTTTTGGATGAGCCCAGTGCTCACCTCGACCCAGTGACCTATCAGATAATC  
CGCAGGACCTTAAAGCAAGCTTTTGCCGACTGCACCGTCATACTGTGTGAGCAC  
CGGATTGAAGCAATGCTGGAATGCCAGCAGTTTCTGGTGATCGAGGAGAATAA  
GGTCCGGCAGTACGACAGCATCCAGAAGTTGTTGAATGAGCGCAGCCTTTTCCG  
CCAGGCCATCTCCCCATCTGACAGAGTCAAGCTGTTTCCACATAGGAACTCCTC

TAAGTGCAAGTCCAAGCCCCAGATCGCTGCCCTCAAGGAGGAAACTGAGGAAG  
AGGTGCAGGATACCCGCCTGTGA (SEQ ID NO: 29)

ATGCAGAGGAGCCCCTGGAGAAAGCCTCCGTGGTGAGTAAACTCTTTTTTAGT  
TGGACCAGACCCATCCTGCGAAAAGGATACAGGCAGCGCCTCGAGTTGTCTGAT  
ATCTACCAGATTCCTTCTGTGGACTCAGCTGACAATTTGAGTGAGAAGCTGGAG  
CGGGAGTGGGATAGAGAGCTGGCGAGCAAAAAAACCCCAAGCTTATCAATGC  
TCTGCGCCGCTGCTTTTTCTGGAGGTTTCATGTTTTATGGGATCTTCCTGTACCTG  
GGGGAGGTCACCAAAGCTGTTTCAGCCGCTCCTTCTTGGCCGCATCATCGCCAGC  
TATGACCCTGATAATAAAGAAGAAAGGTCTATTGCTATTTATCTGGGAATTGGC  
CTCTGCTTGCTCTTCATCGTCCGCACCCTTCTGCTGCACCCTGCCATTTTTGGCCT  
TCACCACATCGGCATGCAAATGAGAATTGCCATGTTCTCCCTCATTACAAAA  
GACCCTGAAACTTTCCTCAAGAGTGTTAGATAAAATATCCATTGGTCAGCTGGT  
CAGCCTGCTGTCCAACAATCTTAACAAATTTGATGAAGGCTTGGCGCTGGCCCA  
CTTCGTGTGGATTGCACCTCTGCAGGTGGCCCTGTTGATGGGACTTATATGGGA  
GCTGCTTCAAGCCTCTGCTTTCTGTGGGCTGGGCTTTTTGATTGTACTGGCACTT  
TTTCAGGCTGGGCTCGGAAGAATGATGATGAAATACAGAGATCAGCGGGCCGG  
GAAGATTCAGAGCGACTTGTGATCACCAGTGAAATGATTGAAAATATTCAGAG  
CGTGAAAGCCTACTGCTGGGAAGAAGCCATGGAGAAGATGATTGAGAACCTGA  
GGCAGACAGAGCTCAAGCTCACTCGGAAGGCTGCTTATGTTTCGCTATTTCAACA  
GCAGCGCCTTCTTCTTCAGTGGCTTCTTTGTTGTCTTCCTGTCTGTTCTGCCATAT  
GCACTGATAAAAGGCATTATTTTACGAAAGATCTTCACCACCATCAGTTTTTGC  
ATCGTTCTCAGGATGGCCGTCACAAGACAGTTCCTCCCTGGGCTGTGCAGACCTGG  
TACGATTCCTTGGGGGCCATCAACAAGATTCAAGATTTCTTGCAAAAACAAGAA  
TATAAACTTTAGAATACAACCTCACCACCACTGAAGTGGTCATGGAAAATGTG  
ACAGCCTTTTGGGAGGAGGGTTTTGGAGAATTGTTTCGAGAAGGCAAAGCAGAA  
TAACAACAACAGGAAGACGAGCAATGGGGACGACTCTCTCTTCTTCAGCAACTT  
TTCCTGCTCGGGACCCCTGTGTTGAAAGATATAAACTTCAAGATCGAGAGGGG  
CCAGCTCTTGGCTGTGGCAGGCTCCACTGGAGCTGGTAAAACATCTCTTCTCAT  
GGTGATCATGGGGGAACTGGAGCCTTCCGAAGGAAAAATCAAGCACAGTGGGA  
GAATCTCATTCTGCAGCCAGTTTTCTGGATCATGCCCGGCACCATTAAGGAAA  
ACATCATATTTGGAGTGTCTTATGATGAGTACCGCTACCGGTCAGTCATCAAAG  
CCTGTCAGTTGGAGGAGGACATCTCCAAGTTTGCAGAGAAAGACAACATTGTGC

TTGGAGAGGGGGGTATCACTCTTTCTGGAGGACAAAGAGCCAGGATCTCTTTGG  
CCCGGGCAGTCTACAAGGATGCAGACCTCTACTTGTTGGACAGTCCCTTCGGCT  
ACCTCGACGTGCTGACTGAAAAAGAAATTTTTGAAAGCTGTGTGTGCAAACCTGA  
TGGCAAACAAGACCAGGATTCTTGTCAACCAGCAAGATGGAACATCTGAAGAAA  
GCGGACAAAATTCTGATTCTGCATGAAGGGAGCTCCTACTTCTATGGAACATTT  
AGCGAGCTTCAGAACCTACAGCCAGACTTCTCCTCCAAATTAATGGGCTGTGAC  
TCCTTCGACCAGTTCTCTGCAGAAAGAAGAACTCTATACTCACAGAGACCCTC  
CACCGCTTCTCCCTTGAGGGAGATGCCCCAGTTTCTTGGACAGAAACCAAGAAG  
CAGTCCTTTAAGCAGACTGGCGAGTTTGGTGAAAAGAGGAAAAATTCAATTCTC  
AATCCTATTAACAGTATTCGCAAGTTCAGCATTGTCCAGAAGACACCCCTCCAG  
ATGAATGGCATCGAAGAAGATAGTGACGAGCCGCTGGAGAGACGGCTGAGTCT  
GGTGCCAGATTCAGAACAGGGGGAGGCCATCCTGCCCCGGATCAGCGTCATTT  
CACAGGCCCCACATTACAAGCACGGCGCCGGCAGAGTGTTTTAAATCTCATGAC  
CCATTCAGTGAACCAGGGCCAAAATATCCACAGGAAGACTACAGCTTCTACCCG  
GAAAGTGTCTCTGGCCCCTCAGGCCAATCTGACCGAGCTGGACATCTACAGCAG  
GAGGCTCTCCAGGAAACAGGGCTGGAAATATCTGAAGAGATTAATGAAGAGG  
ATCTTAAAGAGTGCTTCTTTGATGACATGGAGAGCATCCCCGCGGTGACCACAT  
GGAACACCTACCTTAGATATATTACTGTCCACAAGAGCCTCATATTTGTCCTCAT  
CTGGTGCCTGGTTATTTTCCTCGCTGAGGTGGCGGCCAGTCTTGTTGTGCTCTGG  
CTGCTGGGCAACACTCCTCTCCAGGACAAGGGCAATAGTACACACAGCAGAAA  
TAATTCTTATGCCGTCATCATTACAAGCACCTCCAGCTACTACGTGTTCTACATC  
TATGTGGGCGTGGCTGACACCCTCCTGGCCATGGGTTTTCTTCCGGGGCCTGCCTT  
TGGTGCACACCCTCATCACAGTGTCAAAAATTCTGCACCATAAAAATGCTTCATT  
CTGTCCTGCAGGCACCCATGAGCACTTTGAACACATTGAAGGCTGGCGGCATCC  
TCAACAGATTTTCTAAAGATATTGCTATCCTGGATGATCTCCTCCCCCTGACAAT  
CTTTGACTTTATCCAGCTTCTGCTGATCGTGATTGGAGCCATAGCAGTGGTTGCT  
GTCCTGCAGCCCTACATTTTTGTGGCCACCGTGCCCGTGATTGTTGCCTTTATTA  
TGCTCAGAGCTTACTTCCTGCAAACCTTCTCAACAGCTCAAACAGCTAGAATCTG  
AGGGCCGGAGCCCCATTTTTACCCACCTGGTGACTTCCCTGAAGGGACTGTGGA  
CTCTGAGAGCATTTCGGGCGACAGCCTTACTTTGAGACACTGTTCCACAAGGCC  
TGAACCTGCACACTGCCAACTGGTTTTCTTTACCTGAGCACACTCCGCTGGTTCCA  
GATGCGGATAGAGATGATCTTCGTCATCTTTTTTATAGCTGTAACCTTCATTTCT

ATCCTTACAACAGGAGAAGGAGAGGGCAGGGTGGGAATCATCCTCACGCTGGC  
TATGAACATAATGTCCACCTTGCAGTGGGCCGTGAATTCCAGTATAGATGTGGA  
TTCTCTAATGAGGAGTGTCTCCCGGGTGTAAATTCATTGATATGCCTACTGAG  
GGGAAACCCACCAAGTCAACAAAACCTTATAAGAATGGACAGCTGAGCAAGGT  
GATGATAATTGAGAACAGCCACGTGAAGAAGGATGACATTTGGCCCAGCGGGG  
GCCAGATGACTGTGAAGGACCTGACGGCCAAGTACACCGAAGGTGGAAATGCC  
ATTTTGGAAAACATCAGCTTCTCAATCTCTCCTGGGCAGAGAGTTGGATTGCTG  
GGTCGCACGGGCAGCGGCAAATCAACCCTGCTCAGTGCCTTCCTTCGGCTCCTG  
AATACAGAAGGCGAAATCCAAATTGACGGGGTGAGCTGGGACAGCATCACCCCT  
GCAGCAGTGGAGAAAAGCATTGTTGGGGTCATTCCACAGAAAGTTTTTCATCTTCTC  
TGGCACTTTCAGAAAGAACCTGGACCCCTATGAGCAGTGGAGCGACCAGGAGA  
TCTGGAAGGTTGCAGATGAAGTTGGCCTGCGGAGTGTGATAGAACAATTCCTG  
GCAAGCTGGATTTTGTGCTGGTAGATGGAGGCTGCGTGCTGTCCCACGGCCACA  
AACAGCTGATGTGCCTCGCCCGCTCCGTTCTTTCAAAGGCCAAAATCTTGCTTTT  
GGATGAGCCCAGTGCTCACCTCGACCCAGTGACCTATCAGATAATCCGCAGGAC  
CTTAAAGCAAGCTTTTGGCCGACTGCACCGTCATACTGTGTGAGCACCGGATTGA  
AGCAATGCTGGAATGCCAGCAGTTTCTGGTGATCGAGGAGAATAAGGTCCGGC  
AGTACGACAGCATCCAGAAGTTGTTGAATGAGCGCAGCCTTTTCCGCCAGGCCA  
TCTCCCCATCTGACAGAGTCAAGCTGTTTCCACATAGGAACTCCTCTAAGTGCA  
AGTCCAAGCCCCAGATCGCTGCCCTCAAGGAGGAACTGAGGAAGAGGTGCAG  
GATACCCGCCTGTGA (SEQ ID NO: 30)

ATGCAGAGAAGCCCCCTGGAGAAGGCCTCTGTGGTGAGCAAGCTGTTCTTCAGC  
TGGACCAGACCCATCCTGAGAAAGGGCTACAGACAGAGACTGGAGCTGTCTGA  
CATCTACCAGATCCCCTCTGTGGACTCTGCCGACAACCTGTCTGAGAAGCTGGA  
GAGAGAGTGGGACAGAGAGCTGGCCAGCAAGAAGAACCCCAAGCTGATCAAT  
GCCCTGAGAAGATGCTTCTTCTGGAGATTCATGTTCTATGGCATCTTCCTGTACC  
TGGGAGAGGTGACCAAGGCCGTGCAGCCCCTGCTGCTGGGCAGGATCATTGCC  
AGCTATGACCCTGACAACAAGGAGGAGAGAAGCATTGCCATCTACCTGGGCAT  
TGGCCTGTGCCTGCTGTTTATTGTGAGAACCCTGCTGCTGCACCCTGCCATCTTT  
GGCCTGCACCACATTGGCATGCAGATGAGAATTGCCATGTTTCCAGCCTGATCTAC  
AAGAAGACCCTGAAGCTGAGCAGCAGAGTGCTGGACAAGATCAGCATTGGCCA  
GCTGGTGAGCCTGCTGAGCAACAACCTGAACAAGTTTGTGATGAGGGCCTGGCCCT

GGCCCACTTTGTGTGGATTGCCCCCTGCAGGTGGCCCTGCTGATGGGCCTGAT  
CTGGGAGCTGCTGCAGGCCTCTGCCTTCTGTGGCCTGGGCTTCCTGATTGTGCTG  
GCCCTGTTCCAGGCCGGCCTGGGCAGAATGATGATGAAGTACAGAGACCAGAG  
AGCCGGCAAGATCTCTGAGAGACTGGTGATCACCTCTGAGATGATTGAGAACAT  
CCAGTCTGTGAAGGCCTACTGCTGGGAGGAGGCCATGGAGAAGATGATTGAGA  
ACCTGAGACAGACAGAGCTGAAGCTGACCAGGAAGGCCGCCTATGTGAGATAC  
TTCAACAGCTCTGCCTTCTTCTTCTCTGGCTTCTTTGTGGTGTTCCTGTCTGTGCT  
GCCCTATGCCCTGATCAAGGGCATCATCCTGAGGAAGATCTTCACCACCATCAG  
CTTCTGCATTGTGCTGAGGATGGCCGTGACCAGGCAGTTCCCCTGGGCCGTGCA  
GACCTGGTATGACAGCCTGGGGGCCATCAACAAGATCCAGGACTTCCTGCAGA  
AGCAGGAGTACAAGACCCTGGAGTACAACCTGACCACCACAGAGGTGGTGATG  
GAGAATGTGACAGCCTTCTGGGAGGAGGGCTTTGGAGAGCTGTTTGAGAAGGC  
CAAGCAGAACAACAACAACAGAAAGACCAGCAATGGAGATGACAGCCTGTTCT  
TCAGCAACTTCAGCCTGCTGGGCACCCCTGTGCTGAAGGACATCAACTTCAAGA  
TTGAGAGGGGGCCAGCTGCTGGCCGTGGCCGGCAGCACAGGAGCCGGCAAGACC  
AGCCTGCTGATGGTGATCATGGGAGAGCTGGAGCCCTCTGAGGGCAAGATCAA  
GCACTCTGGCAGAATCAGCTTCTGCAGCCAGTTCAGCTGGATCATGCCTGGCAC  
CATCAAGGAGAACATCATCTTTGGGGTGAGCTATGATGAGTACAGGTACAGATC  
TGTGATCAAGGCCTGCCAGCTGGAGGAGGACATCTCCAAGTTTGCCGAGAAGG  
ACAACATTGTGCTGGGGGAGGGAGGCATCACCTGTCTGGGGGCCAGAGAGCC  
AGAATCAGCCTGGCCAGAGCCGTGTACAAGGATGCCGACCTGTACCTGCTGGA  
CAGCCCCTTTGGCTACCTGGATGTGCTGACAGAGAAGGAGATCTTTGAGAGCTG  
TGTGTGCAAGCTGATGGCCAACAAGACCAGGATCCTGGTGACCAGCAAGATGG  
AGCACCTGAAGAAGGCCGACAAGATCCTGATCCTGCATGAGGGCAGCAGCTAC  
TTCTATGGCACCTTCTCTGAGCTGCAGAACCTGCAGCCTGACTTCAGCAGCAAG  
CTGATGGGCTGTGACAGCTTTGACCAGTTCTCTGCTGAGAGAAGAAACAGCATC  
CTGACAGAGACCCTGCACAGGTTTCAGCCTGGAGGGGGATGCCCTGTGAGCTG  
GACAGAGACCAAGAAGCAGAGCTTCAAGCAGACAGGAGAGTTTGGGGAGAAG  
AGGAAGAACAGCATCCTGAACCCCATCAACAGCATCAGGAAGTTCAGCATTGT  
GCAGAAGACCCCCCTGCAGATGAATGGCATTGAGGAGGACTCTGATGAGCCCC  
TGGAGAGAAGACTGAGCCTGGTGCCAGACTCTGAGCAGGGAGAGGCCATCCTG  
CCCAGGATCTCTGTGATCAGCACAGGCCCCACCCTGCAGGCCAGAAGAAGACA

GTCTGTGCTGAACCTGATGACCCACTCTGTGAACCAGGGCCAGAATATCCACAG  
AAAGACCACAGCCAGCACCAGAAAGGTGAGCCTGGCCCCCAGGCCAACCTGA  
CAGAGCTGGACATCTACAGCAGAAGGCTGAGCCAGGAGACAGGCCTGGAGATC  
TCTGAGGAGATCAATGAGGAGGACCTGAAGGAGTGCTTCTTTGATGACATGGA  
GAGCATCCCTGCCGTGACCACCTGGAACACCTACCTGAGATACATCACAGTGCA  
CAAGAGCCTGATCTTTGTGCTGATCTGGTGCCTGGTGATCTTCCTGGCCGAGGT  
GGCCGCCAGCCTGGTGGTGCTGTGGCTGCTGGGCAACACCCCCCTGCAGGACAA  
GGGCAACAGCACCCACAGCAGAAACAACAGCTATGCTGTGATCATCACCAGCA  
CCAGCAGCTACTATGTGTTCTACATCTATGTGGGAGTGGCTGACACCCTGCTGG  
CCATGGGCTTCTTCAGAGGCCTGCCCCTGGTGCACACCCTGATCACAGTGAGCA  
AGATCCTGCACCACAAGATGCTGCACTCTGTGCTGCAGGCCCCCATGAGCACCC  
TGAACACCCTGAAGGCTGGAGGCATCCTGAACAGATTCAGCAAGGACATTGCC  
ATCCTGGATGACCTGCTGCCCTGACCATCTTTGACTTCATCCAGCTGCTGCTGA  
TTGTGATTGGAGCCATTGCCGTGGTGGCCGTGCTGCAGCCCTACATCTTTGTGGC  
CACAGTGCCTGTGATTGTGGCCTTCATCATGCTGAGGGCCTACTTCCTGCAGAC  
CAGCCAGCAGCTGAAGCAGCTGGAGTCTGAGGGCAGAAGCCCCATCTTCACCC  
ACCTGGTGACCAGCCTGAAGGGCCTGTGGACCCTGAGGGCCTTTGGCAGACAG  
CCCTACTTTGAGACCCTGTTCCACAAGGCCCTGAACCTGCACACAGCCAAGTGG  
TTCCTGTACCTGAGCACCTGAGATGGTTCAGATGAGGATTGAGATGATCTTT  
GTGATCTTCTTCATTGCCGTGACCTTCATCAGCATCCTGACCACAGGGGAGGGC  
GAGGGCAGAGTGGGCATCATCCTGACCCTGGCCATGAACATCATGAGCACCT  
GCAGTGGGCCGTGAACAGCAGCATTGATGTGGACAGCCTGATGAGATCTGTGA  
GCAGAGTGTTCAAGTTCATTGACATGCCACAGAGGGCAAGCCCACCAAGAGC  
ACCAAGCCCTACAAGAATGGCCAGCTGAGCAAGGTGATGATCATTGAGAACAG  
CCATGTGAAGAAGGATGACATCTGGCCCTCTGGAGGCCAGATGACAGTGAAGG  
ACCTGACAGCCAAGTACACAGAGGGGGGCAATGCCATCCTGGAGAACATCAGC  
TTCAGCATCAGCCCTGGCCAGAGGGTGGGCCTGCTGGGCAGAACAGGCTCTGG  
CAAGAGCACCCCTGCTGTCTGCCTTCCTGAGGCTGCTGAACACAGAGGGAGAGAT  
CCAGATTGATGGGGTGAGCTGGGACAGCATCACCCTGCAGCAGTGGAGGAAGG  
CCTTTGGGGTGATCCCCAGAAGGTGTTTCATCTTCTCTGGCACCTTCAGGAAGA  
ACCTGGACCCTATGAGCAGTGGTCTGACCAGGAGATCTGGAAGGTGGCCGAT  
GAGGTGGGCCTGAGATCTGTGATTGAGCAGTTCCTGGCAAGCTGGACTTTGTG

CTGGTGGATGGAGGCTGTGTGCTGAGCCATGGCCACAAGCAGCTGATGTGCCTG  
GCCAGATCTGTGCTGAGCAAGGCCAAGATCCTGCTGCTGGATGAGCCCTCTGCC  
CACCTGGACCCTGTGACCTACCAGATCATCAGAAGAACCCTGAAGCAGGCCTTT  
GCCGACTGCACAGTGATCCTGTGTGAGCACAGAATTGAGGCCATGCTGGAGTGC  
CAGCAGTTCCTGGTGATTGAGGAGAACAAGGTGAGGCAGTATGACAGCATCCA  
GAAGCTGCTGAATGAGAGAAGCCTGTTCAGACAGGCCATCAGCCCCTCTGACA  
GAGTGAAGCTGTTCCCCACAGGAACAGCAGCAAGTGCAAGAGCAAGCCCCAG  
ATTGCCGCCCTGAAGGAGGAGACAGAGGAGGAGGTGCAGGACACCAGACTGTG

**A (SEQ ID NO: 31)**

ATGCAGAGGAGCCCCCTGGAGAAGGCCAGCGTGGTGAGCAAGCTGTTCTTCAG  
CTGGACCAGGCCCATCCTGAGGAAGGGCTACAGGCAGAGGCTGGAGCTGAGCG  
ACATCTACCAGATCCCCAGCGTGGACAGCGCCGACAACCTGAGCGAGAAGCTG  
GAGAGGGAGTGGGACAGGGAGCTGGCCAGCAAGAAGAACCCCAAGCTGATCA  
ACGCCCTGAGGAGGTGCTTCTTCTGGAGGTTTCATGTTCTACGGCATCTTCCTGTA  
CCTGGGCGAGGTGACCAAGGCCGTGCAGCCCCTGCTGCTGGGCAGGATCATCG  
CCAGCTACGACCCCGACAACAAGGAGGAGAGGAGCATCGCCATCTACCTGGGC  
ATCGGCCTGTGCCTGCTGTTTCATCGTGAGGACCCTGCTGCTGCACCCCGCCATCT  
TCGGCCTGCACCACATCGGCATGCAGATGAGGATCGCCATGTTTCAGCCTGATCT  
ACAAGAAGACCCTGAAGCTGAGCAGCAGGGTGCTGGACAAGATCAGCATCGGC  
CAGCTGGTGAGCCTGCTGAGCAACAACCTGAACAAGTTCGACGAGGGCCTGGC  
CCTGGCCCACTTCGTGTGGATCGCCCCCTGCAGGTGGCCCTGCTGATGGGCCT  
GATCTGGGAGCTGCTGCAGGCCAGCGCCTTCTGCGGCCTGGGCTTCCTGATCGT  
GCTGGCCCTGTTCCAGGCCGGCCTGGGCAGGATGATGATGAAGTACAGGGACC  
AGAGGGCCGGCAAGATCAGCGAGAGGCTGGTGATCACCAGCGAGATGATCGAG  
AACATCCAGAGCGTGAAGGCCTACTGCTGGGAGGAGGCCATGGAGAAGATGAT  
CGAGAACCTGAGGCAGACCGAGCTGAAGCTGACCAGGAAGGCCCGCCTACGTGA  
GGTACTTCAACAGCAGCGCCTTCTTCTTCAGCGGCTTCTTCGTGGTGTTCCCTGAG  
CGTGCTGCCCTACGCCCTGATCAAGGGCATCATCCTGAGGAAGATCTTCACCAC  
CATCAGCTTCTGCATCGTGCTGAGGATGGCCGTGACCAGGCAGTTCCCCTGGGC  
CGTGCAGACCTGGTACGACAGCCTGGGCGCCATCAACAAGATCCAGGACTTCCT  
GCAGAAGCAGGAGTACAAGACCCTGGAGTACAACCTGACCACCACCGAGGTGG  
TGATGGAGAACGTGACCGCCTTCTGGGAGGAGGGCTTCGGCGAGCTGTTTCGAG

AAGGCCAAGCAGAACAACAACAGGAAGACCAGCAACGGCGACGACAGCC  
TGTTCTTCAGCAACTTCAGCCTGCTGGGCACCCCCGTGCTGAAGGACATCAACT  
TCAAGATCGAGAGGGGCCAGCTGCTGGCCGTGGCCGGCAGCACCGGCGCCGGC  
AAGACCAGCCTGCTGATGGTGATCATGGGCGAGCTGGAGCCCAGCGAGGGCAA  
GATCAAGCACAGCGGCAGGATCAGCTTCTGCAGCCAGTTCAGCTGGATCATGCC  
CGGCACCATCAAGGAGAACATCATCTTCGGCGTGAGCTACGACGAGTACAGGT  
ACAGGAGCGTGATCAAGGCCTGCCAGCTGGAGGAGGACATCAGCAAGTTCGCC  
GAGAAGGACAACATCGTGCTGGGCGAGGGCGGCATCACCTGAGCGGCGGCCA  
GAGGGCCAGGATCAGCCTGGCCAGGGCCGTGTACAAGGACGCCGACCTGTACC  
TGCTGGACAGCCCCTTCGGCTACCTGGACGTGCTGACCGAGAAGGAGATCTTCG  
AGAGCTGCGTGTGCAAGCTGATGGCCAACAAGACCAGGATCCTGGTGACCAGC  
AAGATGGAGCACCTGAAGAAGGCCGACAAGATCCTGATCCTGCACGAGGGCAG  
CAGCTACTTCTACGGCACCTTCAGCGAGCTGCAGAACCTGCAGCCCGACTTCAG  
CAGCAAGCTGATGGGCTGCGACAGCTTCGACCAGTTCAGCGCCGAGAGGAGGA  
ACAGCATCCTGACCGAGACCCTGCACAGGTTTCAGCCTGGAGGGGCGACGCCCC  
GTGAGCTGGACCGAGACCAAGAAGCAGAGCTTCAAGCAGACCGGCGAGTTCGG  
CGAGAAGAGGAAGAACAGCATCCTGAACCCCATCAACAGCATCAGGAAGTTCA  
GCATCGTGCAGAAGACCCCCCTGCAGATGAACGGCATCGAGGAGGACAGCGAC  
GAGCCCCTGGAGAGGAGGCTGAGCCTGGTGCCCGACAGCGAGCAGGGCGAGGC  
CATCCTGCCCAGGATCAGCGTGATCAGCACCGGCCCCACCCTGCAGGCCAGGA  
GGAGGCAGAGCGTGCTGAACCTGATGACCCACAGCGTGAACCAGGGCCAGAAC  
ATCCACAGGAAGACCACCGCCAGCACCCAGGAAGGTGAGCCTGGCCCCCAGGC  
CAACCTGACCGAGCTGGACATCTACAGCAGGAGGCTGAGCCAGGAGACCGGCC  
TGGAGATCAGCGAGGAGATCAACGAGGAGGACCTGAAGGAGTGCTTCTTCGAC  
GACATGGAGAGCATCCCCGCCGTGACCACCTGGAACACCTACCTGAGGTACATC  
ACCGTGACAAGAGCCTGATCTTCGTGCTGATCTGGTGCTGGTGATCTTCCTG  
GCCGAGGTGGCCGCCAGCCTGGTGGTGCTGTGGCTGCTGGGCAACACCCCCCTG  
CAGGACAAGGGCAACAGCACCCACAGCAGGAACAACAGCTACGCCGTGATCAT  
CACCAGCACAGCAGCTACTACGTGTTCTACATCTACGTGGGCGTGGCCGACAC  
CCTGCTGGCCATGGGCTTCTTCAGGGGCCTGCCCTGGTGCACACCCTGATCAC  
CGTGAGCAAGATCCTGCACCACAAGATGCTGCACAGCGTGCTGCAGGCCCCCAT  
GAGCACCTGAACACCCTGAAGGCCGGCGGCATCCTGAACAGGTTTCAGCAAGG

ACATCGCCATCCTGGACGACCTGCTGCCCTGACCATCTTCGACTTCATCCAGCT  
GCTGCTGATCGTGATCGGCGCCATCGCCGTGGTGGCCGTGCTGCAGCCCTACAT  
CTTCGTGGCCACCGTGCCCGTGATCGTGGCCTTCATCATGCTGAGGGCCTACTTC  
CTGCAGACCAGCCAGCAGCTGAAGCAGCTGGAGAGCGAGGGCAGGAGCCCCAT  
CTTCACCCACCTGGTGACCAGCCTGAAGGGCCTGTGGACCCTGAGGGCCTTCGG  
CAGGCAGCCCTACTTCGAGACCCTGTTCCACAAGGCCCTGAACCTGCACACCGC  
CAACTGGTTCCTGTACCTGAGCACCTGAGGTGGTTCAGATGAGGATCGAGAT  
GATCTTCGTGATCTTCTTCATCGCCGTGACCTTCATCAGCATCCTGACCACCGGC  
GAGGGCGAGGGCAGGGTGGGCATCATCCTGACCCTGGCCATGAACATCATGAG  
CACCTGCAGTGGGCCGTGAACAGCAGCATCGACGTGGACAGCCTGATGAGGA  
GCGTGAGCAGGGTGTTC AAGTTCATCGACATGCCACCGAGGGCAAGCCCACC  
AAGAGCACCAAGCCCTACAAGAACGGCCAGCTGAGCAAGGTGATGATCATCGA  
GAACAGCCACGTGAAGAAGGACGACATCTGGCCCAGCGGCGGCCAGATGACCG  
TGAAGGACCTGACCGCCAAGTACACCGAGGGCGGCAACGCCATCCTGGAGAAC  
ATCAGCTTCAGCATCAGCCCCGGCCAGAGGGTGGGCCTGCTGGGCAGGACCGG  
CAGCGGCAAGAGCACCTGCTGAGCGCCTTCCTGAGGCTGCTGAACACCGAGG  
GCGAGATCCAGATCGACGGCGTGAGCTGGGACAGCATCACCTGCAGCAGTGG  
AGGAAGGCCTTCGGCGTGATCCCCCAGAAGGTGTTCATCTTCAGCGGCACCTTC  
AGGAAGAACCTGGACCCCTACGAGCAGTGGAGCGACCAGGAGATCTGGAAGGT  
GGCCGACGAGGTGGGCCTGAGGAGCGTGATCGAGCAGTTCGCCGCAAGCTGG  
ACTTCGTGCTGGTGGACGGCGGCTGCGTGCTGAGCCACGGCCACAAGCAGCTG  
ATGTGCCTGGCCAGGAGCGTGCTGAGCAAGGCCAAGATCCTGCTGCTGGACGA  
GCCAGCGCCACCTGGACCCCGTGACCTACCAGATCATCAGGAGGACCCTGA  
AGCAGGCCTTCGCCGACTGCACCGTGATCCTGTGCGAGCACAGGATCGAGGCC  
ATGCTGGAGTGCCAGCAGTTCCTGGTGTGATCGAGGAGAAACAAGGTGAGGCAGTA  
CGACAGCATCCAGAAGCTGCTGAACGAGAGGAGCCTGTTCAGGCAGGCCATCA  
GCCCCAGCGACAGGGTGAAGCTGTTCCCCACAGGAACAGCAGCAAGTGCAAG  
AGCAAGCCCCAGATCGCCGCCCTGAAGGAGGAGACCGAGGAGGAGGTGCAGG  
ACACCAGGCTGTGA (SEQ ID NO: 32)

ATGCAGAGATCCCCTCTGGAGAAGGCCTCAGTGGTGTCCAAGCTTTTCTTCTCCT  
GGACCAGGCCCATTTTAAGAAAGGGCTACAGGCAGAGACTTGAGCTGTCTGAC  
ATCTATCAGATCCCTTCTGTGGATTCTGCTGACAATCTTAGTGAAAAATTGGAA

AGGGAGTGGGACAGAGAGCTGGCAAGTAAAAAGAACCCCAAGCTGATTAATGC  
CCTGAGGCGCTGCTTTTTTTGGAGATTCATGTTCTATGGCATATTCCTCTACCTT  
GGAGAAGTAACCAAAGCTGTACAGCCTCTCCTCCTTGGCAGAATCATTGCCTCC  
TATGATCCTGATAACAAGGAGGAGAGAAGCATAGCCATCTACCTGGGCATTGG  
GCTGTGCCTCTTGTTTATTGTGAGGACCCTTCTCTTGCACCCTGCCATCTTTGGC  
CTTCATCACATTGGCATGCAAATGAGAATAGCAATGTTTAGTCTTATTTACAAA  
AAAACATTA AAAACTCTCTTCCAGGGTGTGGACAAGATCAGTATTGGACA ACTG  
GTCAGCCTGCTGAGCAACAACCTGAACAAGTTTGATGAAGGACTGGCCCTGGCC  
CACTTTGTCTGGATTGCCCCCTTCAGGTGGCTCTTTTGATGGGCCTGATCTGGG  
AACTCCTGCAGGCCTCTGCCTTCTGTGGGTAGGCTTCCTGATAGTGCTAGCTCT  
CTTTCAGGCAGGGTTGGGTAGAATGATGATGAAGTACAGAGACCAGAGGGCTG  
GGAAGATATCTGAGAGGCTGGTCATTACTTCTGAAATGATAGAAAACATCCAGT  
CTGTTAAAGCTTACTGCTGGGAGGAGGCTATGGAAAAGATGATTGAGAACTTG  
AGGCAAACAGAGCTCAAGCTGACTAGGAAGGCAGCCTATGTCAGGTATTTCAA  
CAGCAGTGCTTTCTTCTCAGGCTTTTTTCGTGGTCTTCTTGAGTGTTCTGCCCT  
ATGCCCTCATCAAGGGGATAATTTTGAGAAAGATTTTCACCACTATTTCTTTTG  
CATTGTCCTGAGGATGGCTGTCACCAGGCAATTCCTGGGCTGTGCAGACATG  
GTATGACTCTCTGGGGGCCATCAACAAAATCCAAGATTTCTGCAGAAGCAGGA  
GTACAAGACCCTGGAATACAACCTCACCACCACAGAAGTTGTGATGGAGAATG  
TGACTGCATTCTGGGAGGAAGGATTTGGGGAGCTGTTTGAGAAAGCAAAACAA  
AACATAATAACAGGAAAACCAGCAATGGAGATGACTCCCTGTTCTTTTCCAAC  
TTCTCTTTGTTGGGCACCCCTGTCCTGAAAGATATAAACTTTAAAATTGAAAGA  
GGGCAGCTGTTGGCAGTTGCTGGCTCCACAGGAGCTGGAAAACTTCACTACTG  
ATGGTGATCATGGGGGAGTTAGAACCCTCTGAAGGGAAAATAAAACATTCTGG  
GAGGATTAGTTTCTGCAGCCAGTTCAGCTGGATCATGCCTGGGACCATTAAAGA  
AAATATTATATTTGGAGTGAGCTATGATGAATATAGATATAGGAGTGTCATCAA  
AGCCTGTCAGTTGGAGGAAGACATCAGCAAATTTGCAGAGAAAGACAACATTG  
TTCTGGGTGAAGGTGGCATCACCTGTCAGGAGGGCAAAGGGCCAGGATCAGC  
TTGGCCAGAGCAGTCTATAAAGATGCTGATCTGTACCTCCTGGATAGCCCTTTT  
GGCTATCTGGATGTTTTTGACAGAGAAGGAAATTTTTGAGTCCTGTGTCTGCAAG  
TTAATGGCAAATAAAACAAGGATACTTGTGACCTCAAAAATGGAACACCTGAA  
GAAGGCTGACAAAATTCTGATCCTGCATGAGGGCAGCAGCTACTTTTATGGAAC

ATTTTCTGAACTGCAGAATTTGCAACCAGACTTTTCATCAAAGCTCATGGGATG  
TGACAGTTTTGATCAGTTTTCTGCAGAAAGGAGAACTCCATTTTACTGAGAC  
CCTGCACAGGTTCAAGTCTGGAGGGGGATGCCCCAGTGAGTTGGACTGAGACAA  
AGAAACAGAGCTTCAAGCAGACTGGAGAGTTTGGAGAAAAGAGGAAAAACTC  
AATTCTCAATCCCATCAATAGCATCAGGAAGTTCAGCATAGTTCAGAAGACTCC  
TTTGCAGATGAATGGGATTGAAGAGGACTCAGATGAGCCCCTGGAAAGGAGAC  
TCTCCTTGGTGCCAGATTCAGAGCAGGGGGAAGCCATACTGCCAAGGATCTCTG  
TGATTTCTACAGGGCCCACCCTCCAAGCAAGAAGGAGACAGTCAGTTTTAAACC  
TGATGACCCACTCTGTCAACCAGGGACAGAACATTCATAGAAAGACAACAGCA  
TCTACAAGAAAAGTTTCACTGGCCCCTCAAGCCAATTTAACTGAACTAGATATC  
TACAGCAGGAGGCTCAGCCAAGAAACAGGCCTGGAGATCTCAGAAGAAATAAA  
TGAGGAGGATTTGAAGGAATGCTTCTTTGATGATATGGAGAGCATCCCAGCTGT  
CACAACCTGGAACACCTACCTGAGATACATCACAGTGCACAAATCCCTCATCTT  
TGTAATTATATGGTGCCTTGTTCATCTTCTTAGCTGAGGTGGCTGCTTCCCTGGTG  
GTGCTGTGGCTGCTGGGAAACACACCCCTCCAGGATAAAGGGAAGTCTACTCAC  
AGCAGGAACAACAGTTATGCTGTGATCATCACCAGTACCTCCTCCTACTATGTG  
TTCTACATTTATGTTGGAGTTGCAGACACATTGCTTGCCATGGGTTTTTTTAGAG  
GACTCCCCCTGGTGCATACTCTCATCACTGTTTCCAAAATCCTTCACCACAAGAT  
GCTGCACAGTGTACTACAGGCTCCCATGAGCACCCCTCAACACTCTTAAAGCAGG  
AGGAATCTTGAACAGATTTAGCAAGGACATTGCAATTCTTGATGACCTGCTTCC  
ACTGACCATCTTTGACTTCATCCAGCTTCTGCTCATTGTAATTGGTGCCATTGCT  
GTGGTAGCAGTGCTCCAGCCATATATTTTTGTGGCCACTGTGCCTGTTATTGTGG  
CCTTCATTATGTTGAGAGCCTACTTCTGCGACCTCTCAGCAGCTCAAGCAACT  
TGAAAGTGAGGGCAGGAGCCCCATATTTACACACTTGGTCACTTCCCTCAAAGG  
CCTCTGGACACTCAGAGCTTTTGGAAAGACAACCTTATTTTGAAACTCTCTTCCAC  
AAGGCTCTGAATCTCCACACAGCCAACCTGGTTTCTGTATCTTTCAACACTGCGCT  
GGTTCCAGATGAGGATTGAGATGATCTTTGTTATCTTCTTCATAGCTGTTACCTT  
CATCTCTATTCTGACAACCTGGTGAGGGGGAAGGGAGAGTAGGCATCATCCTCAC  
ACTAGCCATGAACATAATGTCTACCTTACAATGGGCCGTGAACAGCTCCATAGA  
TGTGGACAGCCTCATGAGAAGTGTGTCAAGAGTTTTCAAATTCATTGACATGCC  
CACAGAAGGCAAACCAACCAAGAGCACAAAACCCTACAAGAATGGCCAGCTGA  
GTAAGGTCATGATCATTGAAAATTCTCATGTGAAGAAGGATGATATTTGGCCCA

GTGGGGGCCAGATGACAGTCAAGGACCTCACTGCCAAATACACAGAGGGTGGAA  
AATGCTATCCTAGAGAACATCTCCTTCTCCATCTCCCCAGGCCAAAGAGTTGGC  
TTGCTGGGCAGGACTGGCAGTGGCAAGTCCACCTTGCTCTCAGCATTCTCAGG  
CTTTTAAATACAGAGGGAGAGATTCAAATTGATGGGGTGTCTTGGGATAGTATA  
ACACTTCAACAGTGGAGGAAAGCCTTTGGTGTGATTCTCAGAAAGTGTTTATC  
TTCTCTGGCACTTTCAGAAAAAATCTGGACCCCTATGAACAGTGGAGTGACCAG  
GAAATCTGGAAGGTGGCAGATGAAGTGGGCCTAAGATCAGTCATAGAGCAGTT  
TCCTGGAAAGTTGGATTTTGTGCTTGTAGATGGAGGCTGTGTGCTGTCCCATGG  
CCATAAACAGCTAATGTGCCTGGCTAGGTCAGTGCTGAGCAAGGCCAAGATCCT  
GCTGTTAGATGAGCCTTCAGCCCATCTGGACCCTGTGACATACCAGATTATCAG  
AAGAACTCTGAAGCAGGCCTTTGCTGACTGCACTGTCATCCTGTGTGAGCACAG  
AATTGAGGCCATGCTGGAGTGCCAGCAGTTCCTTGTATAGAAGAGAATAAGGT  
TAGGCAGTATGACAGCATTTCAGAACTGCTAAATGAAAGATCTCTCTTCAGGCA  
AGCTATTTACCATCTGATAGAGTGAACTTTTTCCCCACAGAAATTCCTCTAAA  
TGTAATCTAAGCCCCAGATAGCTGCCTTGAAAGAGGAGACTGAAGAAGAAGT  
CCAGGACACCAGACTGTGA (SEQ ID NO: 33)

ATGCAGAGATCCCCGCTGGAGAAGGCATCTGTGGTGTCAAACCTGTTCTTTAGC  
TGGACAAGGCCCATCCTTAGGAAAGGGTACAGACAGAGGTTGGAGCTGTCAGA  
CATATATCAGATCCCTTCAGTGGACTCTGCAGACAACCTCTCTGAAAAGCTGGA  
GAGGGAATGGGACAGGGAACCTGGCCAGCAAAAAAAAAACCCTAAACTGATTAATG  
CCCTGAGGAGGTGCTTCTTTTGGAGATTCATGTTCTATGGGATCTTCCTTTACCT  
GGGGGAGGTGACTAAAGCTGTTTCAGCCTCTTCTTCTGGGGAGGATTATTGCCTC  
CTATGACCCAGACAACAAAGAAGAAAGAAGCATAGCCATTTACTTAGGCATAG  
GCCTCTGCTTGCTCTTCATAGTTAGAACCCTCCTACTCCACCCAGCCATCTTTGG  
TCTCCACCACATAGGTATGCAGATGAGAATAGCAATGTTCTCCTTGATCTACAA  
GAAGACCCTCAAGCTGTCCAGCAGGGTGTGGACAAGATCTCCATAGGCCAGTT  
AGTCAGTCTACTGTCCAATAACTTAAATAAGTTTGTGATGAGGGACTGGCACTGGC  
ACATTTTGTGTGGATTGCCCCCTCCAAGTGGCCCTTCTTATGGGCCTTATCTGG  
GAGCTGTTGCAGGCCTCTGCTTTCTGTGGCCTGGGTTTCCTCATAGTCCTAGCCT  
TATTCCAGGCTGGACTGGGCAGAATGATGATGAAGTATAGGGACCAAAGAGCA  
GGGAAGATTTCTGAAAGGCTGGTTATAACTTCTGAGATGATTGAGAACATTCAG  
TCAGTGAAAGCTTACTGCTGGGAAGAAGCTATGGAAAAAATGATTGAAAATCT

CAGACAGACTGAATTAAGTTGACCAGGAAAGCTGCTTATGTCAGATACTTCAA  
CTCCTCAGCCTTCTTTTTTCTGGCTTCTTTGTTGTATTCCTTTCAGTCCTCCCCTA  
TGCCCTGATTAAGGGCATTATCTTGAGGAAAATTTTCACAACCATCTCCTTTTGT  
ATTGTCCTCAGGATGGCTGTTACAAGGCAATTCCTTGGGCTGTGCAAACCTTGG  
TATGATAGCCTTGGAGCAATCAACAAGATCCAGGATTCCTGCAAAAAGCAGGA  
GTACAAGACATTGGAATACAACCTTACCACCACTGAGGTGGTGTGATGGAAAATG  
TGACTGCCTTCTGGGAGGAGGGGTTTGGAGAGCTGTTTGAGAAAGCCAAACAG  
AACAAACAATAGAAAGACCTCTAATGGTGTGATTCCTGTTCTTTTCTAAC  
TTTAGTCTTCTGGGGACCCAGTTCTGAAAGATATTAACTTTAAAATTGAAAGG  
GGACAGTTGCTGGCTGTGGCTGGGTCCACTGGGGCTGGGAAGACAAGCCTGCTC  
ATGGTGTATCATGGGAGAGCTGGAACCCAGTGAAGGAAAGATCAAACACTCAGG  
CAGGATCTCCTTCTGCAGCCAGTTCTCATGGATTATGCCAGGCACTATTAAGA  
AAATATCATCTTTGGTGTAAAGCTATGATGAGTACAGGTATAGATCTGTAATTAA  
AGCCTGCCAGCTGGAGGAAGACATCTCTAAGTTTGCTGAGAAGGATAACATTGT  
GTTGGGGGAAGGGGGCATCACCTTTCTGGTGGGCAGAGGGCTAGGATCTCCCT  
TGCTAGGGCAGTATAACAAGGATGCTGACTTGTACCTCTTGGATAGTCCTTTTGG  
CTACCTAGATGTGCTGACAGAGAAAGAAATATTTGAAAGCTGTGTGTGTAAGCT  
CATGGCTAACAAGACCAGGATCCTGGTCACCAGTAAAATGGAACACCTCAAAA  
AAGCAGACAAGATCCTTATTCTCCATGAGGGCTCCTCCTACTTCTATGGGACCTT  
CAGTGAGCTGCAGAATCTGCAGCCAGACTTCTCCTCAAACTTATGGGCTGTGA  
CTCCTTTGACCAATTCTCTGCAGAAAGAAGGAATAGCATACTGACAGAAACACT  
GCATAGATTCTCCCTGGAAGGAGATGCCCCAGTGAGTTGGACAGAAACCAAAA  
AGCAGAGCTTCAAGCAGACTGGTGTGAGTTTGGTGAAGAGGGAAGAATTCTATC  
CTGAACCCCATCAATAGCATCAGGAAATTTAGCATAGTCCAAAAGACCCCCCTC  
CAGATGAATGGAATAGAGGAGGATAGTGATGAGCCTCTTGAGAGAAGGCTGTC  
CCTGGTTCCAGACAGTGAACAGGGTGAAGCCATTCTTCCGAGGATCAGTGTCAT  
CTCCACTGGGCCACATTGCAGGCCAGAAGAAGACAGTCTGTTCTGAATTTGAT  
GACACATTCTGTGAATCAAGGCCAGAATATCCATAGAAAAACCACTGCCAGCA  
CCAGAAAAGTTTCTCTAGCCCCCAGGCTAACCTGACTGAGTTAGACATCTACA  
GCAGAAGGCTGAGCCAAGAGACTGGCTTGGAAATATCTGAGGAGATCAATGAG  
GAGGACCTCAAGGAGTGCTTCTTTGATGACATGGAGTCAATCCCTGCAGTCACT  
ACATGGAACACTTACCTAAGGTACATCACAGTTCATAAGAGCCTCATCTTTGTC

CTCATATGGTGTCTGGTCATCTTTTTAGCAGAAGTGGCTGCCAGCCTAGTTGTGC  
TGTGGTTACTGGGCAATACACCTCTTCAGGACAAAGGCAATAGCACACACAGC  
AGAAACAACCTCCTATGCAGTGATCATCACCTCTACAAGCTCTTACTATGTATTCT  
ATATATATGTGGGAGTGGCAGATACTCTCCTGGCCATGGGATTCTTCAGGGGAT  
TACCTCTAGTTCACACATTGATCACAGTGTCAAAAATTCTCCACCACAAGATGT  
TACACAGTGTCCCTGCAAGCCCCAATGTCTACTCTGAACACACTTAAGGCAGGTG  
GAATTTTGAATAGGTTTAGCAAGGACATAGCTATCCTGGATGATCTCCTCCCTCT  
GACCATCTTTGACTTCATCCAGTTACTGCTCATTGTAATTGGAGCCATTGCAGTG  
GTAGCAGTCCTACAGCCTTACATTTTTGTGGCTACTGTTCCCTGTTATTGTGGCCT  
TCATTATGCTAAGAGCTTACTTCCTGCAAACAAGCCAACAGTTGAAACAGCTAG  
AAAGTGAGGGAAGGTCCCCATCTTCACCCACCTGGTGACATCACTCAAGGGGC  
TATGGACTCTTAGGGCTTTTGGGAGACAGCCGTACTTTGAGACCTTATTCCATA  
AGGCCCTTAACCTCCATACAGCAAACCTGGTTCTTATACCTGAGTACTCTGAGGT  
GGTTTCAAATGAGGATTGAAATGATTTTTGTGATCTTCTTCATTGCTGTGACCTT  
CATCTCAATCTTGACCACAGGAGAGGGGGAGGGCAGGGTGGGCATCATACTGA  
CCTTGGCCATGAACATTATGTCAACCCTGCAGTGGGCTGTCAATAGCTCCATTG  
ATGTGGACAGTCTGATGAGGAGTGTCTCCAGGGTCTTCAAGTTTATTGACATGC  
CAACTGAGGGCAAACCCACCAAAAAGCACTAAGCCATATAAAAATGGCCAACTG  
TCCAAAGTGATGATCATTGAAAATTCACATGTAAAGAAGGATGATATCTGGCCC  
TCTGGAGGACAGATGACAGTGAAAGACCTGACTGCCAAGTACACAGAGGGTGG  
TAATGCCATTCTTGAGAACATTAGTTTCAGTATTTCCCCGGGGCAAAGGGTGGG  
CCTCCTTGGCAGAACAGGCTCTGGCAAGAGTACCCTGCTGTCAGCCTTTTTAAG  
ACTGTTGAACACTGAGGGAGAAATTCAGATTGATGGTGTCTCCTGGGATAGCAT  
CACCTCCAGCAGTGGAGAAAAGCTTTTGGAGTGATCCCGCAAAGGTTTTTCAT  
CTTTTCAGGCACCTTCCGGAAGAACCTGGACCCCTATGAGCAGTGGTCTGACCA  
GGAAATATGGAAGGTAGCTGATGAAGTTGGGCTTAGGTCAGTCATAGAGCAGT  
TCCCAGGCAAACCTGGACTTTGTCCTGGTGGATGGTGGATGTGTACTGAGTCATG  
GGCACAACAGCTGATGTGCCTAGCCAGGTCTGTGCTCAGCAAGGCAAAGATA  
TTGCTGCTTGATGAACCCAGTGCCCATCTGGACCCAGTCACATATCAGATCATC  
AGAAGAACATTGAAGCAGGCCTTTGCTGATTGCACAGTTATCCTCTGTGAGCAC  
AGGATTGAGGCCATGCTGGAGTGCCAGCAGTTTCTGGTGATTGAGGAGAATAA  
AGTAAGGCAGTATGACTCCATCCAGAAGCTGCTCAATGAAAGAAGCCTCTTTAG

ACAAGCTATCTCCCCCTCAGACAGGGTCAAATTGTTCCCTCACAGAAACAGCAG  
CAAGTGCAAGAGCAAGCCCCAAATTGCAGCCTTGAAAGAGGAGACAGAGGAA  
GAGGTGCAGGACACCAGACTCTGA (SEQ ID NO: 34)

ATGCAGAGAAGCCCCCTGGAGAAGGCCAGCGTGGTGAGCAAGCTGTTCTTCAG  
CTGGACCAGACCCATCCTGAGAAAGGGCTACAGACAGAGACTGGAGCTGAGCG  
ACATCTACCAGATCCCCAGCGTGGACAGCGCCGACAACCTGAGCGAGAAGCTG  
GAGAGAGAGTGGGACAGAGAGCTGGCCAGCAAGAAGAACCCCAAGCTGATCA  
ACGCCCTGAGAAGATGCTTCTTCTGGAGATTCATGTTCTACGGCATCTTCCTGTA  
CCTGGGCGAGGTGACCAAGGCCGTGCAGCCCCTGCTGCTGGGCAGAATCATCG  
CCAGCTACGACCCCGACAACAAGGAGGAGAGAAGCATCGCCATCTACCTGGGC  
ATCGGCCTGTGCCTGCTGTTTCATCGTGAGAACCCTGCTGCTGCACCCCGCCATCT  
TCGGCCTGCACCACATCGGCATGCAGATGAGAATCGCCATGTTTCAGCCTGATCT  
ACAAGAAGACCCTGAAGCTGAGCAGCAGAGTGCTGGACAAGATCAGCATCGGC  
CAGCTGGTGAGCCTGCTGAGCAACAACCTGAACAAGTTCGACGAGGGCCTGGC  
CCTGGCCCACTTCGTGTGGATCGCCCCCTGCAGGTGGCCCTGCTGATGGGCCT  
GATCTGGGAGCTGCTGCAGGCCAGCGCCTTCTGCGGCCTGGGCTTCCTGATCGT  
GCTGGCCCTGTTCCAGGCCGGCCTGGGCAGAATGATGATGAAGTACAGAGACC  
AGAGAGCCGGCAAGATCAGCGAGAGACTGGTGATCACCAGCGAGATGATCGAG  
AACATCCAGAGCGTGAAGGCCTACTGCTGGGAGGAGGCCATGGAGAAGATGAT  
CGAGAACCTGAGACAGACCGAGCTGAAGCTGACCAGAAAGGCCGCCTACGTGA  
GATACTTCAACAGCAGCGCCTTCTTCTTCAGCGGCTTCTTCGTGGTGTTCCTGAG  
CGTGCTGCCCTACGCCCTGATCAAGGGCATCATCCTGAGAAAGATCTTCACCAC  
CATCAGCTTCTGCATCGTGCTGAGAATGGCCGTGACCAGACAGTTCCCCTGGGC  
CGTGCAGACCTGGTACGACAGCCTGGGCGCCATCAACAAGATCCAGGACTTCCT  
GCAGAAGCAGGAGTACAAGACCCTGGAGTACAACCTGACCACCACCGAGGTGG  
TGATGGAGAACGTGACCGCCTTCTGGGAGGAGGGCTTCGGCGAGCTGTTTCGAG  
AAGGCCAAGCAGAACAACAACAACAGAAAGACCAGCAACGGCGACGACAGCC  
TGTTCTTCAGCAACTTCAGCCTGCTGGGCACCCCCGTGCTGAAGGACATCAACT  
TCAAGATCGAGAGAGGCCAGCTGCTGGCCGTGGCCGGCAGCACCCGGCGCCGGC  
AAGACCAGCCTGCTGATGGTGATCATGGGCGAGCTGGAGCCCAGCGAGGGCAA  
GATCAAGCACAGCGGCAGAATCAGCTTCTGCAGCCAGTTCAGCTGGATCATGCC  
CGGCACCATCAAGGAGAACATCATCTTCGGCGTGAGCTACGACGAGTACAGAT

ACAGAAGCGTGATCAAGGCCTGCCAGCTGGAGGAGGACATCAGCAAGTTCGCC  
GAGAAGGACAACATCGTGCTGGGCGAGGGCGGCATCACCTGAGCGGGCGGCCA  
GAGAGCCAGAATCAGCCTGGCCAGAGCCGTGTACAAGGACGCCGACCTGTACC  
TGCTGGACAGCCCCTTCGGCTACCTGGACGTGCTGACCGAGAAGGAGATCTTCG  
AGAGCTGCGTGTGCAAGCTGATGGCCAACAAGACCAGAATCCTGGTGACCAGC  
AAGATGGAGCACCTGAAGAAGGCCGACAAGATCCTGATCCTGCACGAGGGCAG  
CAGCTACTTCTACGGCACCTTCAGCGAGCTGCAGAACCTGCAGCCCGACTTCAG  
CAGCAAGCTGATGGGCTGCGACAGCTTCGACCAGTTCAGCGCCGAGAGAAGAA  
ACAGCATCCTGACCGAGACCCTGCACAGATTCAGCCTGGAGGGGCGACGCCCC  
GTGAGCTGGACCGAGACCAAGAAGCAGAGCTTCAAGCAGACCGGGCGAGTTCGG  
CGAGAAGAGAAAGAACAGCATCCTGAACCCCATCAACAGCATCAGAAAGTTCA  
GCATCGTGCAGAAGACCCCCCTGCAGATGAACGGCATCGAGGAGGACAGCGAC  
GAGCCCCTGGAGAGAAGACTGAGCCTGGTGCCCGACAGCGAGCAGGGGCGAGGC  
CATCCTGCCCAGAATCAGCGTGATCAGCACCGGCCCCACCCTGCAGGCCAGAA  
GAAGACAGAGCGTGCTGAACCTGATGACCCACAGCGTGAACCAGGGCCAGAAC  
ATCCACAGAAAGACCACCGCCAGCACCCAGAAAGGTGAGCCTGGCCCCCAGGC  
CAACCTGACCGAGCTGGACATCTACAGCAGAAGACTGAGCCAGGAGACCGGCC  
TGGAGATCAGCGAGGAGATCAACGAGGAGGACCTGAAGGAGTGCTTCTTCGAC  
GACATGGAGAGCATCCCCGCCGTGACCACCTGGAACACCTACCTGAGATACATC  
ACCGTGACAAGAGCCTGATCTTCGTGCTGATCTGGTGCCTGGTGATCTTCCTG  
GCCGAGGTGGCCGCCAGCCTGGTGGTGCTGTGGCTGCTGGGCAACACCCCCCTG  
CAGGACAAGGGCAACAGCACCCACAGCAGAAACAACAGCTACGCCGTGATCAT  
CACCAGCACCGAGCAGCTACTACGTGTTCTACATCTACGTGGGCGTGGCCGACAC  
CCTGCTGGCCATGGGCTTCTTCAGAGGCCTGCCCCTGGTGCACACCCTGATCAC  
CGTGAGCAAGATCCTGCACCACAAGATGCTGCACAGCGTGCTGCAGGCCCCCAT  
GAGCACCTGAACACCCTGAAGGCCGGCGGCATCCTGAACAGATTCAGCAAGG  
ACATCGCCATCCTGGACGACCTGCTGCCCTGACCATCTTCGACTTCATCCAGCT  
GCTGCTGATCGTGATCGGCGCCATCGCCGTGGTGGCCGTGCTGCAGCCCTACAT  
CTTCGTGGCCACCGTGCCCGTGATCGTGGCCTTCATCATGCTGAGAGCCTACTTC  
CTGCAGACCAGCCAGCAGCTGAAGCAGCTGGAGAGCGAGGGCAGAAGCCCCAT  
CTTCACCCACCTGGTGACCAGCCTGAAGGGCCTGTGGACCCTGAGAGCCTTCGG  
CAGACAGCCCTACTTCGAGACCCTGTTCCACAAGGCCCTGAACCTGCACACCGC

CAACTGGTTCCTGTACCTGAGCACCTGAGATGGTTCAGATGAGAATCGAGAT  
GATCTTCGTGATCTTCTTCATCGCCGTGACCTTCATCAGCATCCTGACCACCGGC  
GAGGGCGAGGGCAGAGTGGGCATCATCCTGACCCTGGCCATGAACATCATGAG  
CACCTGCAGTGGGCCGTGAACAGCAGCATCGACGTGGACAGCCTGATGAGAA  
GCGTGAGCAGAGTGTTCAAGTTCATCGACATGCCACCGAGGGCAAGCCCACC  
AAGAGCACCAAGCCCTACAAGAACGGCCAGCTGAGCAAGGTGATGATCATCGA  
GAACAGCCACGTGAAGAAGGACGACATCTGGCCCAGCGGCGGCCAGATGACCG  
TGAAGGACCTGACCGCCAAGTACACCGAGGGCGGCAACGCCATCCTGGAGAAC  
ATCAGCTTCAGCATCAGCCCCGGCCAGAGAGTGGGCCTGCTGGGCAGAACCGG  
CAGCGGCAAGAGCACCTGCTGAGCGCCTTCCTGAGACTGCTGAACACCGAGG  
GCGAGATCCAGATCGACGGCGTGAGCTGGGACAGCATCACCTGCAGCAGTGG  
AGAAAGGCCTTCGGCGTGATCCCCAGAAGGTGTTTCATCTTCAGCGGCACCTTC  
AGAAAGAACCTGGACCCCTACGAGCAGTGGAGCGACCAGGAGATCTGGAAGGT  
GGCCGACGAGGTGGGCCTGAGAAGCGTGATCGAGCAGTTCCCCGGCAAGCTGG  
ACTTCGTGCTGGTGGACGGCGGCTGCGTGCTGAGCCACGGCCACAAGCAGCTG  
ATGTGCCTGGCCAGAAGCGTGCTGAGCAAGGCCAAGATCCTGCTGCTGGACGA  
GCCAGCGCCCACCTGGACCCCGTGACCTACCAGATCATCAGAAGAACCCTGA  
AGCAGGCCTTCGCCGACTGCACCGTGATCCTGTGCGAGCACAGAATCGAGGCC  
ATGCTGGAGTGCCAGCAGTTCCTGGTGATCGAGGAGAACAAGGTGAGACAGTA  
CGACAGCATCCAGAAGCTGCTGAACGAGAGAAGCCTGTTTCAGACAGGCCATCA  
GCCCCAGCGACAGAGTGAAGCTGTTCCCCACAGAAACAGCAGCAAGTGCAAG  
AGCAAGCCCCAGATCGCCGCCCTGAAGGAGGAGACCGAGGAGGAGGTGCAGG  
ACACCAGACTGTGA (SEQ ID NO: 35)

ATGCAGCGCAGCCCCCTGGAGAAGGCCAGCGTGGTGAGCAAGCTGTTCTTCAG  
CTGGACCCGCCCCATCCTGCGCAAGGGCTACCGCCAGCGCCTGGAGCTGAGCG  
ACATCTACCAGATCCCAGCGTGGACAGCGCCGACAACCTGAGCGAGAAGCTG  
GAGCGCGAGTGGGACCGCGAGCTGGCCAGCAAGAAGAACCCCAAGCTGATCAA  
CGCCCTGCGCCGCTGCTTCTTCTGGCGCTTCATGTTCTACGGCATCTTCTGTAC  
CTGGGCGAGGTGACCAAGGCCGTGCAGCCCCTGCTGCTGGGCCGCATCATCGCC  
AGCTACGACCCCGACAACAAGGAGGAGCGCAGCATCGCCATCTACCTGGGCAT  
CGGCCTGTGCCTGCTGTTTCATCGTGCGCACCTGCTGCTGCACCCCGCCATCTTC  
GGCCTGCACCACATCGGCATGCAGATGCGCATCGCCATGTTTCAGCCTGATCTAC

AAGAAGACCCTGAAGCTGAGCAGCCGCGTGCTGGACAAGATCAGCATCGGCCA  
GCTGGTGAGCCTGCTGAGCAACAACCTGAACAAGTTCGACGAGGGCCTGGCCC  
TGGCCCACTTCGTGTGGATCGCCCCCTGCAGGTGGCCCTGCTGATGGGCCTGA  
TCTGGGAGCTGCTGCAGGCCAGCGCCTTCTGCGGCCTGGGCTTCTGATCGTGC  
TGGCCCTGTTCCAGGCCGGCCTGGGCCGCATGATGATGAAGTACCGCGACCAGC  
GCGCCGGCAAGATCAGCGAGCGCCTGGTGATCACCAGCGAGATGATCGAGAAC  
ATCCAGAGCGTGAAGGCCTACTGCTGGGAGGAGGCCATGGAGAAGATGATCGA  
GAACCTGCGCCAGACCGAGCTGAAGCTGACCCGCAAGGCCGCCTACGTGCGCT  
ACTTCAACAGCAGCGCCTTCTTCTTCAGCGGCTTCTTCGTGGTGTTCTGAGCGT  
GCTGCCCTACGCCCTGATCAAGGGCATCATCCTGCGCAAGATCTTACCACCAT  
CAGCTTCTGCATCGTGCTGCGCATGGCCGTGACCCGCCAGTTCCTGGGCCGT  
GCAGACCTGGTACGACAGCCTGGGCGCCATCAACAAGATCCAGGACTTCTGC  
AGAAGCAGGAGTACAAGACCCTGGAGTACAACCTGACCACCACCGAGGTGGTG  
ATGGAGAACGTGACCGCCTTCTGGGAGGAGGGCTTCGGCGAGCTGTTCGAGAA  
GGCCAAGCAGAACAACAACAACCGCAAGACCAGCAACGGCGACGACAGCCTGT  
TCTTCAGCAACTTCAGCCTGCTGGGCACCCCCGTGCTGAAGGACATCAACTTCA  
AGATCGAGCGCGGCCAGCTGCTGGCCGTGGCCGGCAGCACCGGGCGCCGGCAAG  
ACCAGCCTGCTGATGGTGATCATGGGCGAGCTGGAGCCCAGCGAGGGCAAGAT  
CAAGCACAGCGGCCGCATCAGCTTCTGCAGCCAGTTCAGCTGGATCATGCCCCG  
CACCATCAAGGAGAACATCATCTTCGGCGTGAGCTACGACGAGTACCGCTACCG  
CAGCGTGATCAAGGCCTGCCAGCTGGAGGAGGACATCAGCAAGTTCGCCGAGA  
AGGACAACATCGTGCTGGGCGAGGGCGGCATCACCTGAGCGGGCGGCCAGCGC  
GCCCCGCATCAGCCTGGCCCGCGCCGTGTACAAGGACGCCGACCTGTACCTGCTG  
GACAGCCCCTTCGGCTACCTGGACGTGCTGACCGAGAAGGAGATCTTCGAGAG  
CTGCGTGTGCAAGCTGATGGCCAACAAGACCCGCATCCTGGTGACCAGCAAGA  
TGGAGCACCTGAAGAAGGCCGACAAGATCCTGATCCTGCACGAGGGCAGCAGC  
TACTTCTACGGCACCTTCAGCGAGCTGCAGAACCTGCAGCCCGACTTCAGCAGC  
AAGCTGATGGGCTGCGACAGCTTCGACCAGTTCAGCGCCGAGCGCCGCAACAG  
CATCCTGACCGAGACCCTGCACCGCTTCAGCCTGGAGGGCGACGCCCCCGTGAG  
CTGGACCGAGACCAAGAAGCAGAGCTTCAAGCAGACCGGCGAGTTCGGCGAGA  
AGCGCAAGAACAGCATCCTGAACCCCATCAACAGCATCCGCAAGTTCAGCATC  
GTGCAGAAGACCCCCCTGCAGATGAACGGCATCGAGGAGGACAGCGACGAGCC

CCTGGAGCGCCGCTGAGCCTGGTGCCCGACAGCGAGCAGGGCGAGGCCATCC  
TGCCCCGCATCAGCGTGATCAGCACCGGCCCCACCCTGCAGGCCCGCCGCCGCC  
AGAGCGTGCTGAACCTGATGACCCACAGCGTGAACCAGGGCCAGAACATCCAC  
CGCAAGACCACCGCCAGCACCCGCAAGGTGAGCCTGGCCCCCAGGCCAACCT  
GACCGAGCTGGACATCTACAGCCGCCGCCTGAGCCAGGAGACCGGCCTGGAGA  
TCAGCGAGGAGATCAACGAGGAGGACCTGAAGGAGTGCTTCTTCGACGACATG  
GAGAGCATCCCCGCCGTGACCACCTGGAACACCTACCTGCGCTACATCACCGTG  
CACAAGAGCCTGATCTTCGTGCTGATCTGGTGCCTGGTGATCTTCCTGGCCGAG  
GTGGCCGCCAGCCTGGTGGTGCTGTGGCTGCTGGGCAACACCCCCCTGCAGGAC  
AAGGGCAACAGCACCCACAGCCGCAACAACAGCTACGCCGTGATCATCACCAG  
CACCAGCAGCTACTACGTGTTCTACATCTACGTGGGCGTGGCCGACACCCTGCT  
GGCCATGGGCTTCTTCGCGGCCTGCCCCTGGTGCACACCCTGATCACCGTGAG  
CAAGATCCTGCACCACAAGATGCTGCACAGCGTGCTGCAGGCCCCCATGAGCA  
CCCTGAACACCCTGAAGGCCGGCGGCATCCTGAACCGCTTCAGCAAGGACATC  
GCCATCCTGGACGACCTGCTGCCCTGACCATCTTCGACTTCATCCAGCTGCTGC  
TGATCGTGATCGGCGCCATCGCCGTGGTGGCCGTGCTGCAGCCCTACATCTTCG  
TGGCCACCGTGCCCGTGATCGTGGCCTTCATCATGCTGCGCGCCTACTTCCTGCA  
GACCAGCCAGCAGCTGAAGCAGCTGGAGAGCGAGGGCCGCAGCCCCATCTTCA  
CCCACCTGGTGACCAGCCTGAAGGGCCTGTGGACCCTGCGCGCCTTCGGCCGCC  
AGCCCTACTTCGAGACCCTGTTCCACAAGGCCCTGAACCTGCACACCGCCAACT  
GGTTCCTGTACCTGAGCACCCCTGCGCTGGTTCAGATGCGCATCGAGATGATCT  
TCGTGATCTTCTTCATCGCCGTGACCTTCATCAGCATCCTGACCACCGGCGAGG  
GCGAGGGCCGCGTGGGCATCATCCTGACCCTGGCCATGAACATCATGAGCACCC  
TGCAGTGGGCCGTGAACAGCAGCATCGACGTGGACAGCCTGATGCGCAGCGTG  
AGCCGCGTGTTCAAGTTCATCGACATGCCACCGAGGGCAAGCCCACCAAGAG  
CACCAAGCCCTACAAGAACGGCCAGCTGAGCAAGGTGATGATCATCGAGAACA  
GCCACGTGAAGAAGGACGACATCTGGCCCAGCGGCGGCCAGATGACCGTGAAG  
GACCTGACCGCCAAGTACACCGAGGGCGGCAACGCCATCCTGGAGAACATCAG  
CTTCAGCATCAGCCCCGGCCAGCGCGTGGGCCTGCTGGGCCGCACCGGCAGCG  
GCAAGAGCACCCCTGCTGAGCGCCTTCCTGCGCCTGCTGAACACCGAGGGCGAG  
ATCCAGATCGACGGCGTGAGCTGGGACAGCATCACCCCTGCAGCAGTGGCGCAA  
GGCCTTCGGCGTGATCCCCCAGAAGGTGTTCATCTTCAGCGGCACCTTCCGCAA

GAACCTGGACCCCTACGAGCAGTGGAGCGACCAGGAGATCTGGAAGGTGGCCG  
ACGAGGTGGGCCTGCGCAGCGTGATCGAGCAGTTCCCCGGCAAGCTGGACTTC  
GTGCTGGTGGACGGCGGCTGCGTGCTGAGCCACGGCCACAAGCAGCTGATGTG  
CCTGGCCCGCAGCGTGCTGAGCAAGGCCAAGATCCTGCTGCTGGACGAGCCCA  
GCGCCACCTGGACCCCGTGACCTACCAGATCATCCGCCGCACCCTGAAGCAGG  
CCTTCGCCGACTGCACCGTGATCCTGTGCGAGCACCGCATCGAGGCCATGCTGG  
AGTGCCAGCAGTTCCTGGTGATCGAGGAGAACAAGGTGCGCCAGTACGACAGC  
ATCCAGAAGCTGCTGAACGAGCGCAGCCTGTTCCGCCAGGCCATCAGCCCCAGC  
GACCGCGTGAAGCTGTTCCCCACCGCAACAGCAGCAAGTGCAAGAGCAAGCC  
CCAGATCGCCGCCCTGAAGGAGGAGACCGAGGAGGAGGTGCAGGACACCCGCC  
TGTA (SEQ ID NO: 36)

ATGCAGAGAAGCCCCCTGGAGAAGGCCAGCGTGGTGAGCAAGCTGTTCTTCAG  
CTGGACCAGACCCATCCTGAGAAAGGGCTACAGACAGAGACTGGAGCTGAGCG  
ACATCTACCAGATCCCCAGCGTGGACAGCGCCGACAACCTGAGCGAGAAGCTG  
GAGAGAGAGTGGGACAGAGAGCTGGCCAGCAAGAAGAACCCCAAGCTGATCA  
ACGCCCTGAGAAGATGCTTCTTCTGGAGATTCATGTTCTACGGCATCTTCTGT  
CCTGGGCGAGGTGACCAAGGCCGTGCAGCCCCTGCTGCTGGGCAGAATCATCG  
CCAGCTACGACCCCGACAACAAGGAGGAGAGAAGCATCGCCATCTACCTGGGC  
ATCGGCCTGTGCCTGCTGTTTCATCGTGAGAACCCTGCTGCTGCACCCCGCCATCT  
TCGGCCTGCACCACATCGGCATGCAGATGAGAATCGCCATGTTTCAGCCTGATCT  
ACAAGAAGACCCTGAAGCTGAGCAGCAGAGTGCTGGACAAGATCAGCATCGGC  
CAGCTGGTGAGCCTGCTGAGCAACAACCTGAACAAGTTCGACGAGGGCCTGGC  
CCTGGCCCACTTCGTGTGGATCGCCCCCTGCAGGTGGCCCTGCTGATGGGCCT  
GATCTGGGAGCTGCTGCAGGCCAGCGCCTTCTGCGGCCTGGGCTTCTGATCGT  
GCTGGCCCTGTTCCAGGCCGGCCTGGGCAGAATGATGATGAAGTACAGGGACC  
AGAGAGCCGGCAAGATCAGCGAGAGACTGGTGATCACCAGCGAGATGATCGAG  
AACATCCAGAGCGTGAAGGCCTACTGCTGGGAGGAGGCCATGGAGAAGATGAT  
CGAGAACCTGAGACAGACCGAGCTGAAGCTGACCAGAAAGGCCGCCTACGTGA  
GATACTTCAACAGCAGCGCCTTCTTCTTCAGCGGCTTCTTCGTGGTGTTCCTGAG  
CGTGCTGCCCTACGCCCTGATCAAGGGCATCATCCTGAGAAAGATCTTCACCAC  
CATCAGCTTCTGCATCGTGCTGAGAATGGCCGTGACCAGACAGTTCCCCTGGGC  
CGTGCAGACCTGGTACGACAGCCTGGGCGCCATCAACAAGATCCAGGACTTCCT

GCAGAAGCAGGAGTACAAGACCCTGGAGTACAACCTGACCACCACCGAGGTGG  
TGATGGAGAACGTGACCGCCTTCTGGGAGGAGGGCTTCGGCGAGCTGTTCGAG  
AAGGCCAAGCAGAACAACAACAGAAAGACCAGCAACGGCGACGACAGCC  
TGTTCTTCAGCAACTTCAGCCTGCTGGGCACCCCCGTGCTGAAGGACATCAACT  
TCAAGATCGAGAGAGGCCAGCTGCTGGCCGTGGCCGGCAGCACCGGCGCCGGC  
AAGACCAGCCTGCTGATGGTGATCATGGGCGAGCTGGAGCCCAGCGAGGGCAA  
GATCAAGCACAGCGGCAGAATCAGCTTCTGCAGCCAGTTCAGCTGGATCATGCC  
CGGCACCATCAAGGAGAACATCATCTTCGGCGTGAGCTACGACGAGTACAGAT  
ACAGAAGCGTGATCAAGGCCTGCCAGCTGGAGGAGGACATCAGCAAGTTCGCC  
GAGAAGGACAACATCGTGCTGGGCGAGGGCGGCATCACCCCTGAGCGGCGGCCA  
GAGAGCCAGAATCAGCCTGGCCAGAGCCGTGTACAAGGACGCCGACCTGTACC  
TGCTGGACAGCCCCTTCGGCTACCTGGACGTGCTGACCGAGAAGGAGATCTTCG  
AGAGCTGCGTGTGCAAGCTGATGGCCAACAAGACCAGAATCCTGGTGACCAGC  
AAGATGGAGCACCTGAAGAAGGCCGACAAGATCCTGATCCTGCACGAGGGCAG  
CAGCTACTTCTACGGCACCTTCAGCGAGCTGCAGAACCTGCAGCCCAGCTTCAG  
CAGCAAGCTGATGGGCTGCGACAGCTTCGACCAGTTCAGCGCCGAGAGAAGAA  
ACAGCATCCTGACCGAGACCCTGCACAGATTCAGCCTGGAGGGGCGACGCCCC  
GTGAGCTGGACCGAGACCAAGAAGCAGAGCTTCAAGCAGACCGGCGAGTTCGG  
CGAGAAGAGAAAGAACAGCATCCTGAACCCCATCAACAGCATCAGAAAGTTCA  
GCATCGTGCAGAAGACCCCCCTGCAGATGAACGGCATCGAGGAGGACAGCGAC  
GAGCCCCTGGAGAGAAGACTGAGCCTGGTGCCCGACAGCGAGCAGGGCGAGGC  
CATCCTGCCCAGAATCAGCGTGATCAGCACCGGCCCCACCCTGCAGGCCAGAA  
GAAGACAGAGCGTGCTGAACCTGATGACCCACAGCGTGAACCAGGGCCAGAAC  
ATCCACAGAAAGACCACCGCCAGCACCAGAAAGGTGAGCCTGGCCCCCAGGC  
CAACCTGACCGAGCTGGACATCTACAGCAGAAGACTGAGCCAGGAGACCGGCC  
TGGAGATCAGCGAGGAGATCAACGAGGAGGACCTGAAGGAGTGCTTCTTCGAC  
GACATGGAGAGCATCCCCGCCGTGACCACCTGGAACACCTACCTGAGATACATC  
ACCGTGACAAGAGCCTGATCTTCGTGCTGATCTGGTGCCCTGGTGATCTTCCTG  
GCCGAGGTGGCCGCCAGCCTGGTGGTGCTGTGGCTGCTGGGCAACACCCCCCTG  
CAGGACAAGGGCAACAGCACCCACAGCAGAAACAACAGCTACGCCGTGATCAT  
CACCAGCACAGCAGCTACTACGTGTTCTACATCTACGTGGGCGTGGCCGACAC  
CCTGCTGGCCATGGGCTTCTTCAGAGGCCTGCCCTGGTGCACACCCTGATCAC

CGTGAGCAAGATCCTGCACCACAAGATGCTGCACAGCGTGCTGCAGGCCCCCAT  
GAGCACCTGAACACCCTGAAGGCCGGCGGCATCCTGAACAGATTCAGCAAGG  
ACATCGCCATCCTGGACGACCTGCTGCCCCTGACCATCTTCGACTTCATCCAGCT  
GCTGCTGATCGTGATCGGCGCCATCGCCGTGGTGGCCGTGCTGCAGCCCTACAT  
CTTCGTGGCCACCGTGCCCGTGATCGTGCCCTTCATCATGCTGAGAGCCTACTTC  
CTGCAGACCAGCCAGCAGCTGAAGCAGCTGGAGAGCGAGGGCAGGAGCCCCAT  
CTTCACCCACCTGGTGACCAGCCTGAAGGGCCTGTGGACCCTGAGAGCCTTCGG  
CAGACAGCCCTACTTCGAGACCCTGTTCCACAAGGCCCTGAACCTGCACACCGC  
CAACTGGTTCCTGTACCTGAGCACCTGAGATGGTTCAGATGAGAATCGAGAT  
GATCTTCGTGATCTTCTTCATCGCCGTGACCTTCATCAGCATCCTGACCACCGGC  
GAGGGCGAGGGCAGAGTGGGCATCATCCTGACCCTGGCCATGAACATCATGAG  
CACCTGCAGTGGGCCGTGAACAGCAGCATCGACGTGGACAGCCTGATGAGAA  
GCGTGAGCAGAGTGTTCAAGTTCATCGACATGCCACCGAGGGCAAGCCCACC  
AAGAGCACCAAGCCCTACAAGAACGGCCAGCTGAGCAAGGTGATGATCATCGA  
GAACAGCCACGTGAAGAAGGACGACATCTGGCCCAGCGGCGGCCAGATGACCG  
TGAAGGACCTGACCGCCAAGTACACCGAGGGCGGCAACGCCATCCTGGAGAAC  
ATCAGCTTCAGCATCAGCCCCGGCCAGAGAGTGGGCCTGCTGGGCAGAACCGG  
CAGCGGCAAGAGCACCTGCTGAGCGCCTTCCTGAGACTGCTGAACACCGAGG  
GCGAGATCCAGATCGACGGCGTGAGCTGGGACAGCATCACCTGCAGCAGTGG  
AGAAAGGCCTTCGGCGTGATCCCCAGAAGGTGTTTCATCTTCAGCGGCACCTTC  
AGAAAGAACCTGGACCCCTACGAGCAGTGGAGCGACCAGGAGATCTGGAAGGT  
GGCCGACGAGGTGGGCCTGAGAAGCGTGATCGAGCAGTTCCCCGGCAAGCTGG  
ACTTCGTGCTGGTGGACGGCGGCTGCGTGCTGAGCCACGGCCACAAGCAGCTG  
ATGTGCCTGGCCAGAAGCGTGCTGAGCAAGGCCAAGATCCTGCTGCTGGACGA  
GCCAGCGCCCACCTGGACCCCGTGACCTACCAGATCATCAGAAGAACCCTGA  
AGCAGGCCTTCGCCGACTGCACCGTGATCCTGTGCGAGCACAGAATCGAGGCC  
ATGCTGGAGTGCCAGCAGTTCCTGGTGTGATCGAGGAGAACAAAGGTGAGACAGTA  
CGACAGCATCCAGAAGCTGCTGAACGAGAGAAGCCTGTTTCAGACAGGCCATCA  
GCCCCAGCGACAGAGTGAAGCTGTTCCCCACAGAAACAGCAGCAAGTGCAAG  
AGCAAGCCCCAGATCGCCGCCCTGAAGGAGGAGACCGAGGAGGAGGTGCAGG  
ACACCAGACTGTGA (SEQ ID NO: 37)

ATGCAGAGGTCACCTCTGGAAAAGGCTAGCGTGGTCAGCAAGCTATTTTTTTCC  
TGGACCCGCCCGATACTCAGGAAGGGCTACCGACAGCGGCTGGAGCTGAGTGA  
CATTATCAGATTCCCTCCGTCGATTCCGCTGACAACCTGTCTGAGAACTGGA  
GCGGGAATGGGATAGGGAACTGGCGTCCAAAAAAAAACCCCAAACCTCATCAATG  
CACTCCGCAGATGCTTCTTCTGGCGGTTTATGTTTTATGGCATATTCCTGTATCT  
GGGGGAGGTGACGAAAGCCGTGCAGCCGCTGCTGCTTGGTCGCATTATCGCGTC  
ATACGATCCAGATAACAAGGAGGAAAGAAGTATCGCTATCTATCTCGGGATAG  
GGCTGTGCCTGCTCTTCATTGTGCGGACTCTTCTCTTGCACCCCGCCATTTTCGG  
TCTGCATCATATAGGTATGCAGATGAGAATTGCGATGTTCTCATTGATTTACAA  
AAAAACGCTTAAGCTAAGTTCAAGGGTGCTAGATAAGATATCGATCGGCCAGC  
TGGTGTCTCTGCTTAGCAACAACCTCAATAAATTCGACGAAGGCCTTGCACTGG  
CCCACTTCGTGTGGATCGCCCCTCTGCAGGTGGCTCTGCTGATGGGGTTAATAT  
GGGAGCTGTTGCAGGCCTCCGCTTTTTGTGGCCTGGGGTTTCTCATCGTGTTGGC  
CTTGTTTCAGGCAGGGCTGGGACGTATGATGATGAAATATAGGGATCAGAGGG  
CTGGCAAAATCTCTGAGCGCCTGGTTATTACGAGTGAAATGATTGAGAACATCC  
AGTCAGTGAAGGCCTATTGCTGGGAGGAGGCCATGGAAAAAATGATTGAGAAC  
CTACGCCAGACTGAGCTGAAGTTAACCAGAAAAGCCGCCTATGTGCGCTACTTT  
AACAGTAGCGCATTTTTCTTCTCCGGTTTTTTTCGTGGTGTTTCTTAGTGTGTTGCC  
GTATGCCTTAATCAAGGGAATAATACTCCGGAAGATTTTCACTACCATCAGCTT  
CTGTATCGTGTTGCGGATGGCCGTCACCCGGCAGTTTCCCTGGGCAGTACAGAC  
TTGGTACGATTCTCTCGGAGCAATTAACAAAATCCAAGACTTTCTACAAAAGCA  
GGAGTACAAGACCCTGGAGTACAATCTGACCACCACAGAAGTCGTAATGGAGA  
ATGTAAGTGCCTTCTGGGAAGAGGGCTTTGGCGAACTCTTTGAAAAGGCCAAGC  
AGAACAATAACAACCGGAAGACCTCCAACGGGGACGACAGCTTATTTTTTCAGC  
AATTTTTCTTTGCTCGGGACCCCTGTACTGAAAGATATTAACTTTAAGATCGAGC  
GCGGACAACCTCCTGGCTGTCGCCGGCAGCACTGGAGCTGGAAAAACATCACTG  
CTTATGGTGATAATGGGAGAACTCGAACCAAGCGAGGGAAAAATAAAGCACTC  
TGGACGGATTAGTTTTTGCTCCCAGTTCTCGTGGATAATGCCTGGCACCATTAAG  
GAGAATATCATCTTTGGAGTGAGTTACGACGAATACCGGTACCGGTCCGTTATC  
AAGGCTTGTCAACTCGAGGAGGACATTTCTAAATTCGCCGAAAAAGATAATATA  
GTGCTGGGCGAAGGAGGCATTACACTGAGCGGGGGTCAGAGAGCTCGAATTAG  
CCTCGCCCGAGCAGTCTATAAAGACGCCGATCTTTACCTGCTGGATTCCCCTTTT

GGGTATTTGGATGTTCTGACAGAGAAGGAAATCTTTGAATCATGTGTCTGTAAA  
CTGATGGCCAATAAGACTAGGATTCTAGTGACTTCGAAAATGGAGCACCTGAA  
AAAAGCGGACAAAATTCTGATACTCCATGAAGGGTCTTCCTACTTCTACGGCAC  
CTTCTCAGAGTTGCAGAACTTACAACCTGATTTTTTCATCTAAGCTTATGGGGTGC  
GACTCGTTTGACCAGTTCTCCGCTGAAAGACGAAACAGCATCTTAACGGAAACT  
CTTCACAGGTTCTCATTAGAGGGAGATGCGCCGGTGTCTGGACAGAGACAAA  
AAAACAGTCTTTCAAACAGACAGGAGAGTTTGGCGAGAAGAGAAAAAACTCAA  
TCCTCAATCCCATCAATTCTATTAGAAAGTTTAGCATCGTCCAAAAAACACCAT  
TGCAGATGAATGGGATTGAGGAGGACAGTGATGAGCCTTTGGAACGAAGACTG  
TCCCTGGTACCCGATAGCGAACAGGGTGAGGCCATCCTTCCTAGGATCTCGGTC  
ATAAGTACAGGGCCCACTGCAGGCCAGGCGACGTCAAAGTGTCTCAATCTT  
ATGACGCACAGTGTGAATCAGGGGCAGAACATCCATCGTAAGACGACAGCTTC  
AACTCGAAAGGTCAGTCTAGCTCCACAAGCCAATCTTACAGAGCTGGACATTTA  
TTCCCGCCGCCTCAGTCAGGAGACCGGATTGGAAATATCAGAGGAAATTAATG  
AAGAGGATCTGAAGGAATGCTTCTTTGATGACATGGAATCGATCCCCGCTGTTA  
CTACCTGGAACACATATCTGAGATATATTACCGTCCATAAGAGCTTAATCTTTGT  
ACTGATATGGTGCTTGGTGATTTTCCTGGCAGAGGTTGCGGCGAGTTTGGTTCGT  
GCTATGGCTCCTTGGAAACACTCCCCTGCAGGATAAGGGGAACTCCACTCATAG  
CAGGAATAACAGCTATGCCGTGATCATCACCTCTACCTCCTCTTATTACGTGTTT  
TACATATACGTCGGTGTTGCGGATACCCTGTTGGCAATGGGGTTCTTTAGAGGA  
CTACCCCTAGTTCACACCCTGATCACCGTTTCGAAGATCTTGCACCACAAGATG  
CTTCATAGCGTTCTCCAAGCTCCTATGAGCACCTTAATACACTGAAAGCAGGA  
GGTATCCTTAACCGCTTTTCCAAAGACATCGCTATACTCGACGATTTGCTCCCAT  
TGACCATCTTCGACTTCATTCAGCTGCTCCTCATTGTGATCGGCGCCATTGCCGT  
GGTCGCAGTGTTACAGCCATATATTTTCGTAGCCACCGTGCCCGTCATCGTGGC  
ATTTATCATGCTGCGCGCATATTTCTTACAGACATCTCAGCAACTGAAGCAGCT  
GGAATCTGAGGGCAGATCTCCTATTTTTACACACCTGGTTACCAGCCTGAAGGG  
CCTGTGGACCCTGCGTGCTTTCGGTCGCCAACCTACTTTGAGACTCTCTTCCAT  
AAGGCTCTGAATTTACATACTGCCAATTGGTTCCTATACCTTAGTACCCTTCGGT  
GGTTCAGATGCGGATAGAAATGATCTTCGTGATTTTCTTCATCGCAGTCACTTT  
CATCTCTATTTTGACGACCGGTGAGGGCGAGGGCAGGGTGGGCATCATTCTGAC  
TTTGGCCATGAACATTATGTCAACACTCCAGTGGGCCGTTAATTCAAGCATTGA

TGTGGATTCCCTTGATGCGTTCGTCAGCAGGGTATTTAAATTCATAGACATGCCC  
ACCGAGGGCAAGCCAACAAAATCTACCAAGCCATACAAAAATGGCCAACTAAG  
CAAGGTCATGATTATCGAGAATTCTCATGTGAAAAAGGACGACATTTGGCCTTC  
CGGGGGTCAAATGACTGTAAAGGACCTGACGGCTAAATACACTGAGGGGCGGTA  
ATGCTATCTTGGAGAACATCTCTTTCAGCATCTCCCCTGGCCAGAGAGTGGGAC  
TGCTCGGGCGGACAGGCTCCGGAAAGTCTACGCTCCTTTCAGCATTCTTAGAC  
TTCTGAACACCGAAGGTGAGATTCAGATTGACGGGGTCTCTTGGGACTCCATCA  
CACTTCAGCAATGGAGGAAGGCATTCGGTGTAAATCCCCCAAAGGTTTTTATCT  
TCTCCGGAACATTTTCGTAAGAATCTGGACCCGTACGAGCAGTGGTCAGATCAGG  
AGATCTGGAAAGTAGCAGACGAGGTCGGGCTACGGAGCGTTATTGAACAGTTT  
CCTGGCAAACCTGGACTTCGTTTTGGTGGACGGAGGCTGTGTGCTGAGTCACGGC  
CATAAACAACCTGATGTGCTTAGCTAGGTCTGTTCTCAGCAAGGCAAAGATTTTA  
CTGCTGGATGAACCAAGCGCCACCTTGATCCAGTGACATATCAAATCATCAGA  
AGAACTCTTAAACAGGCGTTCGCCGACTGCACAGTGATCCTGTGTGAGCACAGA  
ATAGAAGCCATGCTGGAATGTCAACAGTTTCTCGTGATTGAGGAGAACAAGGT  
GCGCCAGTACGATAGCATCCAGAAGTTACTCAATGAAAGGTCACTCTTCAGGCA  
GGCCATCTCACCCAGCGACCGCGTTAAGCTGTTTCCACACCGAAACAGTTCCAA  
GTGCAAAGTAAGCCACAGATTGCTGCACTGAAGGAAGAGACAGAAGAAGAA  
GTTTCAGGACACTCGGCTCTGA (SEQ ID NO: 38)

ATGCAGAGGAGCCCCTGGAGAAAGCCTCCGTGGTGTGAGTAACTCTTTTTTGT  
TGGACCAGACCCATCCTGCGAAAAGGATACAGGCAGCGCCTCGAGTTGTCAGA  
TATCTACCAGATTCCTTCTGTGGACTCAGCTGACAATTTGAGTGAGAAGCTGGA  
GCGGGAGTGGGATAGAGAGCTGGCGAGCAAAAAAACCCCAAGCTTATCAATG  
CTCTGCGCCGCTGCTTTTTCTGGAGGTTTCATGTTTTATGGGATCTTCCTGTACCT  
GGGGGAGGTCACCAAAGCTGTTTCAGCCGCTCCTTCTTGGCCGCATCATCGCCAG  
CTATGACCCTGATAATAAAGAAGAAAGGTCTATTGCTATTTATCTGGGAATTGG  
CCTCTGCTTGCTCTTCATCGTCCGCACCCTTCTGCTGCACCCTGCCATTTTTGGCC  
TTCACCACATCGGCATGCAAATGAGAATTGCCATGTTCTCCCTCATTTACAAA  
AGACCCTGAAACTTTCCTCAAGAGTGTTAGATAAAAATATCCATTGGTCAGCTGG  
TCAGCCTGCTGTCCAACAATCTTAACAAATTTGATGAAGGCTTGGCGCTGGCCC  
ACTTCGTGTGGATTGCACCTCTGCAGGTGGCCCTGTTGATGGGACTTATATGGG  
AGCTGCTTCAAGCCTCTGCTTTCTGTGGGCTGGGCTTTTTGATTGTACTGGCACT

TTTTTCAGGCTGGGCTCGGAAGAATGATGATGAAATACAGAGATCAGCGGGCCG  
GGAAGATATCAGAGCGACTTGTGATCACCAGTGAAATGATTGAAAATATTCAG  
AGCGTGAAAGCCTACTGCTGGGAAGAAGCCATGGAGAAGATGATTGAGAACCT  
GAGGCAGACAGAGCTCAAGCTCACTCGGAAGGCTGCTTATGTTTCGCTATTTCAA  
CAGCAGCGCCTTCTTCTTCAGTGGCTTCTTTGTTGTCTTCTGTCTGTTCTGCCAT  
ATGCACTGATAAAAGGCATTATTTTACGAAAGATCTTCACCACCATCAGTTTTT  
GCATCGTTCTCAGGATGGCCGTCACAAGACAGTTCCCCTGGGCTGTGCAGACCT  
GGTACGATTCTTGGGGGCCATCAACAAGATTCAAGATTTCTTGCAAAAACAAG  
AATATAAACTTTAGAATACAACCTCACCACCACTGAAGTGGTCATGGAAAATG  
TGACAGCCTTTTGGGAGGAGGGTTTTGGAGAATTGTTTCGAGAAGGCCAAAGCAG  
AATAACAACAACAGGAAGACGAGCAATGGGGACGACTCTCTCTTCTTCAGCAA  
CTTTTCACTGCTCGGGACCCCTGTGTTGAAAGATATAAACTTCAAGATCGAGAG  
GGGCCAGCTCTTGGCTGTGGCAGGCTCCACTGGAGCTGGTAAAACATCTCTTCT  
CATGGTGATCATGGGGGAACTGGAGCCTTCCGAAGGAAAAATCAAGCACAGTG  
GGAGAATCTCATTCTGCAGCCAGTTTTCTGGATCATGCCCGGCACCATTAAGG  
AAAACATCATATTTGGAGTGTCTATGATGAGTACCGCTACCGGTCAGTCATCA  
AAGCCTGTCAGTTGGAGGAGGACATCTCCAAGTTTGCAGAGAAAGACAACATT  
GTGCTTGGAGAGGGGGGTATCACTCTTTCTGGAGGACAAAGAGCCAGGATCTCT  
TTGGCCCGGGCAGTCTACAAGGATGCAGACCTCTACTTGTTGGACAGTCCCTTC  
GGCTACCTCGACGTGCTGACTGAAAAAGAAATTTTTGAAAGCTGTGTGTGCAAA  
CTGATGGCAAACAAGACCAGGATTCTTGTACCAGCAAGATGGAACATCTGAA  
GAAAGCGGACAAAATTCTGATTCTGCATGAAGGGAGCTCCTACTTCTATGGAAC  
ATTTAGCGAGCTTCAGAACCTACAGCCAGACTTCTCCTCCAAATTAATGGGCTG  
TGACTCCTTCGACCAGTTCTCTGCAGAAAGAAGAACTCTATACTCACAGAGAC  
CCTCCACCGCTTCTCCCTTGAGGGAGATGCCCCAGTTTCTTGGACAGAAACCAA  
GAAGCAGTCCTTTAAGCAGACTGGCGAGTTTGGTGAAAAGAGGAAAAATTCAA  
TTCTCAATCCAATTAACAGTATTCGCAAGTTCAGCATTGTCCAGAAGACACCCC  
TCCAGATGAATGGCATCGAAGAAGATAGTGACGAGCCGCTGGAGAGACGGCTG  
AGTCTGGTGCCAGATTCAGAACAGGGGGAGGCCATCCTGCCCCGGATCAGCGT  
CATTTCCACAGGCCCCACATTACAAGCACGGCGCCGGCAGAGTGTTTTAAATCT  
CATGACCCATTCAGTGAACCAGGGCCAAAATATCCACAGGAAGACTACAGCTT  
CTACCCGGAAAGTGTCTCTGGCCCCTCAGGCCAATCTGACCGAGCTGGACATCT

ACAGCAGGAGGCTCTCCCAGGAAACAGGGCTGGAAATATCTGAAGAGATTAAT  
GAAGAGGATCTTAAAGAGTGCTTCTTTGATGACATGGAGAGCATCCCCGCGGTG  
ACCACATGGAACACCTACCTTAGATATATTACTGTCCACAAGAGCCTCATATTT  
GTCCTCATCTGGTGCCTGGTTATTTTCTCGCTGAGGTGGCGGCCAGTCTTGTTG  
TGCTCTGGCTGCTGGGCAACACTCCTCTCCAGGACAAGGGCAATAGTACTCACA  
GCAGAAATAATTCTTATGCCGTCATCATTACAAGCACCTCCAGCTACTACGTGT  
TCTACATCTATGTGGGCGTGGCTGACACCCTCCTGGCCATGGGTTTCTTCCGGGG  
CCTGCCTTTGGTGCACACCCTCATCACAGTGTCAAAAATTCTGCACCATAAAAT  
GCTTCATTCTGTCCTGCAGGCACCCATGAGCACTTTGAACACATTGAAGGCTGG  
CGGCATCCTCAACAGATTTTCTAAAGATATTGCTATCCTGGATGATCTCCTCCCC  
CTGACAATCTTTGACTTTATCCAGCTTCTGCTGATCGTGATTGGAGCCATAGCAG  
TGGTTGCTGTCCTGCAGCCCTACATTTTTGTGGCCACCGTGCCCGTGATTGTTGC  
CTTTATTATGCTCAGAGCTTACTTCCTGCAAACCTTCTCAACAGCTCAAACAGCTA  
GAATCTGAGGGCCGGAGCCCCATTTTTACCCACCTGGTGACTTCCCTGAAGGGA  
CTGTGGACTCTGAGAGCATTTCGGGCGACAGCCTTACTTTGAGACACTGTTCCAC  
AAGGCCCTGAACTTGCACACTGCCAACTGGTTTCTTTACCTGAGCACACTCCGC  
TGGTTCCAGATGCGGATAGAGATGATCTTCGTCATCTTTTTTATAGCTGTAACCT  
TCATTTCTATCCTTACAACAGGAGAAGGAGAGGGCAGGGTGGGAATCATCCTCA  
CGCTGGCTATGAACATAATGTCCACCTTGCAGTGGGCCGTGAATTCCAGTATAG  
ATGTGGATTCTCTAATGAGGAGTGTCTCCCGGGTGTTTAAATTCATTGATATGCC  
TACTGAGGGGAAACCCACCAAGTCAACAAAACCTTATAAGAATGGACAGCTGA  
GCAAGGTGATGATAATTGAGAACAGCCACGTGAAGAAGGATGACATTTGGCCC  
AGCGGGGGCCAGATGACTGTGAAGGACCTGACGGCCAAGTACACCGAAGGTGG  
AAATGCCATTTTGAAAACATCAGCTTCTCAATCTCTCCTGGGCAGAGAGTTGG  
ATTGCTGGGTCGCACGGGCAGCGGCAAATCAACCCTGCTCAGTGCCTTCCTTCG  
GCTCCTGAATACAGAAGGCGAAATCCAAATTGACGGGGTGAGCTGGGACAGCA  
TCACCCTGCAGCAGTGGAGAAAAGCATTGTTGGGGTCATTCCACAGAAAGTTTTCA  
TCTTCTCTGGCACTTTCAGAAAGAACCTGGACCCCTATGAGCAGTGGAGCGACC  
AGGAGATCTGGAAGGTTGCAGATGAAGTTGGCCTGCGGAGTGTGATAGAACAA  
TTTCTGGCAAGCTGGATTTTGTGCTGGTAGATGGAGGCTGCGTGCTGTCCAC  
GGCCACAAACAGCTGATGTGCCTCGCCCGCTCCGTTCTTTCAAAGGCCAAAATC  
TTGCTTTTGGATGAGCCCAGTGCTCACCTCGACCCAGTGACCTATCAGATAATC

CGCAGGACCTTAAAGCAAGCTTTTGCCGACTGCACCGTCATACTGTGTGAGCAC  
CGGATTGAAGCAATGCTGGAATGCCAGCAGTTTCTGGTGATCGAGGAGAATAA  
GGTCCGGCAGTACGACAGCATCCAGAAGTTGTTGAATGAGCGCAGCCTTTTCCG  
CCAGGCCATCTCCCCATCTGACAGAGTCAAGCTGTTTCCACATAGGAACTCCTC  
TAAGTGCAAGTCCAAGCCCCAGATCGCTGCCCTCAAGGAGGAAACTGAGGAAG  
AGGTGCAGGATAACCCGCCTGTGA (SEQ ID NO: 39)

ATGCAACGGAGTCCTCTGGAAAAAGCCTCTGTCGTATCTAAGCTTTTCTTCAGTT  
GGACACGCCCGATTTTGAGAAAGGGTTATCGGCAACGCTTGGAAGTTAGTGACA  
TCTACCAAATTCCAAGTGTAGACTCAGCCGATAACTTGAGCGAAAAGCTCGAAC  
GAGAGTGGGATCGAGAAGTGGCTAGCAAAAAAATCCCAAAGTTCATAAATGCC  
CTGCGACGCTGTTTCTTTTGGCGATTTATGTTTTACGGTATTTTCCTTTATTTGGG  
TGAGGTCACGAAGGCTGTACAGCCACTGCTGCTGGGTTCGCATCATTGCCTCTTA  
CGACCCTGACAACAAAGAGGAGCGGTCAATAGCTATCTACCTTGGTATAGGACT  
TTGCTTGCTCTTCATAGTCCGCACGTTGCTTCTCCACCCTGCTATATTTGGTCTCC  
ATCACATTGGGATGCAAATGCGGATCGCGATGTTCAAGTCTTATATATAAAAAGA  
CTCTTAACTTTCCAGCCGGGTCTGGATAAGATCTCTATTGGTCAACTGGTATC  
TCTTTTGTCTAACAACCTGAATAAGTTCGACGAGGGCCTTGCATTGGCCCATTTT  
GTATGGATTGCCCTTTGCAAGTCGCCCTCCTGATGGGATTGATCTGGGAACTC  
CTGCAAGCTAGTGCTTTTTGCGGATTGGGATTCCTCATAGTCCTTGCGCTCTTTC  
AGGCGGGACTTGGACGCATGATGATGAAGTATCGCGACCAACGAGCTGGCAAG  
ATCAGTGAACGGCTTGTAATAACCAGTGAAATGATAGAGAACATCCAGAGCGT  
AAAAGCTTACTGTTGGGAAGAAGCGATGGAAAAGATGATTGAGAACCTTCGCC  
AGACAGAACTTAACTTACACGAAAGGCCGCTTATGTCCGGTACTTCAACTCTT  
CAGCATTFTTTTTTAGTGGCTTCTTTGTAGTGTTCCTGTCCGTCTTCCGTATGCA  
CTTATCAAGGGTATAATACTTAGGAAAATCTTCACAACAATCAGTTTTTGCATA  
GTCCTTCGCATGGCAGTAACTCGCCAATTTCCCTGGGCAGTTCAGACGTGGTAC  
GACTCACTTGGCGCAATTAACAAAATTCAAGATTTCTCCAAAAGCAAGAGTAT  
AAAACCTTGGAATACAACCTTACCACCACAGAAGTTGTAATGGAAAATGTCAC  
AGCCTTCTGGGAGGAAGGTTTCGGCGAACTTTTTGAGAAGGCGAAGCAAATA  
ACAATAATCGGAAAACATCAAACGGTGACGATTCAGTCTTTTCTAACTTTA  
GCCTTCTTGGGACGCCCGTCCTGAAGGACATAAACTTTAAGATTGAACGGGGTC  
AACTTCTCGCGGTTCGCAGGGAGTACTGGAGCGGGGAAAACGAGCCTGCTGATG

GTGATAATGGGGGAGTTGGAGCCCTCAGAAGGCAAGATCAAGCATAGTGGTAG  
AATTAGCTTCTGCAGTCAATTTAGTTGGATTATGCCGGGCACGATCAAAGAAAA  
TATAATCTTTGGGGTATCCTACGATGAATACAGGTACCGATCAGTGATAAAAGC  
GTGCCAGCTTGAAGAAGACATTTCAAAGTTTGCTGAGAAGGATAATATCGTACT  
TGGAGAAGGAGGTATCACCTGTCTGGGGGTCAACGAGCGAGGATCTCCCTGG  
CACGCGCCGTCTACAAGGACGCGGACCTCTATCTGTTGGATTCACCGTTCGGAT  
ATTTGGACGTGCTTACGGAGAAAGAAATATTTGAGAGCTGTGTTTGCAAGCTCA  
TGGCAAATAAAACCAGAATATTGGTTACAAGCAAGATGGAGCATCTTAAGAAA  
GCAGATAAAATCCTGATATTGCACGAGGGCTCTTCATACTTCTACGGGACGTTT  
TCTGAGTTGCAGAACCTCCAGCCGGATTCAGCTCTAAGCTGATGGGCTGTGAT  
TCCTTTGATCAGTTTAGTGCGGAAAGACGAAACAGTATACTCACCGAAACACTG  
CACAGGTTCTCTCTGGAGGGCGACGCCCCGGTTTCCTGGACAGAGACGAAGAA  
GCAGTCCTTCAAACAGACAGGCGAGTTTGGGGAGAAAAGGAAAAATAGCATAAC  
TCAACCCGATTAACAGCATTTCGCAAGTTCAGTATAGTACAAAAGACCCCGTTGC  
AGATGAACGGTATAGAGGAAGATTCTGATGAGCCACTGGAAAGACGGCTTTCT  
CTCGTTCCGGACAGTGAACAGGGAGAGGCAATACTGCCTCGGATCAGCGTTATC  
TCTACAGGACCTACTTTGCAAGCTCGGCGCCGACAGTCAGTCTTGAATCTTATG  
ACTCATAGTGTTAATCAAGGCCAGAATATCCATCGCAAGACCACCGCAAGTACA  
AGGAAAGTGAGCTTGGCACCTCAAGCAAACCTTACTGAACTTGATATCTACTCA  
CGGCGACTTTCACAGGAGACCGGACTTGAAATTAGTGAAGAAATTAACGAGGA  
GGACCTCAAGGAGTGCTTCTTCGATGACATGGAATCAATCCCCGCAGTCACAAC  
CTGGAACACTTATCTGAGGTATATAACAGTTCACAAGAGCCTCATTTTTGTACTT  
ATTTGGTGTTTGGTAATTTTCCTGGCGGAGGTTGCTGCTTCTTTGGTCGTCCTTTG  
GCTCCTCGGGAATACACCGCTCCAAGACAAAGGCAACTCTACCCATAGTAGGA  
ACAATTCATATGCAGTGATTATAACCAGTACATCATCTTATTACGTTTTCTATAT  
TTATGTCGGGGTAGCTGACACGCTGTTGGCGATGGGCTTCTTTAGGGGCCTCCC  
CTTGGTACACACCCTTATCACGGTGAGTAAAATCCTGCATCACAAAATGCTTCA  
TTCTGTACTCCAAGCGCCGATGAGTACGCTTAATACGCTGAAAGCAGGAGGGAT  
ACTGAATCGGTTTCAGCAAGGACATCGCCATTCTGGATGACCTGCTTCCATTGAC  
AATATTTGATTTCAATCAGCTCCTTCTCATAGTTATTGGAGCCATAGCGGTGGTG  
GCTGTGCTTCAGCCTTATATATTCGTTGCCACAGTTCCCGTTATAGTGGCATTTA  
TAATGCTCAGGGCCTACTTTCTCCAGACTTCCCAGCAGTTGAAGCAACTCGAAT

CAGAAGGAAGGTCACCTATTTTCACACATCTTGTGACTTCCTTGAAGGGCTTGT  
GGACGCTGCGGGCCTTCGGAAGACAACCATATTTTGAAACTCTCTTCCACAAAG  
CTTTGAATCTTCATACTGCGAACTGGTTCCTGTATTTGAGTACTTTGCGCTGGTT  
CCAGATGAGGATAGAAATGATATTCGTTATCTTCTTTATCGCGGTTACGTTCATA  
AGTATCCTCACTACGGGGGAGGGGTGAGGGTAGAGTGGGCATAATACTGACCCT  
CGCCATGAACATTATGTCCACCCTGCAGTGGGCGGTAAACAGCAGCATAGATGT  
GGATTCTTTGATGCGCAGTGTGAGCAGGGTTTTTAAGTTTATCGATATGCCGAC  
GGAAGGAAAGCCCCTAAAAGCACGAAACCCTATAAAAATGGACAGCTTAGCA  
AAGTAATGATAATCGAGAATAGCCATGTGAAAAAGGATGACATATGGCCTTCC  
GGAGGCCAAATGACTGTAAAGATCTGACCGCTAAATATACCGAGGGCGGCAA  
CGCAATACTCGAAAACATAAGCTTTTCCATAAGCCCCGGCCAACGCGTGGGTCT  
TCTGGGGAGGACTGGCTCCGGAATAACGTTGCTTAGCGCGTTTTTGCGGCT  
CCTTAACACTGAAGGTGAGATCCAAATAGATGGCGTTAGTTGGGACTCTATAAC  
ACTGCAACAATGGCGGAAAGCTTTCGGCGTCATACCTCAGAAGGTGTTTCATCTT  
TAGCGGAACGTTTCAGGAAGAACTTGGATCCCTACGAACAATGGAGTGATCAAG  
AAATATGGAAAGTGGCAGATGAGGTAGGCTTGCGCAGTGTCAATTGAACAATTC  
CCAGGGAAACTCGACTTTGTACTGGTGGACGGCGGTTGCGTCTTGTCACACGGG  
CACAACAGTTGATGTGTTTGGCCCGCAGTGTGTTTGTCTAAGGCGAAGATTCTG  
TTGCTCGACGAACCGAGTGCTCATCTTGATCCCGTCACCTACCAAATCATCAGA  
AGGACGTTGAAGCAAGCTTTCGCCGACTGCACTGTAATCCTTTGTGAGCATAGG  
ATCGAAGCAATGCTCGAGTGCCAACAGTTCTTGGTTATAGAGGAGAATAAGGTT  
CGGCAATACGACTCAATACAGAACTGCTTAATGAGCGGTCACTCTTTCGACAA  
GCTATCTCTCCTAGTGACAGGGTAAAGCTTTTTCTCATCGGAATTCCAGCAAGT  
GTAAGAGTAAACCACAGATCGCCGCCCTTAAAGAGGAGACCGAAGAAGAGGTG  
CAGGATACGAGACTTTAG (SEQ ID NO: 40)

### *Синтез мРНК*

[0128] мРНК в соответствии с настоящим изобретением могут быть синтезированы в соответствии с любым из ряда известных способов. Например, мРНК в соответствии с настоящим изобретением могут быть синтезированы посредством транскрипции *in vitro* (IVT). Вкратце, IVT, как правило, осуществляют с использованием линейной или кольцевой ДНК-матрицы, содержащей промотор, пула рибонуклеотидных трифосфатов, буферной системы, которая может содержать ДТТ и

ионы магния, и соответствующего ингибитора РНК-полимеразы (*например*, РНК-полимеразы Т3, Т7 или SP6), ДНКазы I, пирофосфатазы и/или РНКазы. Точные условия будут варьироваться в зависимости от конкретного применения.

*Иллюстративные кодон-оптимизированные мРНК регулятора трансмембранной проводимости при кистозном фиброзе человека (CFTR)*

*Дизайн конструкции:*

**X – SEQ ID NO: 1 – Y**

*Последовательности 5'- и 3'-UTR:*

X (последовательность 5'-UTR) =

GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAAGAC  
ACCGGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAU  
UCCCCGUGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACG (**SEQ ID NO: 4**)

Y (последовательность 3'-UTR) =

CGGGUGGCAUCCCUGUGACCCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCCUUGGAAGUU  
GCCACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUCAAGC  
U (**SEQ ID NO: 5**)

ИЛИ

GGGUGGCAUCCCUGUGACCCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCCUUGGAAGUUG  
CCACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUCAAGC  
U (**SEQ ID NO: 6**)

**[0129]** Иллюстративная кодон-оптимизированная последовательность мРНК CFTR человека предусматривает SEQ ID NO: 1, как описано в разделе подробного описания.

**[0130]** Иллюстративная полноразмерная кодон-оптимизированная последовательность мРНК CFTR человека показана ниже:

GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAAGAC  
ACCGGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAU  
UCCCCGUGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACGAUGCAACGCUCUCCUC  
UUGAAAAGGCCUCGGUGGUGUCCAAGCUCUUCUUCUCGUGGACUAGACCCAU

CCUGAGAAAGGGGUACAGACAGCGCUUGGAGCUGUCCGAUAUCUAUCAAUUC  
CCUUCGUGGACUCCGCGGACAACCUGUCCGAGAAGCUCGAGAGAGAAUGGG  
ACAGAGAACUCGCCUCAAGAAGAACCCGAAGCUGAUUAAUGCGCUUAGGCG  
GUGCUUUUUCUGGCGGUUCAUGUUCUACGGCAUCUUCCUCUACCUGGGAGAG  
GUCACCAAGGCCGUGCAGCCCCUGUUGCUGGGACGGAUUAUUGCCUCCUACG  
ACCCCGACAACAAGGAAGAAAGAAGCAUCGCUAUCUACUUGGGCAUCGGUCU  
GUGCCUGCUUUUCAUCGUCGCGGACCCUCUUGUUGCAUCCUGCUAUUUUCGGC  
CUGCAUCACAUUGGCAUGCAGAUGAGAAUUGCCAUGUUUCCUGAUCUACA  
AGAAAACUCUGAAGCUCUCGAGCCGCGUGCUUGACAAGAUAUCCAUCGGCCA  
GCUCGUGUCCUGCUCUCCAACAUCUGAACAAGUUCGACGAGGGCCUCGCC  
CUGGCCACUUCGUGUGGAUCGCCCCUCUGCAAGUGGGCGCUUCUGAUGGGCC  
UGAUCUGGGAGCUGCUGCAAGCCUCGGCAUUCUGUGGGCUUGGAUUCUGAU  
CGUGCUGGCACUGUUCAGGCCGGACUGGGGCGGAUGAUGAUGAAGUACAGG  
GACCAGAGAGCCGGAAGAUUCCGAACGGCUGGUGAUCACUUCGGAAAUGA  
UCGAAAACAUCAGUCAGUGAAGGCCUACUGCUGGGGAAGAGGCCAUGGAAAA  
GAUGAUUGAAAACCUCCGGCAAACCGAGCUGAAGCUGACCCGCAAGGCCGCU  
UACGUGCGCUAUUUCAACUCGUCGCUUUCUUCUUCUCCGGGUUCUUCGUGG  
UGUUUCUCUCCGUGCUCUCCUACGCCUGAUUAAGGGAAUCAUCCUCAGGAA  
GAUCUUCACCACCAUUUCUUCUGUAUCGUGCUCGCAUGGCCGUGACCCGG  
CAGUUCCAUGGGCCGUGCAGACUUGGUACGACUCCUGGGAGCCAUAACA  
AGAUCAGGACUUCUCAAAGCAGGAGUACAAGACCCUCGAGUACAACCU  
GACUACUACCGAGGUCGUGAUGGAAAACGUCACCGCCUUUUGGGAGGAGGGA  
UUUGGCGAACUGUUCGAGAAGGCCAAGCAGAACAACAACCGCAAGACCU  
CGAACGGUGACGACUCCUCUUCUUUCAAAACUUCAGCCUGCUCGGGACGCC  
CGUGCUGAAGGACAUAACUUCAAGAUCGAAAGAGGACAGCUCCUGGGCGGUG  
GCCGGAUCGACCGGAGCCGGAAGACUUCUCCUGCUGAUGGUGAUAUGGGAG  
AGCUUGAACCUAGCGAGGGAAAGAUAAGCACUCCGGCCGCAUCAGCUUCUG  
UAGCCAGUUUCCUGGAUCAUGCCCGGAACCAUUAAGGAAAACAUAUCUUC  
GGCGUGUCCUACGAUGAAUACCGCUACCGGUCCGUGAUCAAAGCCUGCCAGC  
UGGAAGAGGAUAUUUCAAGUUCGCGGAGAAAGAUACAUCGUGCUGGGCG  
AAGGGGGUAUUACCUUGUCGGGGGGCCAGCGGGCUAGAAUCUCGUCUGGCCAG  
AGCCGUGUAUAAGGACGCCGACCUGUAUCUCCUGGACUCCCCUUCGGAUAC

CUGGACGUCCUGACCGAAAAGGAGAUCUUCGAAUCGUGCGUGUGCAAGCUGA  
UGGCUAACAAGACUCGCAUCCUCGUGACCUCCAAAUGGAGCACCUGAAGAA  
GGCAGACAAGAUUCUGAUUCUGCAUGAGGGGUCCUCCUACUUUUACGGCACC  
UUCUCGGAGUUGCAGAACUUGCAGCCCGACUUCUCAUCGAAGCUGAUGGGUU  
GCGACAGCUUCGACCAGUUCUCCGCCGAAAGAAGGAACUCGAUCCUGACGGA  
AACCUUGCACCGCUUCUCUUUGGAAGGCGACGCCCCUGUGUCAUGGACCGAG  
ACUAAGAAGCAGAGCUUCAAGCAGACCGGGGAAUUCGGCGAAAAGAGGAAGA  
ACAGCAUCUUGAACCCCAUUAACUCCAUCCGCAAGUUCUCAAUUCGUGCAAAA  
GACGCCACUGCAGAUGAACGGCAUUGAGGAGGACUCCGACGAACCCCUUGAG  
AGGCGCCUGUCCCUGGUGCCGGACAGCGAGCAGGGAGAAGCCAUCCUGCCUC  
GGAUUUCCGUGAUCUCCACUGGUCCGACGCUCCAAGCCCGGCGGCGGCAGUC  
CGUGCUGAACCUUGAUGACCCACAGCGUGAACCAGGGCCAAAACAUCACCGC  
AAGACUACCGCAUCCACCCGGAAAGUGUCCCUGGCACCUCAAGCGAAUCUUA  
CCGAGCUCGACAUCUACUCCCGGAGACUGUCGCAGGAAACCGGGCUCGAAAU  
UCCGAAGAAAUCAACGAGGAGGAUCUGAAAGAGUGCUUCUUCGACGAUAUG  
GAGUCGAUACCCGCCGUGACGACUUGGAACACUUAUCUGCGGUACAUCACUG  
UGCACAAGUCAUUGAUCUUCGUGCUGAUUUGGUGCCUGGUGAUUUUCCUGGC  
CGAGGUCGCGGCCUCACUGGUGGUGCUCUGGCUGUUGGGAAACACGCCUCUG  
CAAGACAAGGGAAACUCCACGCACUCGAGAAACAACAGCUAUGCCGUGAUUA  
UCACUUCACCUCUUAUACGUGUUCUACAUCUACGUCGGAGUGGGCGGA  
UACCCUGCUCGCGAUGGGUUUCUUCAGAGGACUGCCGCUGGUCCACACCUUG  
AUCACCGUCAGCAAGAUUCUUCACCACAAGAUGUUGCAUAGCGUGCUGCAGG  
CCCCAUGUCCACCCUCAACACUCUGAAGGCCGGAGGCAUUCUGAACAGAUU  
CUCCAAGGACAUCGCUAUCUCCUGGACGAUCUCCUGCCGCUUACCAUCUUUGAC  
UUCAUCCAGCUGCUGCUGAUCGUGAUUGGAGCAAUCGCAGUGGUGGGCGGUGC  
UGCAGCCUUAUUAUUUCGUGGCCACUGUGCCGGUCAUUGUGGGCGUUAUCAU  
GCUGCGGGCCUACUUCUCCAAACCAGCCAGCAGCUGAAGCAACUGGAAUCC  
GAGGGACGAUCCCCAUCUUCACUCACCUUGUGACGUCGUUGAAGGGACUGU  
GGACCCUCCGGGCUUUCGGACGGCAGCCUACUUCGAAACCCUCUUCACAA  
GGCCUGAACCUCACACCGCCAAUUGGUUCCUGUACCUGUCCACCCUGCGGU  
GGUUCAGAUUGCAGCAUCGAGAUGAUUUUCGUCAUCUUCUUCAUUCGCGGUCAC  
AUUCAUCAGCAUCCUGACUACCGGAGAGGGAGAGGGACGGGUCGGAAUAAUC

CUGACCCUCGCCAUGAACAUU AUGAGCACCCUGCAGUGGGCAGUGAACAGCU  
 CGAUCGACGUGGACAGCCUGAUGCGAAGCGUCAGCCGCGUGUUCAAGUUCAU  
 CGACAUGCCUACUGAGGGAAAACCCACUAAGUCCACUAAGCCCUACAAAAU  
 GGCCAGCUGAGCAAGGUCAUGAUCUUCGAAAACUCCACGUGAAGAAGGACG  
 AUUUUUGGCCUCCGGAGGUCAAUGACCGUGAAGGACCUGACCGCAAAGUA  
 CACCGAGGGAGGAAACGCCAUUCUCGAAAACAUCAGCUUCUCCAUUUCGCCG  
 GGACAGCGGGUCGGCCUUCUCGGGCGGACCGGUUCCGGGAAGUCAACUCUGC  
 UGUCGGCUUUCUCCGGCUGCUGAAUACCGAGGGGGAAAUCCAAAUUGACGG  
 CGUGUCUUGGGAUUCCAUAUCUCUGCAGCAGUGGCGGAAGGCCUUCGGCGUG  
 AUCCCCAGAAGGUGUUCAUCUUCUCGGGUACCUUCCGGAAGAACCUGGAUC  
 CUUACGAGCAGUGGAGCGACCAAGAAAUCUGGAAGGUCGCCGACGAGGUCGG  
 CCUGCGCUCCGUGAUUGAACAAUUUCCUGGAAAGCUGGACUUCGUGCUCGUC  
 GACGGGGGAUGUGUCCUGUCGCACGGACAUAAGCAGCUC AUGUGCCUCGCAC  
 GGUCCGUGCUCUCCAAGGCCAAGAUUCUGCUGCUGGACGAACCUUCGGCCCA  
 CCUGGAUCCGGUCACCUACCAGAUC AU CAGGAGGACCCUGAAGCAGGCCUUU  
 GCCGAUUGCACCGUGAUUCUCUGCGAGCACCGCAUCGAGGCCAUGCUGGAGU  
 GCCAGCAGUUCUCCUGGUCAUCGAGGAGAACAAGGUCCGCCAAUACGACUCCA  
 UCAAAGCUCUCCAACGAGCGGUCGCUGUUCAGACAAGCUAUUUCACCGUCC  
 GAUAGAGUGAAGCUCUUCUCCGCAUCGGAACAGCUC AAAGUGCAA AU CGAAGC  
 CGCAGAUCGCAGCCUUGAAGGAAGAGACUGAGGAAGAGGUGCAGGACACCCG  
 GCUUUAACGGGUGGCAUCCUUGUGACCCCUCCCAUGGCCUCUCCUGGCCUUG  
 GAAGUUGCCACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAA AUUAAGUUGCA  
 UCAAGCU (SEQ ID NO: 7).

[0131] В другом примере ниже показана полноразмерная кодон-оптимизированная последовательность мРНК CFTR человека:

GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAAGAC  
 ACCGGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAU  
 UCCCCGUGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACGAUGCAACGCUCUCCUC  
 UUGAAAAGGCCUCGGUGGUGUCCAAGCUCUUCUUCUCGUGGACUAGACCCAU  
 CCUGAGAAAGGGGUACAGACAGCGCUUGGAGCUGUCCGAUAUCUAUCAAUUC  
 CCUUCGUGGACUCCGCGGACAACCUUGUCCGAGAAGCUCGAGAGAGAAUGGG  
 ACAGAGAACUCGCCUCAAGAAGAACC CGAAGCUGAUUAAUGCGCUUAGGCG

GUGCUUUUUCUGGCGGUUCAUGUUCUACGGCAUCUUCCUCUACCUUGGGAGAG  
GUCACCAAGGCCGUGCAGCCCCUGUUGCUGGGACGGAUUAUUGCCUCCUACG  
ACCCCGACAACAAGGAAGAAAGAAGCAUCGCUAUCUACUUGGGCAUCGGUCU  
GUGCCUGCUUUUCAUCGUCCGGACCCUCUUGUUGCAUCCUGCUAUUUUCGGC  
CUGCAUCACAUUGGCAUGCAGAUGAGAAUUGCCAUGUUUCCCUGAUCUACA  
AGAAAACUCUGAAGCUCUCGAGCCGCGUGCUUGACAAGAUUCCAUCGGCCA  
GCUCGUGUCCCUGCUCUCCAACAUCUGAACAAGUUCGACGAGGGCCUCGCC  
CUGGCCACUUCGUGUGGAUCGCCCCUCUGCAAGUGGGCGCUUCUGAUGGGCC  
UGAUCUGGGAGCUGCUGCAAGCCUCGGCAUUCUGUGGGCUUGGAUUCUGAU  
CGUGCUGGCACUGUUC CAGGCCGGACUGGGGCGGAUGAUGAUGAAGUACAGG  
GACCAGAGAGCCGGAAGAUUCCGAACGGCUGGUGAUCACUUCGGAAAUGA  
UCGAAAACAUC CAGUCAGUGAAGGCCUACUGCUGGGAAGAGGCCAUGGAAAA  
GAUGAUUGAAAACCUCCGGCAAACCGAGCUGAAGCUGACCCGCAAGGCCGCU  
UACGUGCGCUAUUUCAACUCGUCCGCUUUCUUCUUCUCCGGGUUCUUCGUGG  
UGUUUCUCUCCGUGCUCCCCUACGCCUGAUUAAGGGAAUCAUCCUCAGGAA  
GAUCUUCACCACCAUUUCCUUCUGUAUCGUGCUCCGCAUGGCCGUGACCCGG  
CAGUUCCCAUGGGCCGUGCAGACUUGGUACGACUCCUGGGAGCCAUAACA  
AGAUC CAGGACUUCUCAAAGCAGGAGUACAAGACCCUCGAGUACAACCU  
GACUACUACCGAGGUCGUGAUGGAAAACGUCACCGCCUUUUGGGAGGAGGGA  
UUUGGCGAACUGUUCGAGAAGGCCAAGCAGAACAACAACCGCAAGACCU  
CGAACGGUGACGACUCCUCUUCUUUCAAACUUCAGCCUGCUCGGGACGCC  
CGUGCUGAAGGACAUAACUUCAAGAUCGAAAGAGGACAGCUCCUGGGCGGUG  
GCCGGAUCGACCGGAGCCGGAAGACUUCUCCUGCUGAUGGUGAUAUGGGAG  
AGCUUGAACCUAGCGAGGGAAAGAUCAAGCACUCCGGCCGCAUCAGCUUCUG  
UAGCCAGUUUCCUGGAUCAUGCCCGGAACCAUUAAGGAAAACAUCAUCUUC  
GGCGUGUCCUACGAUGAAUACCGCUACCGGUCCGUGAUCAAAGCCUGCCAGC  
UGGAAGAGGAUAUUUCAAGUUCGCGGAGAAAGAUACAUCGUGCUGGGCG  
AAGGGGGUAUUACCUUGUCGGGGGGCCAGCGGGCUAGAAUCUCGCUGGCCAG  
AGCCGUGUAUAAGGACGCCGACCUGUAUCUCCUGGACUCCCCUUCGGAUAC  
CUGGACGUCCUGACCGAAAAGGAGAUUCUUCGAAUCGUGCGUGUGCAAGCUGA  
UGGCUAACAAGACUCGCAUCCUCGUGACCUCCAAAUGGAGCACCUGAAGAA  
GGCAGACAAGAUUCUGAUUCUGCAUGAGGGGUCCUCCUACUUUACGGCACC

UUCUCGGAGUUGCAGAACUUGCAGCCCGACUUCUCAUCGAAGCUGAUGGGUU  
GCGACAGCUUCGACCAGUUCUCCGCCGAAAGAAGGAACUCGAUCCUGACGGA  
AACCUUGCACCGCUUCUCUUUGGAAGGCGACGCCCCUGUGUCAUGGACCGAG  
ACUAAGAAGCAGAGCUUCAAGCAGACCGGGGAAUUCGGCGAAAAGAGGAAGA  
ACAGCAUCUUGAACCCCAUUAACUCCAUCCGCAAGUUCUCAAUUCGUGCAAAA  
GACGCCACUGCAGAUGAACGGCAUUGAGGAGGACUCCGACGAACCCCUUGAG  
AGGCGCCUGUCCCUGGUGCCGGACAGCGAGCAGGGAGAAGCCAUCCUGCCUC  
GGAUUUCGUGAUCUCCACUGGUCCGACGCUCCAAGCCCGGCGGCGGCAGUC  
CGUGCUGAACCUGAUGACCCACAGCGUGAACCAGGGCCAAAACAUCACCGC  
AAGACUACCGCAUCCACCCGGAAAGUGUCCCUGGCACCUCAAGCGAAUCUUA  
CCGAGCUCGACAUCUACUCCCGGAGACUGUCGCAGGAAACCGGGCUCGAAAU  
UUCGGAAGAAUCAACGAGGAGGAUCUGAAAGAGUGCUUCUUCGACGAUAUG  
GAGUCGAUACCCGCCGUGACGACUUGGAACACUUAUCUGCGGUACAUCACUG  
UGCACAAGUCAUUGAUCUUCGUGCUGAUUUGGUGCCUGGUGAUUUUCCUGGC  
CGAGGUCGCGGCCUCACUGGUGGUGCUCUGGCUGUUGGGAAACACGCCUCUG  
CAAGACAAGGGAAACUCCACGCACUCGAGAAACAACAGCUAUGCCGUGAUUA  
UCACUUCACCUCUUAUUAACGUGUUCUACAUCUACGUCGGAGUGGGCGGA  
UACCCUGCUCGCGAUGGGUUUCUUCAGAGGACUGCCGCUGGUCCACACCUUG  
AUCACCGUCAGCAAGAUUCUUCACCACAAGAUUGCAUAGCGUGCUGCAGG  
CCCCAUGUCCACCCUCAACACUCUGAAGGCCGGAGGCAUUCUGAACAGAUU  
CUCCAAGGACAUCGCUAUCUCCUGGACGAUCUCCUGCCGCUUACCAUCUUUGAC  
UUCAUCCAGCUGCUGCUGAUCGUGAUUGGAGCAAUCGCAGUGGUGGGCGGUGC  
UGCAGCCUUAUAUUUCGUGGGCCACUGUGCCGGUCAUUGUGGGCGUUAUCAU  
GCUGCGGGCCUACUUCUCCAAACCAGCCAGCAGCUGAAGCAACUGGAAUCC  
GAGGGACGAUCCCCCAUCUUCACUCACCUUGUGACGUCGUUGAAGGGACUGU  
GGACCCUCCGGGCUUUCGGACGGCAGCCUACUUCGAAACCCUCUUCACAA  
GGCCUGAACCUCCACACCGCCAAUUGGUUCCUGUACCUGUCCACCCUGCGGU  
GGUUCAGAU GCGCAUCGAGAUGAUUUUCGUCAUCUUCUUAUCGCGGUCAC  
AUUCAUCAGCAUCCUGACUACCGGAGAGGGAGAGGGACGGGUCGGAAUAAUC  
CUGACCCUCGCCAUGAACAUUAUGAGCACCCUGCAGUGGGCAGUGAACAGCU  
CGAUCGACGUGGACAGCCUGAUGCGAAGCGUCAGCCGCGUGUUCAAGUUCAU  
CGACAUGCCUACUGAGGGAAAACCCACUAAGUCCACUAAGCCCUACAAAAAU

GGCCAGCUGAGCAAGGUCAUGAUCAUCGAAAACUCCCACGUGAAGAAGGACG  
AUUUUUGGCCCUCCGGAGGUCAAAUGACCGUGAAGGACCUGACCGCAAAGUA  
CACCGAGGGAGGAAACGCCAUUCUCGAAAACAUCAGCUUCUCCAUUUCGCCG  
GGACAGCGGGUCGGCCUUCUCGGGCGGACCGGUUCCGGGAAGUCAACUCUGC  
UGUCGGCUUUCUCCGGCUGCUGAAUACCGAGGGGGAAAUCCAAUUGACGG  
CGUGUCUUGGGAUUCCAUAUCUCUGCAGCAGUGGCGGAAGGCCUUCGGCGUG  
AUCCCCCAGAAGGUGUUCAUCUUCUCGGGUACCUUCCGGAAGAACCUGGAUC  
CUUACGAGCAGUGGAGCGACCAAGAAAUCUGGAAGGUCGCCGACGAGGUCGG  
CCUGCGCUCCGUGAUUGAACA AUUUCUGGAAAGCUGGACUUCGUGCUCGUC  
GACGGGGGAUGUGUCCUGUCGCACGGACAUAAGCAGCUCAUGUGCCUCGCAC  
GGUCCGUGCUCUCCAAGGCCAAGAUUCUGCUGCUGGACGAACCUUCGGCCCA  
CCUGGAUCCGGUCACCUACCAGAUCAUCAGGAGGACCCUGAAGCAGGCCUUU  
GCCGAUUGCACCGUGAUUCUCUGCGAGCACCGCAUCGAGGCCAUGCUGGAGU  
GCCAGCAGUUCUGGUCAUCGAGGAGAACAAGGUCCGCCAAUACGACUCCA  
UCAAAAGCUCCUCAACGAGCGGUCGUGUUCAGACAAGCUAUUUCACCGUCC  
GAUAGAGUGAAGCUCUUCGCAUCGGAACAGCUCAAAGUGCAAUUCGAAGC  
CGCAGAUCGCAGCCUUGAAGGAAGAGACUGAGGAAGAGGUGCAGGACACCCG  
GCUUUAAGGGUGGCAUCCCUGUGACCCCUCCCAGUGCCUCUCCUGGCCCU  
GAAGUUGCCACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAA AUUAAAGUUGCA  
UCAAGCU (SEQ ID NO: 8).

[0132] В некоторых вариантах осуществления активность белков CFTR оценивают с помощью анализа в камере Уссинга. В некоторых вариантах осуществления продолжительность активности белков CFTR оценивают с помощью динамических анализов Уссинга. В некоторых вариантах осуществления экспрессию белка и его стабильность оценивают в способах с вытеснением метки. В некоторых вариантах осуществления экспрессию белка и его стабильность оценивают с помощью поверхностного биотинилирования.

[0133] В некоторых вариантах осуществления для получения мРНК по настоящему изобретению ДНК-матрицу транскрибируют *in vitro*. Подходящая ДНК-матрица обычно содержит промотор, например промотор для T3, T7 или SP6, для транскрипции *in vitro*, за которым следует необходимая нуклеотидная последовательность для необходимой мРНК и сигнал терминации.

**Оптимизация кодонов**

[0134] В соответствии с растущим количеством исследований мРНК содержат многочисленные слои информации, перекрывающие аминокислотный код.

Традиционно, оптимизация кодонов использовалась для удаления редких кодонов, которые, как считалось, ограничивали скорость экспрессии белка. В то время как быстрорастущие бактерии и дрожжи демонстрируют сильное предпочтение определенных кодонов в генах с высокой экспрессией, высшие эукариоты демонстрируют гораздо меньшее предпочтение определенных кодонов, что затрудняет распознавание кодонов, которые могут ограничивать скорость. Кроме того, было обнаружено, что предпочтение определенных кодонов *per se* не обязательно приводит к высокой экспрессии, но требует других характеристик.

[0135] Например, редкие кодоны вовлечены в замедление трансляции и формирование сайтов паузы, что может быть необходимо для правильной укладки белка. Следовательно, вариации в использовании кодонов могут обеспечить механизм для точной настройки временного паттерна элонгации и, таким образом, увеличить время, доступное белку для принятия его правильной конформации. Оптимизация кодонов может помешать этому механизму тонкой настройки, что приведет к менее эффективной трансляции белка или увеличению количества неправильно свернутых белков. Сходным образом, оптимизация кодонов может нарушать нормальную модель использования родственных и прецессионных тРНК, тем самым влияя на структуру и функцию белка, так как зависимое от прецессии замедление элонгации может быть также выбрано в качестве механизма для достижения правильной укладки белка.

[0136] В данной области техники известны различные способы оптимизации кодонов, однако каждый из них имеет существенные недостатки и ограничения с вычислительной и/или терапевтической точки зрения. В частности, известные способы оптимизации кодонов часто включают для каждой аминокислоты замену каждого кодона кодом, наиболее часто используемым для этой аминокислоты, так что «оптимизированная» последовательность содержит только один кодон, кодирующий каждую аминокислоту (поэтому такую последовательность можно назвать последовательностью один к одному). Увеличение экспрессии не

ограничивается клеточными культурами клеток млекопитающих, но также наблюдалось *in vivo* на мышинной модели. Ожидается, что наблюдаемое улучшение экспрессии кодон-оптимизированной кодирующей последовательности CFTR, либо CFTR дикого типа, либо активированного CFTR, приведет к улучшенной, более рентабельной заместительной терапии на основе мРНК для пациентов, нуждающихся в этом, поскольку она не требует использования модифицированных нуклеотидов для получения мРНК и позволяет проводить лечение уменьшенной дозой и/или с увеличенными интервалами введения доз.

[0137] В некоторых вариантах осуществления кодон-оптимизированную мРНК получают в соответствии со способами, известными в данной области техники.

[0138] В некоторых вариантах осуществления кодон-оптимизированные последовательности мРНК в соответствии с настоящим изобретением были дополнительно кодон-оптимизированы с помощью нового способа: в способе сначала генерируют перечень кодон-оптимизированных последовательностей, а затем к перечню применяются три фильтра. В частности, в нем применяют фильтр скрининга мотива, фильтр анализа содержания гуанина-цитозина (GC) и фильтр анализа индекса адаптации кодонов (CAI) для получения обновленного перечня оптимизированных нуклеотидных последовательностей. Обновленный список больше не включает нуклеотидные последовательности, содержащие признаки, которые, как ожидается, будут мешать эффективной транскрипции и/или трансляции кодируемого белкового антигена.

#### *Синтез мРНК с использованием РНК-полимеразы SP6*

[0139] В некоторых вариантах осуществления мРНК CFTR получают с использованием РНК-полимеразы SP6. РНК-полимераза SP6 представляет собой ДНК-зависимую РНК-полимеразу с высокой специфичностью последовательности для последовательностей с промотором для SP6. Полимераза SP6 катализирует синтез РНК в направлении 5'→3' *in vitro* либо на одноцепочечной ДНК, либо на двухцепочечной ДНК ниже своего промотора; она встраивает нативные рибонуклеотиды, и/или модифицированные рибонуклеотиды, и/или меченые рибонуклеотиды в полимеризуемый транскрипт. Примеры таких меченых

рибонуклеотидов включают нуклеотиды, меченные биотином, флуоресцеином, дигоксигенином, аминоаллилом и изотопом.

[0140] Последовательность РНК-полимеразы SP6 бактериофага была первоначально описана (GenBank: Y00105.1) как имеющая следующую аминокислотную последовательность:

MQDLHAIQLQLEEMFNNGGIRRFADQQRQIAAGSESDTAWNRRLLSELIAPMAEG  
IQAYKEEYEGKKGRAPRALAFLQCVENEVAA YITMKVVM DMLNTD AT LQAIAMS  
VAERIEDQVRFSKLEGHAAKYFEKVKKSLKASRTKSYRHAHNVA VVAEKSVAEKD  
ADFDRWEAWPKETQLQIGTTLLEILEGSVFYNGEPVFM RAMRTYGGKTIYYLQTSE  
SVGQWISAFKEHVAQLSPAYAPCVIPRPWRTPFNNGGFHTEKVASRIRLVKGNREH  
VRKLTQKQMPKVYKAINALQNTQWQINKDVLA VIEEVIRLDLGYGVPSFKPLIDKE  
NKPANPVPVEFQHRLRGRELKEMLSPEWQQFINWKGE CARLYTAETKRGSKSAAV  
VRMVGQARKYSAFESIYFVYAMDSRSRVYVQSSTLSPQSNDLGKALLRFTEGRPVN  
GVEALKWFCINGANLWGWDKKTDFVRSNVLDEEFQDMCRDIAADPLTFTQWAK  
ADAPYEFLAWCFEYAQYLDLVDEGRADEFRTHLPVHQDGSCSGIQHYSAMLRDEV  
GAKAVNLKPSDAPQDIYGAVAQVVIKKNALYMDADDATTFTSGSVTLSGTEL RAM  
ASAWDSIGITRSLTKKPVMTLPYGSTRLTCRESVIDYIVDLEEKEAQKAVAEGRTAN  
KVHPFEDDRQDYLTPGAAYNYMTALIWPSISEVVKAPIVAMKMIRQLARFAAKRN  
EGLMYTLPTGFILEQKIMATEMLRVRTCLMGDIKMSLQVETDIVDEAAMMGAAAP  
NFVHGH DASHLILTVCELVDKGVTSIAVIHDSFGTHADNTLTLRVALKGQM VAMYI  
DGNALQKLL EENEVRWMVDTGIEVPEQGEFDLNEIMDSEYVFA (SEQ ID NO: 9).

[0141] РНК-полимераза SP6, подходящая для настоящего изобретения, может представлять собой любой фермент, обладающий практически такой же полимеразной активностью, что и РНК-полимераза SP6 бактериофага. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления РНК-полимеразу SP6, подходящую для настоящего изобретения, можно получить путем модификации из SEQ ID NO: 9. Например, подходящая РНК-полимераза SP6 может содержать одну или более аминокислотных замен, делеций или добавлений. В некоторых вариантах осуществления подходящая РНК-полимераза SP6 имеет аминокислотную последовательность, которая на приблизительно 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 75%, 70%, 65% или 60% идентична или гомологична SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах

осуществления подходящая РНК-полимераза SP6 может представлять собой усеченный белок (с N-конца, C-конца или внутри), но сохранять полимеразную активность. В некоторых вариантах осуществления подходящая РНК-полимераза SP6 представляет собой слитый белок.

[0142] РНК-полимераза SP6, подходящая для настоящего изобретения, может представлять собой коммерчески доступный продукт, например, от Aldevron, Ambion, New England Biolabs (NEB), Promega и Roche. SP6 может быть заказана и/или специально разработана из коммерческого или некоммерческого источника в соответствии с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9 или вариантом SEQ ID NO: 9, как описано в данном документе. SP6 может представлять собой полимеразу со стандартным уровнем точности или может представлять собой полимеразу с высоким уровнем точности/высокой эффективностью/высокой емкостью, которая была модифицирована для повышения активности РНК-полимеразы, например, посредством мутаций в гене РНК-полимеразы SP6 или посттрансляционных модификаций самой РНК-полимеразы SP6. Примеры таких модифицированных SP6 включают SP6 RNA Polymerase-Plus™ от Ambion, HiScribe SP6 от NEB и систем RiboMAX™ и Riboprobe® от Promega.

[0143] В некоторых вариантах осуществления подходящая РНК-полимераза SP6 представляет собой слитый белок. Например, РНК-полимераза SP6 может включать одну или более меток, способствующих выделению, очистке или растворимости фермента. Подходящая метка может быть расположена на N-конце, C-конце и/или внутри. Неограничивающие примеры подходящей метки включают кальмодулин-связывающий белок (CBP); антиген 8-кДа *Fasciola hepatica* (Fh8); пептид, представляющий собой метку FLAG; глутатион-S-трансферазу (GST); гистидиновую метку (например, гексагистидиновую метку (His6)); белок, связывающий мальтозу (MBP); вещество, используемое с белком N (NusA); метку, присоединяемую путем слияния, представляющую собой малый убиквитин-подобный модификатор (SUMO); стрептавидин-связывающий пептид (STREP); метку для тандемной аффинной очистки (TAP) и тиоредоксин (TrxA). В настоящем изобретении могут использоваться другие метки. Эти и другие метки, присоединяемые путем слияния, были описаны, например, Costa et al. *Frontiers in Microbiology* 5 (2014): 63 и в PCT/US16/57044, содержание которых включено в данный документ посредством

ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления His-метка расположена на N-конце SP6.

*Промотор для SP6*

[0144] В настоящем изобретении можно использовать любой промотор, который может быть распознан РНК-полимеразой SP6. Обычно промотор для SP6 содержит 5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3' (SEQ ID NO: 10). Были обнаружены и/или созданы варианты промотора для SP6 для оптимизации распознавания и/или связывания SP6 с его промотором. Неограничивающие варианты включают без ограничения: 5'-ATTTAGGGGACACTATAGAAGAG-3'; 5'-ATTTAGGGGACACTATAGAAGG-3'; 5'-ATTTAGGGGACACTATAGAAGGG-3'; 5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3'; 5'-ATTTAGGTGACACTATAGAAGA-3'; 5'-ATTTAGGTGACACTATAGAAGAG-3'; 5'-ATTTAGGTGACACTATAGAAGG-3'; 5'-ATTTAGGTGACACTATAGAAGGG-3'; 5'-ATTTAGGTGACACTATAGAAGNG-3' и 5'-CATACGATTTAGGTGACACTATAG-3' (SEQ ID NO: 11 - SEQ ID NO: 20).

[0145] Кроме того, подходящий промотор для SP6 для настоящего изобретения может быть на приблизительно 95%, 90%, 85%, 80%, 75% или 70% идентичным или гомологичным любой из SEQ ID NO: 10 — SEQ ID NO: 20. Более того, промотор для SP6, применимый для настоящего изобретения, может содержать один или более дополнительных нуклеотидов на 5'- и/или 3'-конце любой из промоторных последовательностей, описанных в данном документе.

*ДНК-матрица*

[0146] Обычно ДНК-матрица CFTR является либо полностью двухцепочечной, либо в основном одноцепочечной с двухцепочечной последовательностью промотора для SP6.

[0147] Линеаризованная плазмидная ДНК (линеаризованная с помощью одного или более рестрикционных ферментов), линеаризованные фрагменты геномной ДНК (с помощью рестрикционных ферментов и/или физических средств), продукты ПЦР и/или синтетические олигонуклеотиды ДНК могут использоваться в качестве матриц для транскрипции *in vitro* с помощью SP6 при условии, что они содержат двухцепочечный промотор для SP6 выше (и в правильной ориентации) транскрибируемой последовательности ДНК.

[0148] В некоторых вариантах осуществления линеаризованная ДНК-матрица имеет тупой конец.

[0149] В некоторых вариантах осуществления транскрибируемая последовательность ДНК может быть оптимизирована для облегчения более эффективной транскрипции и/или трансляции. Например, последовательность ДНК может быть оптимизирована в отношении цис-регуляторных элементов (например, ТАТА-бокса, сигналов терминации и сайтов связывания белка), сайтов искусственной рекомбинации, *chi*-сайтов, содержания динуклеотидов CpG, отсутствия CpG-островков, содержания GC, сайтов проскальзывания полимеразы и/или других элементов, имеющих отношение к транскрипции; последовательность ДНК может быть оптимизирована в отношении криптоических сайтов сплайсинга, вторичной структуры мРНК, стабильной свободной энергии мРНК, повторяющихся последовательностей, мотива нестабильности РНК и/или других элементов, имеющих отношение к процессингу и стабильности мРНК; последовательность ДНК может быть оптимизирована в отношении смещения предпочтительного использования определенных кодонов, адаптируемости кодонов, внутренних *chi*-сайтов, сайтов связывания рибосом (например, IRES), ранних сайтов поли(А), последовательностей Шайна-Дальгарно (SD) и/или других элементов, имеющих отношение к трансляции; и/или последовательность ДНК может быть оптимизирована в отношении контекста кодона, взаимодействия кодон-антикодон, сайтов паузы трансляции и/или других элементов, имеющих отношение к укладке белка. В настоящем изобретении можно использовать способы оптимизации, известные в данной области техники, например GeneOptimizer от ThermoFisher и OptimumGene™, которые описаны в заявке на патент США № 20110081708, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0150] В некоторых вариантах осуществления ДНК-матрица содержит 5'- и/или 3'-нетранслируемую область. В некоторых вариантах осуществления 5'-нетранслируемая область содержит один или более элементов, которые влияют на стабильность или трансляцию мРНК, например железозависимый элемент. В некоторых вариантах осуществления длина 5'-нетранслируемой области может составлять от приблизительно 50 до 500 нуклеотидов.

[0151] В некоторых вариантах осуществления 3'-нетранслируемая область содержит один или более из сигнала полиаденилирования, сайта связывания для белков, которые влияют на стабильность или местоположение мРНК в клетке, или одного или более сайтов связывания для miRNA. В некоторых вариантах осуществления длина 3'-нетранслируемой области может составлять от 50 до 500 нуклеотидов или больше.

[0152] Иллюстративные последовательности 3'- и/или 5'-UTR могут быть получены из молекул мРНК, которые являются стабильными (например, глобин, актин, GAPDH, тубулин, гистон или ферменты цикла лимонной кислоты) для повышения стабильности молекулы смысловой мРНК. Например, последовательность 5'-UTR может включать частичную последовательность гена немедленно-раннего белка 1 (IE1) CMV или его фрагмент для повышения устойчивости к нуклеазам и/или обеспечения улучшения в отношении периода полувыведения полинуклеотида. Также предполагается включение последовательности, кодирующей гормон роста человека (hGH), или ее фрагмента с 3'-конца или нетранслируемой области полинуклеотида (например, мРНК) для дополнительной стабилизации полинуклеотида. Как правило, эти модификации обеспечивают улучшение стабильности и/или фармакокинетических свойств (например, периода полувыведения) полинуклеотида по сравнению с его немодифицированными аналогами и включают, например, модификации, осуществленные для улучшения устойчивости таких полинуклеотидов к расщеплению нуклеазами *in vivo*.

#### *Крупномасштабный синтез мРНК*

[0153] Настоящее изобретение относится к крупномасштабному получению кодон-оптимизированной мРНК CFTR. В некоторых вариантах осуществления в способе по настоящему изобретению синтезируют мРНК из расчета по меньшей мере 100 мг, 150 мг, 200 мг, 300 мг, 400 мг, 500 мг, 600 мг, 700 мг, 800 мг, 900 мг, 1 г, 5 г, 10 г, 25 г, 50 г, 75 г, 100 г, 250 г, 500 г, 750 г, 1 кг, 5 кг, 10 кг, 50 кг, 100 кг, 1000 кг и более на одну партию. Используемый в данном документе термин «партия» относится к величине или количеству мРНК, синтезированному за один раз, например, полученному в соответствии с одними производственными условиями.

Партия может относиться к количеству мРНК, синтезированному в одной реакции, которая происходит с помощью одной аликвоты фермента и/или одной аликвоты ДНК-матрицы для непрерывного синтеза при одном наборе условий. мРНК, синтезированная в одной партии, не будет включать мРНК, синтезированную в разное время, которую объединяют для достижения необходимого количества. Как правило, реакционная смесь содержит РНК-полимеразу SP6, линейную ДНК-матрицу и реакционный буфер для РНК-полимеразы (который может содержать рибонуклеотиды или может требовать добавления рибонуклеотидов).

[0154] В соответствии с настоящим изобретением обычно используют 1—100 мг полимеразы SP6 на грамм (г) полученной мРНК. В некоторых вариантах осуществления приблизительно 1—90 мг, 1—80 мг, 1—60 мг, 1—50 мг, 1—40 мг, 10—100 мг, 10—80 мг, 10—60 мг, 10—50 мг полимеразы SP6 используют на грамм полученной мРНК. В некоторых вариантах осуществления приблизительно 5—20 мг полимеразы SP6 используют для получения приблизительно 1 грамма мРНК. В некоторых вариантах осуществления от приблизительно 0,5 до 2 граммов полимеразы SP6 используют для получения приблизительно 100 граммов мРНК. В некоторых вариантах осуществления от приблизительно 5 до 20 граммов полимеразы SP6 используют для приблизительно 1 килограмма мРНК. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 5 мг полимеразы SP6 используют для получения по меньшей мере 1 грамма мРНК. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 500 мг полимеразы SP6 используют для получения по меньшей мере 100 граммов мРНК. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 5 граммов полимеразы SP6 используют для получения по меньшей мере 1 килограмма мРНК. В некоторых вариантах осуществления приблизительно 10 мг, 20 мг, 30 мг, 40 мг, 50 мг, 60 мг, 70 мг, 80 мг, 90 мг или 100 мг плазмидной ДНК используют на грамм полученной мРНК. В некоторых вариантах осуществления приблизительно 10—30 мг плазмидной ДНК используют для получения приблизительно 1 грамма мРНК. В некоторых вариантах осуществления приблизительно 1—3 грамма плазмидной ДНК используют для получения приблизительно 100 граммов мРНК. В некоторых вариантах осуществления приблизительно 10—30 граммов плазмидной ДНК используют для приблизительно 1 килограмма мРНК. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10 мг плазмидной ДНК используют для получения

по меньшей мере 1 грамм мРНК. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 1 грамм плазмидной ДНК используют для получения по меньшей мере 100 граммов мРНК. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10 граммов плазмидной ДНК используют для получения по меньшей мере 1 килограмма мРНК.

[0155] В некоторых вариантах осуществления концентрация РНК-полимеразы SP6 в реакционной смеси может составлять от приблизительно 1 до 100 нМ, от 1 до 90 нМ, от 1 до 80 нМ, от 1 до 70 нМ, от 1 до 60 нМ, от 1 до 50 нМ, от 1 до 40 нМ, от 1 до 30 нМ, от 1 до 20 нМ или от приблизительно 1 до 10 нМ. В определенных вариантах осуществления концентрация РНК-полимеразы SP6 составляет от приблизительно 10 до 50 нМ, от 20 до 50 нМ или от 30 до 50 нМ. РНК-полимеразу SP6 можно использовать в концентрации от 100 до 10000 ЕД/мл, например, можно использовать концентрации от 100 до 9000 ЕД/мл, от 100 до 8000 ЕД/мл, от 100 до 7000 ЕД/мл, от 100 до 6000 ЕД/мл, от 100 до 5000 ЕД/мл, от 100 до 1000 ЕД/мл, от 200 до 2000 ЕД/мл, от 500 до 1000 ЕД/мл, от 500 до 2000 ЕД/мл, от 500 до 3000 ЕД/мл, от 500 до 4000 ЕД/мл, от 500 до 5000 ЕД/мл, от 500 до 6000 ЕД/мл, от 1000 до 7500 ЕД/мл и от 2500 до 5000 ЕД/мл.

[0156] Концентрация каждого рибонуклеотида (*например*, АТФ, УТФ, ГТФ и ЦТФ) в реакционной смеси составляет от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 10 мМ, *например*, от приблизительно 1 мМ до приблизительно 10 мМ, от приблизительно 2 мМ до приблизительно 10 мМ, от приблизительно 3 мМ до приблизительно 10 мМ, от приблизительно 1 мМ до приблизительно 8 мМ, от приблизительно 1 мМ до приблизительно 6 мМ, от приблизительно 3 мМ до приблизительно 10 мМ, от приблизительно 3 мМ до приблизительно 8 мМ, от приблизительно 3 мМ до приблизительно 6 мМ, от приблизительно 4 мМ до приблизительно 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация каждого рибонуклеотида в реакционной смеси составляет приблизительно 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления общая концентрация гNTP (*например*, АТФ, ГТФ, ЦТФ и УТФ вместе), используемых в реакции, находится в диапазоне от 1 мМ до 40 мМ. В некоторых вариантах осуществления общая концентрация гNTP (*например*, АТФ, ГТФ, ЦТФ и УТФ вместе), используемых в реакции, находится в диапазоне от 1 мМ до 30 мМ, или от 1 мМ до 28 мМ, или от 1 мМ до 25 мМ, или от 1 мМ до 20 мМ. В некоторых вариантах осуществления общая концентрация гNTP составляет менее

30 мМ. В некоторых вариантах осуществления общая концентрация гНТФ составляет менее 25 мМ. В некоторых вариантах осуществления общая концентрация гНТФ составляет менее 20 мМ. В некоторых вариантах осуществления общая концентрация гНТФ составляет менее 15 мМ. В некоторых вариантах осуществления общая концентрация гНТФ составляет менее 10 мМ.

[0157] Реакционный буфер для РНК-полимеразы обычно содержит соль/буферное средство, *например* Tris, HEPES, сульфат аммония, бикарбонат натрия, цитрат натрия, ацетат натрия, фосфат калия, фосфат натрия, хлорид натрия и хлорид магния.

[0158] Значение рН реакционной смеси может составлять от приблизительно 6 до 8,5, от 6,5 до 8,0, от 7,0 до 7,5, а в некоторых вариантах осуществления значение рН составляет 7,5.

[0159] Линейную или линеаризованную ДНК-матрицу (*например*, как описано выше и в количестве/концентрации, достаточных для получения необходимого количества РНК), реакционный буфер для РНК-полимеразы и РНК-полимеразу SP6 объединяют с образованием реакционной смеси. Реакционную смесь инкубируют при температуре от приблизительно 37°C до приблизительно 42°C в течение от тридцати минут до шести часов, *например* от приблизительно шестидесяти до приблизительно девяноста минут.

[0160] В некоторых вариантах осуществления приблизительно 5 мМ НТФ, приблизительно 0,05 мг/мл полимеразы SP6 и приблизительно 0,1 мг/мл ДНК-матрицы в подходящем реакционном буфере для РНК-полимеразы (рН конечной реакционной смеси составляет приблизительно 7,5) инкубируют при температуре от приблизительно 37°C до приблизительно 42°C в течение шестидесяти-девяноста минут.

[0161] В некоторых вариантах осуществления реакционная смесь содержит линеаризованную двухцепочечную ДНК-матрицу со специфичным для полимеразы SP6 промотором, РНК-полимеразой SP6, ингибитором РНКазы, пирофосфатазой, 29 мМ НТФ, 10 мМ DTT и реакционным буфером (при 10-кратной концентрации: 800 мМ HEPES, 20 мМ спермидина, 250 мМ MgCl<sub>2</sub>, рН 7,7) и с водой, не содержащей РНКаз, при величине, достаточной (QS) для получения необходимого реакционного

объема; затем эту реакционную смесь инкубируют при температуре 37°C в течение 60 минут. Затем полимеразную реакцию гасят посредством добавления ДНКазы I и буфера для ДНКазы I (при 10-кратной концентрации: 100 мМ Tris-HCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub> и 25 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,6) для облегчения расщепления двухцепочечной ДНК-матрицы при подготовке к очистке. Было показано, что этого варианта осуществления достаточно для получения 100 граммов мРНК.

[0162] В некоторых вариантах осуществления реакционная смесь содержит NTP в концентрации, находящейся в диапазоне 1—10 мМ, ДНК-матрицу в концентрации, находящейся в диапазоне 0,01—0,5 мг/мл, и РНК-полимеразу SP6 в концентрации, находящейся в диапазоне 0,01—0,1 мг/мл, *например*, реакционная смесь содержит NTP в концентрации 5 мМ, ДНК-матрицу в концентрации 0,1 мг/мл и РНК-полимеразу SP6 в концентрации 0,05 мг/мл.

#### *Нуклеотиды*

[0163] Различные встречающиеся в природе или модифицированные нуклеозиды можно использовать для получения мРНК в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления мРНК представляет собой или содержит природные нуклеозиды (*например*, аденозин, гуанозин, цитидин, уридин); аналоги нуклеозидов (*например*, 2-аминоаденозин, 2-тиотимидин, инозин, пирролопиримидин, 3-метиладенозин, 5-метилцитидин, C5-пропинилцитидин, C5-пропинилуридин, 2-аминоаденозин, C5-бромурин, C5-фторурин, C5-йодурин, C5-пропинилуридин, C5-пропинилцитидин, C5-метилцитидин, 2-аминоаденозин, 7-дезаааденозин, 7-дезаагуанозин, 8-оксоаденозин, 8-оксогуанозин, O(6)-метилгуанин, псевдоурин, (*например*, N-1-метил-псевдоурин), 2-тиоурин и 2-тиоцитидин); химически модифицированные основания; биологически модифицированные основания (*например*, метилированные основания); интеркалированные основания; модифицированные сахара (*например*, 2'-фторрибозу, рибозу, 2'-дезоксирибозу, арабинозу и гексозу) и/или модифицированные фосфатные группы (*например*, фосфоротиоаты и 5'-N-фосфорамидитные связи).

[0164] В некоторых вариантах осуществления мРНК предусматривает один или более нестандартных нуклеотидных остатков. Нестандартные нуклеотидные остатки могут включать, *например*, 5-метилцитидин («5mC»), псевдоурин («ψU») и/или 2-

тиоуридин («2sU»). Обсуждение таких остатков и их включения в мРНК см., например, в патенте США № 8278036 или WO2011012316. мРНК может представлять собой РНК, которая определяется как РНК, в которой 25% остатков U представляют собой 2-тиоуридин, а 25% остатков C представляют собой 5-метилцитидин. Указания по применению РНК раскрыты в публикации патента США US20120195936 и международной публикации WO2011012316, обе из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Наличие нестандартных нуклеотидных остатков может сделать мРНК более стабильной и/или менее иммуногенной, чем контрольная мРНК с той же последовательностью, но содержащая только стандартные остатки. В дополнительных вариантах осуществления мРНК может содержать один или более нестандартных нуклеотидных остатков, выбранных из изоцитозина, псевдоизоцитозина, 5-бромурацила, 5-пропинилурацила, 6-аминопурина, 2-аминопурина, инозина, диаминопурина и 2-хлор-6-аминопуриноцитозина, а также комбинаций этих модификаций и других модификаций азотистых оснований. Некоторые варианты осуществления могут также предусматривать дополнительные модификации фуранозного кольца или азотистого основания. Дополнительные модификации могут включать, например, модификации или замены сахаров (*например*, одно или более из модификации 2'-О-алкила, закрытой нуклеиновой кислоты (LNA)). В некоторых вариантах осуществления РНК могут образовывать комплексы или гибридизоваться с дополнительными полинуклеотидами и/или пептидными полинуклеотидами (PNA). В некоторых вариантах осуществления, где модификация сахара представляет собой 2'-О-алкильную модификацию, такая модификация может включать без ограничения 2'-дезоксидезокси-2'-фтормодификацию, 2'-О-метильную модификацию, 2'-О-метоксиэтильную модификацию и 2'-дезоксимодификацию. В некоторых вариантах осуществления любая из этих модификаций может присутствовать в 0-100% нуклеотидов, например в более чем 0%, 1%, 10%, 25%, 50%, 75%, 85%, 90%, 95% или в 100% входящих в состав нуклеотидов по отдельности или в комбинации.

#### *Постсинтетический процессинг*

[0165] Как правило, после синтеза может быть добавлен 5'-кэп и/или 3'-хвост. Присутствие кэпа важно для обеспечения устойчивости к нуклеазам,

обнаруживаемым в большинстве эукариотических клеток. Присутствие «хвоста» служит для защиты мРНК от разрушения под действием экзонуклеаз.

[0166] 5'-кэп обычно добавляют следующим образом: сначала концевая РНК-фосфатаза удаляет одну из концевых фосфатных групп из 5'-нуклеотида, оставляя два концевых фосфата, затем гуанозинтрифосфат (ГТФ) добавляется к концевым фосфатам гуанилилтрансферазой, образуя 5',5',5-трифосфатную связь; а затем атом азота в положении 7 гуанина метилируется метилтрансферазой. Примеры кэп-структур включают без ограничения m<sup>7</sup>G(5')ppp(5'(A,G(5')ppp(5')A и G(5')ppp(5')G. Дополнительные кэп-структуры описаны в опубликованной заявке на патент США № US 2016/0032356 и предварительной заявке на патент США № 62/464327, поданной 27 февраля 2017 г., которые включены в данный документ посредством ссылки.

[0167] Как правило, хвостовая структура включает поли(А)- и/или поли(С)-хвост. Поли(А)- или поли(С)-хвост на 3'-конце мРНК обычно содержит по меньшей мере 50 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, по меньшей мере 150 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, по меньшей мере 200 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, по меньшей мере 250 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, по меньшей мере 300 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, по меньшей мере 350 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, по меньшей мере 400 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, по меньшей мере 450 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, по меньшей мере 500 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, по меньшей мере 550 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, по меньшей мере 600 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, по меньшей мере 650 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, по меньшей мере 700 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, по меньшей мере 750 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, по меньшей мере 800 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, по меньшей мере 850 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, по меньшей мере 900 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, по меньшей мере 950 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, или по меньшей мере 1 т. о. аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов соответственно. В некоторых вариантах осуществления поли(А)- или поли(С)-хвост может составлять приблизительно 10—800 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов (например, приблизительно 10—200 аденозиновых

или цитозиновых нуклеотидов, приблизительно 10—300 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, приблизительно 10—400 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, приблизительно 10—500 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, приблизительно 10—550 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, приблизительно 10—600 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, приблизительно 50—600 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, приблизительно 100—600 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, приблизительно 150—600 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, приблизительно 200—600 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, приблизительно 250—600 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, приблизительно 300—600 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, приблизительно 350—600 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, приблизительно 400—600 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, приблизительно 450—600 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, приблизительно 500—600 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, приблизительно 10—150 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, приблизительно 10—100 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов, приблизительно 20—70 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов или приблизительно 20—60 аденозиновых или цитозиновых нуклеотидов) соответственно. В некоторых вариантах осуществления хвостовая структура предусматривает комбинацию поли(А)- и поли(С)-хвостов различной длины, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления хвостовая структура содержит по меньшей мере 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аденозиновых нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления хвостовая структура содержит по меньшей мере 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% цитозиновых нуклеотидов.

[0168] Как описано в данном документе, добавление 5'-кэпа и/или 3'-хвоста облегчает выявление abortивных транскриптов, образованных во время синтеза *in vitro*, потому что без кэпирования и/или присоединения хвоста размер этих преждевременно прерванных транскриптов мРНК может быть слишком мал, чтобы быть выявленным. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления 5'-кэп

и/или 3'-хвост добавляют к синтезированной мРНК перед испытанием мРНК в отношении чистоты (например, уровень абортивных транскриптов, присутствующих в мРНК). В некоторых вариантах осуществления 5'-кэп и/или 3'-хвост добавляют к синтезированной мРНК перед очисткой мРНК, как описано в данном документе. В других вариантах осуществления 5'-кэп и/или 3'-хвост добавляют к синтезированной мРНК после очистки мРНК, как описано в данном документе.

[0169] мРНК, синтезированную в соответствии с настоящим изобретением, можно использовать без дополнительной очистки. В частности, мРНК, синтезированную в соответствии с настоящим изобретением, можно использовать без стадии удаления укороченных версий. В некоторых вариантах осуществления мРНК, синтезированную в соответствии с настоящим изобретением, можно дополнительно очищать. Для очистки мРНК, синтезированной в соответствии с настоящим изобретением, можно использовать различные способы. Например, очистку мРНК можно проводить с использованием способов на основе центрифугирования, фильтрации и/или хроматографии. В некоторых вариантах осуществления синтезированную мРНК очищают с помощью осаждения этанолом, или фильтрования, или хроматографии, или очистки в геле, или любым другим подходящим способом. В некоторых вариантах осуществления мРНК очищают с помощью HPLC. В некоторых вариантах осуществления мРНК экстрагируют стандартным раствором фенол:хлороформ:изоамиловый спирт, хорошо известным специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления мРНК очищают с использованием фильтрации в тангенциальном потоке. Подходящие способы очистки включают способы, описанные в US 2016/0040154, US 2015/0376220, заявке согласно PCT PCT/US18/19954, озаглавленной «METHODS FOR PURIFICATION OF MESSENGER RNA», поданной 27 февраля 2018 г., и заявке согласно PCT PCT/US18/19978, озаглавленной «METHODS FOR PURIFICATION OF MESSENGER RNA» поданной 27 февраля 2018 г., все из которых включены в данный документ посредством ссылки и могут быть использованы для практического применения настоящего изобретения.

[0170] В некоторых вариантах осуществления мРНК очищают до кэпирования и присоединения хвоста. В некоторых вариантах осуществления мРНК очищают после

кэпирования и присоединения хвоста. В некоторых вариантах осуществления мРНК очищают как до кэпирования и присоединения хвоста, так и после этого.

[0171] В некоторых вариантах осуществления мРНК очищают либо до кэпирования и присоединения хвоста, либо после, либо и до и после этого с помощью центрифугирования.

[0172] В некоторых вариантах осуществления мРНК очищают либо до кэпирования и присоединения хвоста, либо после, либо и до и после этого с помощью фильтрации.

[0173] В некоторых вариантах осуществления мРНК очищают либо до кэпирования и присоединения хвоста, либо после, либо и до и после этого с помощью фильтрации в тангенциальном потоке (TFF).

[0174] В некоторых вариантах осуществления мРНК очищают либо до кэпирования и присоединения хвоста, либо после, либо и до и после этого с помощью хроматографии.

#### *Определение характеристик мРНК*

[0175] Полноразмерные или абортивные транскрипты мРНК могут быть выявлены и количественно определены с использованием любых способов, доступных в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления синтезированные молекулы мРНК выявляют с помощью блоттинга, капиллярного электрофореза, хроматографии, флуоресценции, гель-электрофореза, HPLC, окрашивания серебром, спектроскопии, ультрафиолетового (УФ) излучения или UPLC или их комбинации. Другие способы выявления, известные в данной области техники, включены в настоящее изобретение. В некоторых вариантах осуществления синтезированные молекулы мРНК выявляют с помощью УФ-спектроскопии поглощения с разделением методом капиллярного электрофореза. В некоторых вариантах осуществления мРНК сначала денатурируют с помощью красителя с глиоксалем перед гель-электрофорезом («гель-электрофорез с денатурацией глиоксалем»). В некоторых вариантах осуществления определяют характеристики синтезированной мРНК перед кэпированием или присоединением хвоста. В некоторых вариантах осуществления определяют характеристики синтезированной мРНК после кэпирования или присоединения хвоста.

[0176] В некоторых вариантах осуществления мРНК, полученная посредством способа, раскрытого в данном документе, содержит менее чем 10%, менее чем 9%, менее чем 8%, менее чем 7%, менее чем 6%, менее чем 5%, менее чем 4%, менее чем 3%, менее чем 2%, менее чем 1%, менее чем 0,5% и/или менее чем 0,1% примесей, отличных от полноразмерной мРНК. Примеси включают загрязняющие вещества, образующиеся при IVT, например белки, ферменты, свободные нуклеотиды и/или укороченные версии.

[0177] В некоторых вариантах осуществления мРНК, полученная в соответствии с настоящим изобретением, практически не содержит укороченных версий или abortивных транскриптов. В частности, мРНК, полученная в соответствии с настоящим изобретением, содержит неопределяемый с помощью капиллярного электрофореза или гель-электрофореза с денатурацией глиоксалем уровень укороченных версий или abortивных транскриптов. Используемые в данном документе термины «укороченные версии» или «abortивные транскрипты» относятся к любым транскриптам, длина которых меньше полноразмерной длины. В некоторых вариантах осуществления длина «укороченных версий» или «abortивных транскриптов» составляет менее чем 100 нуклеотидов, менее чем 90 нуклеотидов, менее чем 80 нуклеотидов, менее чем 70 нуклеотидов, менее чем 60 нуклеотидов, менее чем 50 нуклеотидов, менее чем 40 нуклеотидов, менее чем 30 нуклеотидов, менее чем 20 нуклеотидов или менее чем 10 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления укороченные версии выявляют или подвергают количественному определению после добавления 5'-кэпа и/или 3'-поли(А)-хвоста.

#### *Раствор мРНК*

[0178] В некоторых вариантах осуществления мРНК может быть предоставлена в растворе для обеспечения смешивания с раствором липидов, таким образом, чтобы мРНК могла быть инкапсулирована в липидные наночастицы. Подходящий раствор мРНК может представлять собой любой водный раствор, содержащий мРНК, подлежащую инкапсулированию, в различных концентрациях. Например, подходящий раствор мРНК может содержать мРНК в концентрации, составляющей приблизительно 0,01 мг/мл, 0,05 мг/мл, 0,06 мг/мл, 0,07 мг/мл, 0,08 мг/мл, 0,09 мг/мл, 0,1 мг/мл, 0,15 мг/мл, 0,2 мг/мл, 0,3 мг/мл, 0,4 мг/мл, 0,5 мг/мл, 0,6 мг/мл, 0,7 мг/мл,

0,8 мг/мл, 0,9 мг/мл или 1,0 мг/мл или больше. В некоторых вариантах осуществления подходящий раствор мРНК может содержать мРНК в концентрации, находящейся в диапазоне приблизительно 0,01—1,0 мг/мл, 0,01—0,9 мг/мл, 0,01—0,8 мг/мл, 0,01—0,7 мг/мл, 0,01—0,6 мг/мл, 0,01—0,5 мг/мл, 0,01—0,4 мг/мл, 0,01—0,3 мг/мл, 0,01—0,2 мг/мл, 0,01—0,1 мг/мл, 0,05—1,0 мг/мл, 0,05—0,9 мг/мл, 0,05—0,8 мг/мл, 0,05—0,7 мг/мл, 0,05—0,6 мг/мл, 0,05—0,5 мг/мл, 0,05—0,4 мг/мл, 0,05—0,3 мг/мл, 0,05—0,2 мг/мл, 0,05—0,1 мг/мл, 0,1—1,0 мг/мл, 0,2—0,9 мг/мл, 0,3—0,8 мг/мл, 0,4—0,7 мг/мл или 0,5—0,6 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления подходящий раствор мРНК может содержать мРНК в концентрации вплоть до приблизительно 5,0 мг/мл, 4,0 мг/мл, 3,0 мг/мл, 2,0 мг/мл, 1,0 мг/мл, 0,09 мг/мл, 0,08 мг/мл, 0,07 мг/мл, 0,06 мг/мл или 0,05 мг/мл.

[0179] Как правило, подходящий раствор мРНК также может содержать буферное средство и/или соль. В целом, буферные средства могут включать HEPES, сульфат аммония, бикарбонат натрия, цитрат натрия, ацетат натрия, фосфат калия и фосфат натрия. В некоторых вариантах осуществления подходящая концентрация буферного средства может находиться в диапазоне от приблизительно 0,1 мМ до 100 мМ, от 0,5 мМ до 90 мМ, от 1,0 мМ до 80 мМ, от 2 мМ до 70 мМ, от 3 мМ до 60 мМ, от 4 мМ до 50 мМ, от 5 мМ до 40 мМ, от 6 мМ до 30 мМ, от 7 мМ до 20 мМ, от 8 мМ до 15 мМ или от 9 мМ до 12 мМ. В некоторых вариантах осуществления подходящая концентрация буферного средства составляет приблизительно 0,1 мМ, 0,5 мМ, 1 мМ, 2 мМ, 4 мМ, 6 мМ, 8 мМ, 10 мМ, 15 мМ, 20 мМ, 25 мМ, 30 мМ, 35 мМ, 40 мМ, 45 мМ или 50 мМ или больше.

[0180] Иллюстративные соли могут включать хлорид натрия, хлорид магния и хлорид калия. В некоторых вариантах осуществления подходящая концентрация солей в растворе мРНК может находиться в диапазоне от приблизительно 1 мМ до 500 мМ, от 5 мМ до 400 мМ, от 10 мМ до 350 мМ, от 15 мМ до 300 мМ, от 20 мМ до 250 мМ, от 30 мМ до 200 мМ, от 40 мМ до 190 мМ, от 50 мМ до 180 мМ, от 50 мМ до 170 мМ, от 50 мМ до 160 мМ, от 50 мМ до 150 мМ или от 50 мМ до 100 мМ. Концентрация соли в подходящем растворе мРНК составляет приблизительно 1 мМ, 5 мМ, 10 мМ, 20 мМ, 30 мМ, 40 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ, 90 мМ или 100 мМ или больше.

[0181] В некоторых вариантах осуществления подходящий раствор мРНК может иметь рН, находящийся в диапазоне приблизительно 3,5—6,5, 3,5—6,0, 3,5—5,5, 3,5—5,0, 3,5—4,5, 4,0—5,5, 4,0—5,0, 4,0—4,9, 4,0—4,8, 4,0—4,7, 4,0—4,6 или 4,0—4,5. В некоторых вариантах осуществления подходящий раствор мРНК может иметь рН, составляющий приблизительно 3,5, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,1, 6,3 и 6,5 или не больше.

[0182] Для получения раствора мРНК, подходящего для настоящего изобретения, можно применять различные способы. В некоторых вариантах осуществления мРНК может быть непосредственно растворена в буферном растворе, описанном в данном документе. В некоторых вариантах осуществления раствор мРНК может быть получен путем смешивания исходного раствора мРНК с буферным раствором до смешивания с раствором липидов для инкапсулирования. В некоторых вариантах осуществления раствор мРНК может быть получен путем смешивания исходного раствора мРНК с буферным раствором непосредственно перед смешиванием с раствором липидов для инкапсулирования. В некоторых вариантах осуществления подходящий исходный раствор мРНК может содержать мРНК в воде в концентрации, составляющей приблизительно 0,2 мг/мл, 0,4 мг/мл, 0,5 мг/мл, 0,6 мг/мл, 0,8 мг/мл, 1,0 мг/мл, 1,2 мг/мл, 1,4 мг/мл, 1,5 мг/мл или 1,6 мг/мл, 2,0 мг/мл, 2,5 мг/мл, 3,0 мг/мл, 3,5 мг/мл, 4,0 мг/мл, 4,5 мг/мл или 5,0 мг/мл или больше.

[0183] В некоторых вариантах осуществления исходный раствор мРНК смешивают с буферным раствором с применением насоса. К иллюстративным насосам относятся без ограничения шестеренчатые насосы, перистальтические насосы и центробежные насосы.

[0184] Как правило, буферный раствор смешивают при уровне, превышающем уровень исходного раствора мРНК. Например, буферный раствор можно смешивать при уровне, который является в по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 раз большим, чем уровень исходного раствора мРНК. В некоторых вариантах осуществления буферный раствор смешивают при скорости потока в диапазоне приблизительно 100—6000 мл/минута (например, приблизительно 100—300 мл/минута, 300—600 мл/минута, 600—1200 мл/минута, 1200—2400 мл/минута, 2400—3600 мл/минута, 3600—4800 мл/минута, 4800—6000 мл/минута или 60—

420 мл/минута). В некоторых вариантах осуществления буферный раствор смешивают при скорости потока, составляющей приблизительно 60 мл/минута, 100 мл/минута, 140 мл/минута, 180 мл/минута, 220 мл/минута, 260 мл/минута, 300 мл/минута, 340 мл/минута, 380 мл/минута, 420 мл/минута, 480 мл/минута, 540 мл/минута, 600 мл/минута, 1200 мл/минута, 2400 мл/минута, 3600 мл/минута, 4800 мл/минута или 6000 мл/минута или больше.

[0185] В некоторых вариантах осуществления исходный раствор мРНК смешивают при скорости потока в диапазоне приблизительно 10—600 мл/минута (например, 5—50 мл/минута, 10—30 мл/минута, приблизительно 30—60 мл/минута, приблизительно 60—120 мл/минута, приблизительно 120—240 мл/минута, приблизительно 240—360 мл/минута, приблизительно 360—480 мл/минута или приблизительно 480—600 мл/минута). В некоторых вариантах осуществления исходный раствор мРНК смешивают при скорости потока, составляющей приблизительно 5 мл/минута, 10 мл/минута, 15 мл/минута, 20 мл/минута, 25 мл/минута, 30 мл/минута, 35 мл/минута, 40 мл/минута, 45 мл/минута, 50 мл/минута, 60 мл/минута, 80 мл/минута, 100 мл/минута, 200 мл/минута, 300 мл/минута, 400 мл/минута, 500 мл/минута или 600 мл/минута или больше.

### *Среды-носители для доставки*

[0186] В соответствии с настоящим изобретением мРНК, кодирующая белок CFTR (например, полноразмерный белок CFTR, фрагмент или часть белка CFTR), описанный в данном документе, может быть доставлена в виде депротенинизированной (неупакованной) РНК или посредством сред-носителей для доставки. Используемые в данном документе термины «среда-носитель для доставки», «среда-носитель для переноса», «наночастица» или грамматический эквивалент используют взаимозаменяемо.

[0187] Среды-носители для доставки могут быть составлены в комбинации с одним или более дополнительными нуклеиновыми кислотами, носителями, нацеливающими лигандами или стабилизирующими реагентами, или в виде фармакологических композиций, где их смешивают с подходящими вспомогательными веществами. Методики для составления и введения лекарственных средств можно найти в «Remington's Pharmaceutical Sciences», Mack

Publishing Co., Easton, Pa., последнее издание. Конкретную среду-носитель для доставки выбирают на основании ее способности облегчать трансфекцию нуклеиновой кислоты в целевую клетку.

[0188] В некоторых вариантах осуществления среду-носитель для доставки, содержащую мРНК CFTR, вводят посредством легочной доставки, например, включающей распыление. В таких вариантах осуществления среда-носитель для доставки может быть в виде композиции, превращаемой в аэрозоль, которую можно вдыхать. В некоторых вариантах осуществления мРНК экспрессируется в ткани, в которую вводили среду-носитель для доставки, например в полости носа, трахее, бронхах, бронхиолах и/или других клетках или тканях, связанных с легочной системой. Дополнительные сведения о легочной доставке и распылении описаны в соответствующей международной заявке PCT/US17/61100, поданной заявителем 10 ноября 2017 г. и озаглавленной «NOVEL ICE-BASED LIPID NANOPARTICLE FORMULATION FOR DELIVERY OF MRNA», и в предварительной заявке на патент США USSN 62/507061, каждая из которых включена посредством ссылки во всей своей полноте.

[0189] В некоторых вариантах осуществления мРНК, кодирующие белок CFTR, могут быть доставлены с помощью одной среды-носителя для доставки. В некоторых вариантах осуществления мРНК, кодирующие белок CFTR, могут быть доставлены с помощью одной или более сред-носителей для доставки, каждая из которых имеет отличающийся состав. В различных вариантах осуществления подходящие среды-носители для доставки включают без ограничения носители на основе полимера, такого как полиэтиленмин (PEI), липидные наночастицы и липосомы, нанолипосомы, содержащие керамид нанолипосомы, протеоллипосомы, экзосомы как природного, так и синтетического происхождения, природные, синтетические и полусинтетические ламеллярные тельца, наночастицы, наночастицы фосфоросиликата кальция, наночастицы фосфата кальция, наночастицы диоксида кремния, нанокристаллические частицы, полупроводниковые наночастицы, поли(D-аргинин), золь-гели, нанодендримеры, системы доставки на основе крахмала, мицеллы, эмульсии, ниосомы, мультидоменные блок-полимеры (виниловые полимеры, полимеры полипропилакриловой кислоты, динамические поликонъюгаты), сухие порошковые составы, плазмиды, вирусы, нуклеотиды фосфата кальция,

аптамеры, пептиды и другие векторные метки. Также предполагается использование бионанокапсул и других сборок вирусных капсидных белков в качестве подходящей среды-носителя для переноса (Hum. Gene Ther. 2008 September; 19(9):887-95).

[0190] Среду-носитель для доставки, содержащую мРНК CFTR, можно вводить и вводить ее дозу в соответствии с текущей медицинской практикой, принимая во внимание клиническое состояние субъекта, место и способ введения (например, местное и системное, включая пероральное, легочное и посредством инъекции), график введения, возраст субъекта, пол, вес тела и другие факторы, имеющие значение для лечащих врачей средней квалификации в данной области техники. «Эффективное количество» для целей, представленных в данном документе, может быть определено я использованием соответствующих критериев, известных специалистам средней квалификации в области экспериментальных клинических исследований, фармакологии, клинической и медицинской области. В некоторых вариантах осуществления вводимое количество является эффективным для достижения по меньшей мере некоторой стабилизации, улучшения или устранения симптомов и других показателей, выбранных специалистами в данной области техники в качестве соответствующих показателей прогрессирувания, регрессии заболевания или улучшения в отношении такового. Например, подходящим количеством и схемой введения доз являются те, которые обуславливают по меньшей мере временное продуцирование белка.

[0191] В некоторых вариантах осуществления мРНК CFTR вводят в комбинации с одним или более потенцирующими средствами и/или корректорами для CFTR. Подходящие потенцирующие средства и/или корректоры для CFTR включают ивакафтор (торговое наименование Kalydeco®), лумакафтор (торговое наименование Orkambi®) или комбинацию ивакафтора и лумакафтора. В некоторых вариантах осуществления мРНК CFTR вводят в комбинации с одним или более другими видами лечения CF, такими как заместительная гормональная терапия, заместительная терапия гормонами щитовидной железы, нестероидные противовоспалительные лекарственные средства и назначенный дронабинол (Marginol®) в ходе лечения.

[0192] В некоторых вариантах осуществления субъект-человек получает средство сопутствующей терапии на основе модулятора CFTR. В некоторых



[0193] В некоторых вариантах осуществления субъект-человек не подходит для лечения одним или более из ивакафтора, лумакафтора, тезакафтора, VX-659, VX-445, VX-152, VX-440, VX-371, VX-561, VX-659 или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления субъект-человек не подходит для лечения одним или более из ивакафтора, лумакафтора, тезакафтора, VX-659, VX-445, VX-152, VX-440, VX-371, VX-561, VX-659, GLPG1837, GLPG2222, GLPG2737, GLPG2451, GLPG1837, PTI-428, PTI-801, PTI-808, элуфорсена или их комбинаций.

[0194] В некоторых вариантах осуществления среды-носители для доставки составлены таким образом, что они подходят для замедленного высвобождения содержащейся в них мРНК. Такие композиции с замедленным высвобождением можно удобно вводить субъекту с увеличенными интервалами введения доз.

*Липосомные среды-носители для доставки*

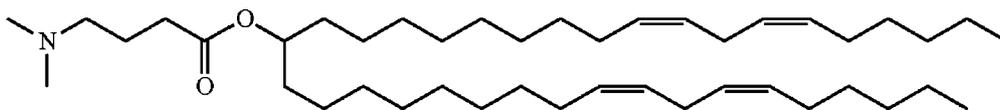
[0195] В некоторых вариантах осуществления подходящая среда-носитель для доставки представляет собой липосомную среду-носитель для доставки, например липидную наночастицу. Используемые в данном документе липосомные среды-носители для доставки, например липидные наночастицы, обычно характеризуются как микроскопические везикулы, имеющие внутреннее водное пространство, отделенное от внешней среды мембраной из одной или более двухслойных структур. Двухслойные мембраны липосом обычно образованы амфифильными молекулами, такими как липиды синтетического или природного происхождения, которые содержат пространственно разделенные гидрофильные и гидрофобные домены (Lasic, Trends Biotechnol., 16: 307-321, 1998). Двухслойные мембраны липосом также могут быть образованы амфифильными полимерами и поверхностно-активными веществами (например, полимеросомами, ниосомами и т. д.). В контексте настоящего изобретения липосомная среда-носитель обычно служит для транспорта необходимой мРНК в целевую клетку или ткань. В некоторых вариантах осуществления средой-носителем для доставки наночастиц является липосома. В некоторых вариантах осуществления липосома содержит один или более катионных липидов, один или более некатионных липидов, один или более липидов на основе холестерина и один или более PEG-модифицированных липидов. В некоторых вариантах осуществления липосома содержит не более трех отдельных липидных компонентов. В некоторых

вариантах осуществления один отдельный липидный компонент представляет собой катионный липид на основе стерина.

### *Катионные липиды*

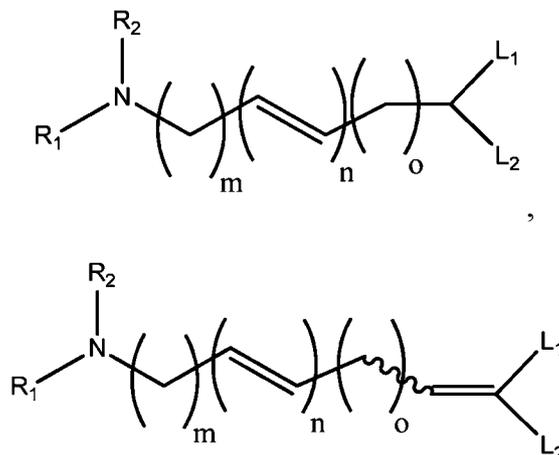
[0196] Используемая в данном документе фраза «катионные липиды» относится к любому из ряда липидных соединений, которые имеют суммарный положительный заряд при выбранном pH, таком как физиологический pH.

[0197] Подходящие катионные липиды для применения в композициях и способах по настоящему изобретению включают в себя катионные липиды, описанные в международной патентной публикации WO 2010/144740, которая включена в данный документ посредством ссылки. В определенных вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат, имеющий следующую структуру соединения:

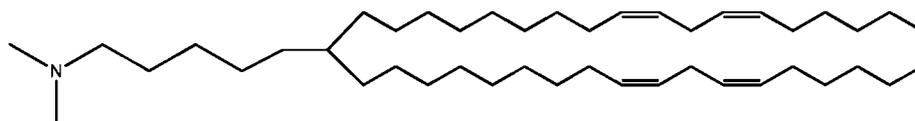


и его фармацевтически приемлемые соли.

[0198] Другие подходящие катионные липиды для применения в композициях и способах по настоящему изобретению включают в себя ионизируемые катионные липиды, которые описаны в международной патентной публикации WO 2013/149140, которая включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид одной из следующих формул:

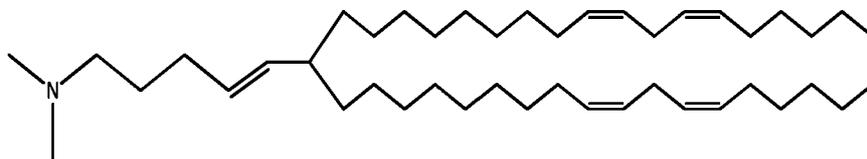


или его фармацевтически приемлемую соль, где каждый из  $R_1$  и  $R_2$  независимо выбран из группы, состоящей из водорода, необязательно замещенного характеризующегося переменной насыщенностью или ненасыщенного  $C_1$ - $C_{20}$ -алкила и необязательно замещенного характеризующегося переменной насыщенностью или ненасыщенного  $C_6$ - $C_{20}$ -ацила; где каждый из  $L_1$  и  $L_2$  независимо выбран из группы, состоящей из водорода, необязательно замещенного  $C_1$ - $C_{30}$ -алкила, необязательно замещенного характеризующегося переменной насыщенностью  $C_1$ - $C_{30}$ -алкенила и необязательно замещенного  $C_1$ - $C_{30}$ -алкинила; где каждый из  $m$  и  $o$  независимо выбран из группы, состоящей из нуля и любого положительного целого числа (например, где  $m$  равняется трем); и где  $n$  равняется нулю или любому положительному целому числу (например, где  $n$  равняется единице). В определенных вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид (15Z,18Z)-N,N-диметил-6-(9Z, 12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)тетракоза-15,18-диен-1-амин («HGT5000»), имеющий следующую структуру соединения:



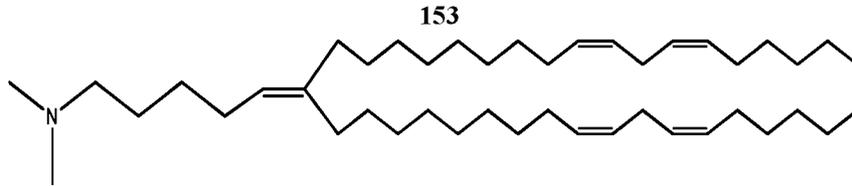
(HGT-5000),

и его фармацевтически приемлемые соли. В определенных вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид (15Z,18Z)-N,N-диметил-6-(9Z, 12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)тетракоза-4,15,18-триен-1-амин («HGT5001»), имеющий следующую структуру соединения:



(HGT-5001),

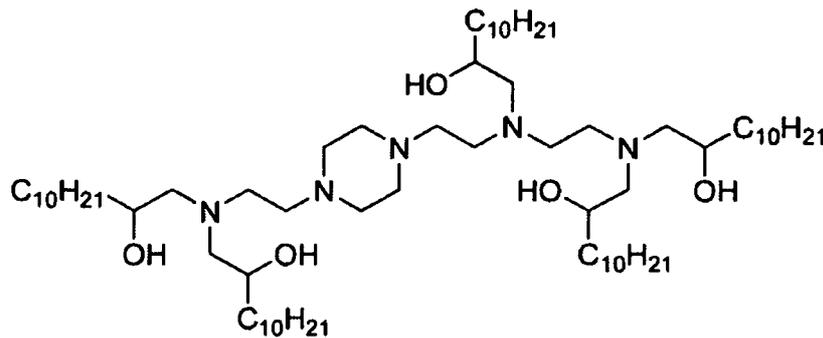
и его фармацевтически приемлемые соли. В определенных вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид и (15Z,18Z)-N,N-диметил-6-((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)тетракоза-5,15,18-триен-1-амин («HGT5002»), имеющий следующую структуру соединения:



(HGT-5002),

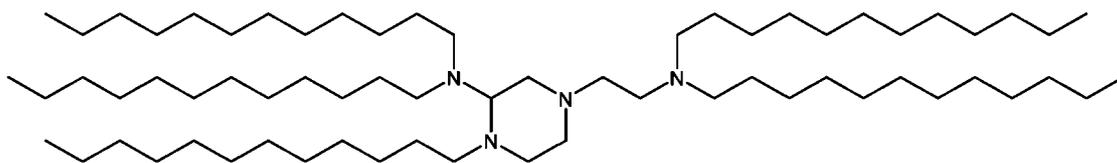
и его фармацевтически приемлемые соли.

[0199] Другие подходящие катионные липиды для применения в композициях и способах по настоящему изобретению включают в себя катионные липиды, описанные как липидоиды на основе аминспиртов в международной патентной публикации WO 2010/053572, которая включена в данный документ посредством ссылки. В определенных вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



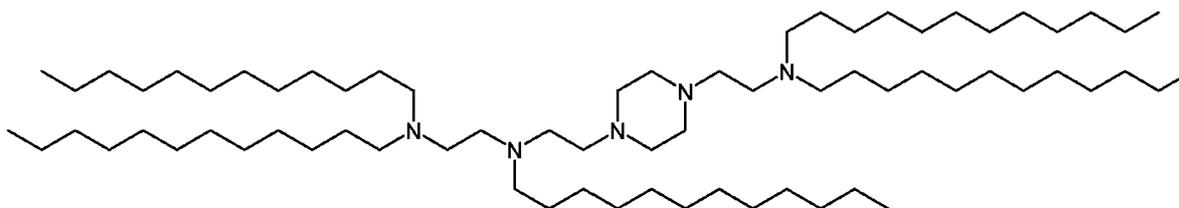
и его фармацевтически приемлемые соли.

[0200] Другие подходящие катионные липиды для применения в композициях и способах по настоящему изобретению включают в себя катионные липиды, описанные в международной патентной публикации WO 2016/118725, которая включена в данный документ посредством ссылки. В определенных вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



и его фармацевтически приемлемые соли.

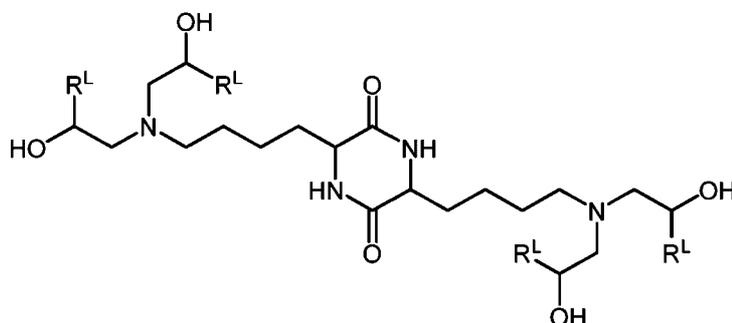
[0201] Другие подходящие катионные липиды для применения в композициях и способах по настоящему изобретению включают в себя катионные липиды, описанные в международной патентной публикации WO 2016/118724, которая включена в данный документ посредством ссылки. В определенных вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



и его фармацевтически приемлемые соли.

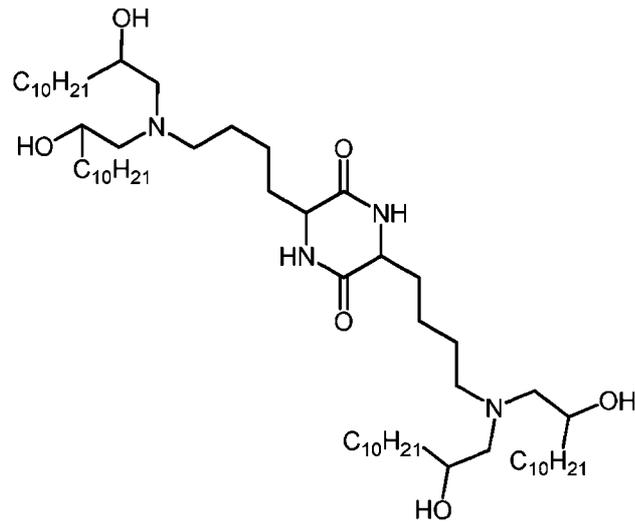
[0202] Другие подходящие катионные липиды для применения в композициях и способах по настоящему изобретению включают в себя катионный липид, имеющий формулу 14,25-дитридецил-15,18,21,24-тетраазаоктатриаконтан, и его фармацевтически приемлемые соли.

[0203] Другие подходящие катионные липиды для применения в композициях и способах по настоящему изобретению включают в себя катионные липиды, описанные в международных патентных публикациях WO 2013/063468 и WO 2016/205691, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид следующей формулы:

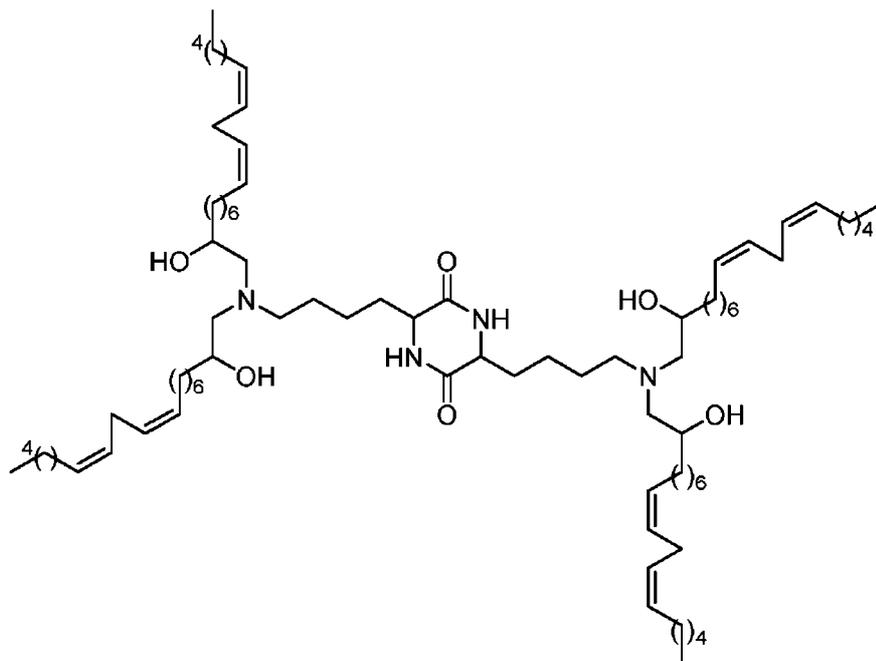


или его фармацевтически приемлемые соли, где  $R^L$  в каждом случае независимо представляет собой необязательно замещенный  $C_6$ - $C_{40}$ -алкенил. В определенных вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:

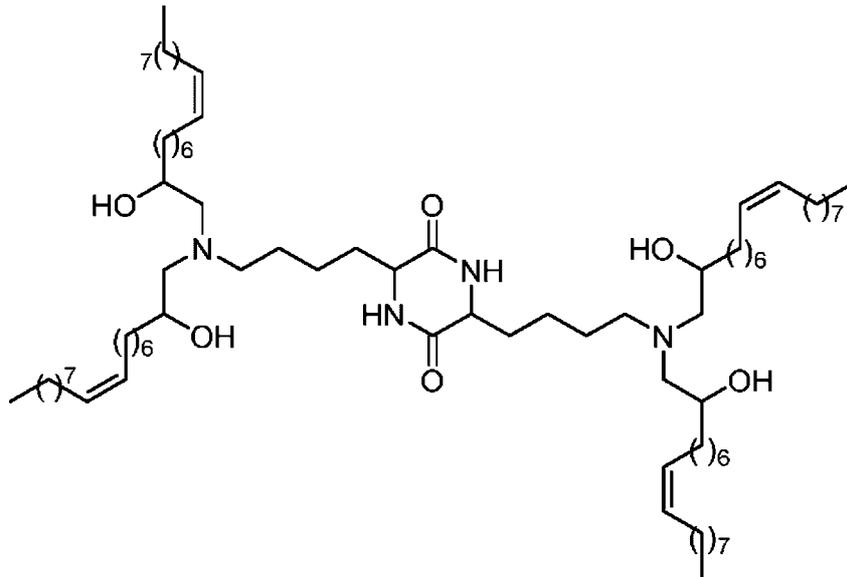
155



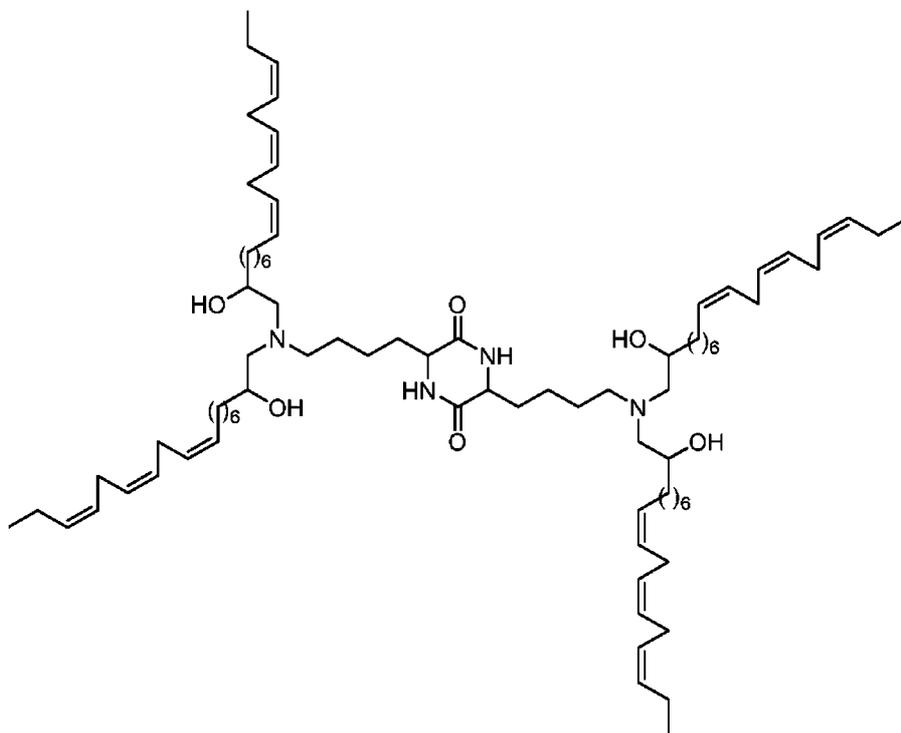
и его фармацевтически приемлемые соли. В определенных вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



и его фармацевтически приемлемые соли. В определенных вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



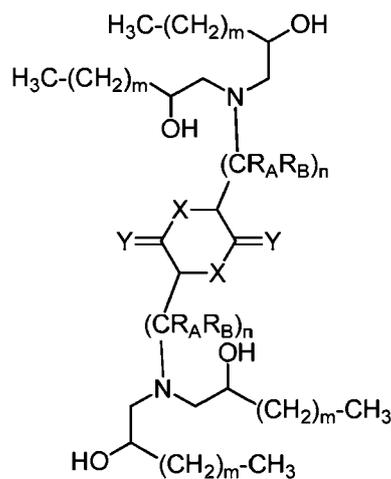
и его фармацевтически приемлемые соли. В определенных вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



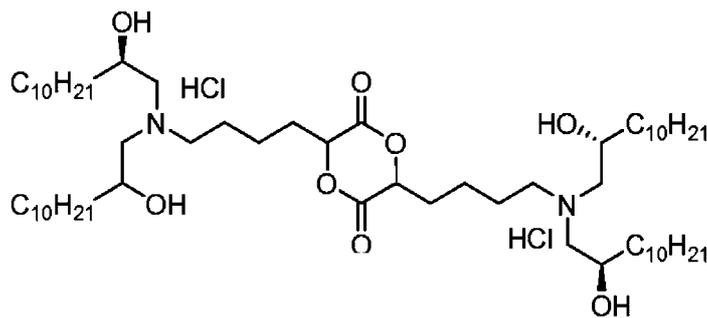
и его фармацевтически приемлемые соли.

[0204] Другие подходящие катионные липиды для применения в композициях и способах по настоящему изобретению включают в себя катионные липиды, описанные в международной патентной публикации WO 2015/184256, которая включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах

осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид следующей формулы:

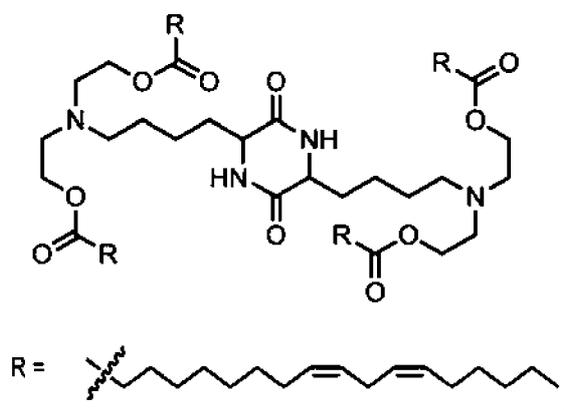


или его фармацевтически приемлемую соль, где каждый X независимо представляет собой O или S; каждый Y независимо представляет собой O или S; каждый m независимо равняется от 0 до 20; каждый n независимо равняется от 1 до 6; каждый R<sub>A</sub> независимо представляет собой водород, необязательно замещенный C1-50-алкил, необязательно замещенный C2-50-алкенил, необязательно замещенный C2-50-алкинил, необязательно замещенный C3-10-карбоциклил, необязательно замещенный 3-14-членный гетероциклил, необязательно замещенный C6-14-арил, необязательно замещенный 5-14-членный гетероарил или галоген; и каждый R<sub>B</sub> независимо представляет собой водород, необязательно замещенный C1-50-алкил, необязательно замещенный C2-50-алкенил, необязательно замещенный C2-50-алкинил, необязательно замещенный C3-10-карбоциклил, необязательно замещенный 3-14-членный гетероциклил, необязательно замещенный C6-14-арил, необязательно замещенный 5-14-членный гетероарил или галоген. В определенных вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид «Целевой 23», имеющий следующую структуру соединения:

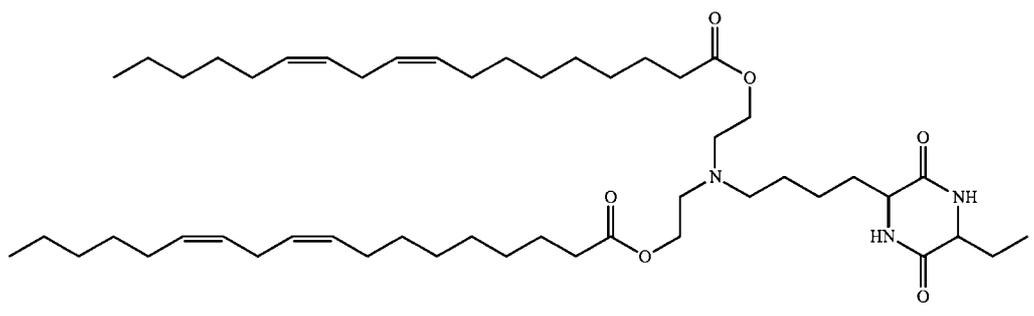


и его фармацевтически приемлемые соли.

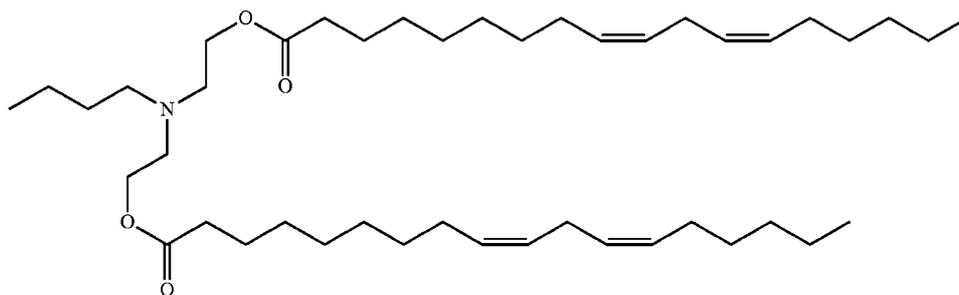
[0205] Другие подходящие катионные липиды для применения в композициях и способах по настоящему изобретению включают в себя катионные липиды, описанные в международной патентной публикации WO 2016/004202, которая включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:

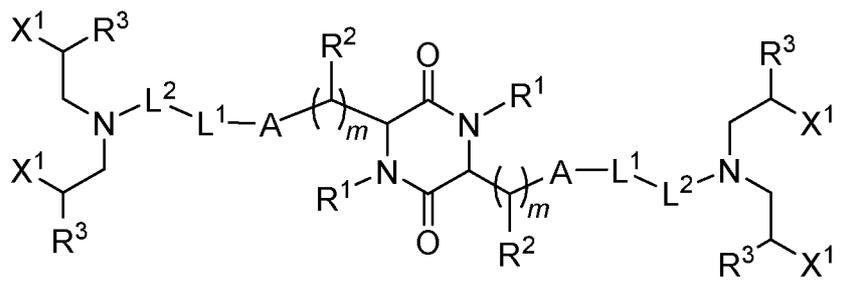


или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



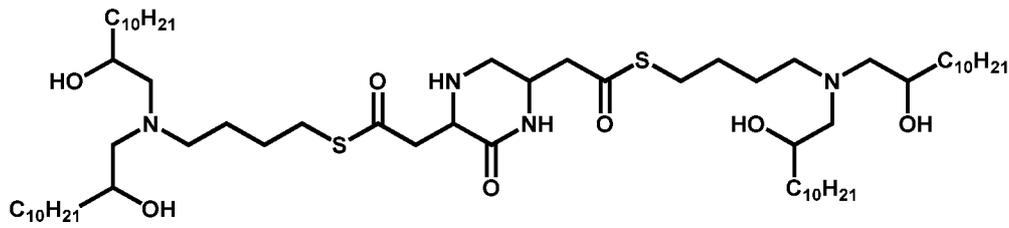
или его фармацевтически приемлемую соль.

[0206] Другие подходящие катионные липиды для применения в композициях и способах по настоящему изобретению включают в себя катионные липиды, описанные в предварительной заявке на патент США с регистрационным № 62/758179, которая включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид следующей формулы:



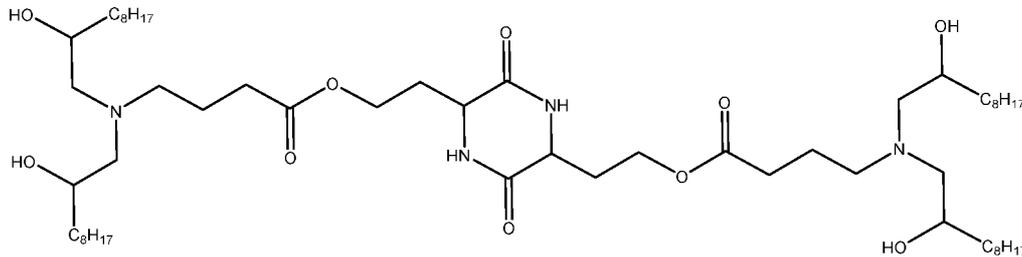
или его фармацевтически приемлемую соль, где каждый  $R^1$  и  $R^2$  независимо представляет собой H или  $C_1$ - $C_6$ -алифатическую группу; каждый  $m$  независимо представляет собой целое число, имеющее значение от 1 до 4; каждый A независимо представляет собой ковалентную связь или арилен; каждый  $L^1$  независимо представляет собой сложноэфирную, тиоэфирную, дисульфидную или ангидридную группу; каждый  $L^2$  независимо представляет собой  $C_2$ - $C_{10}$ -алифатическую группу; каждый  $X^1$  независимо представляет собой H или OH; и каждый  $R^3$  независимо представляет собой  $C_6$ - $C_{20}$ -алифатическую группу. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид следующей формулы:

160



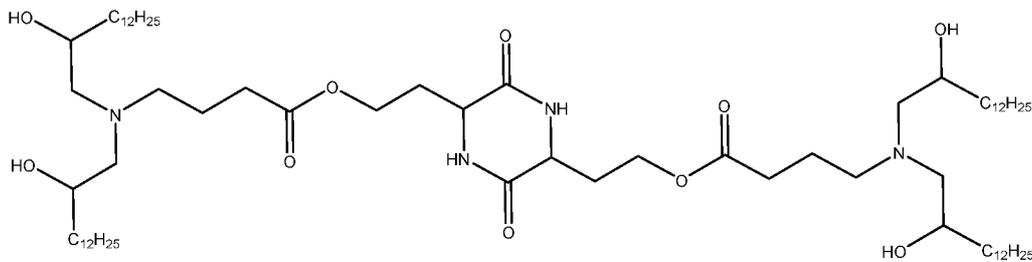
(Соединение 1),

или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид следующей формулы:



(Соединение 2),

или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид следующей формулы:

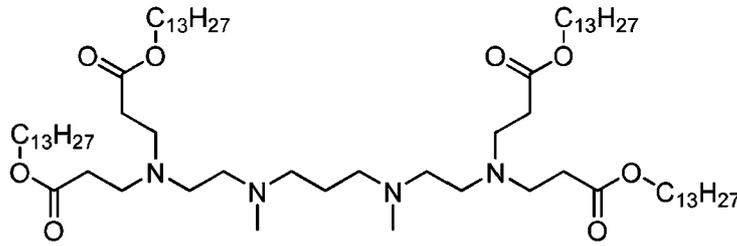


(Соединение 3),

или его фармацевтически приемлемую соль.

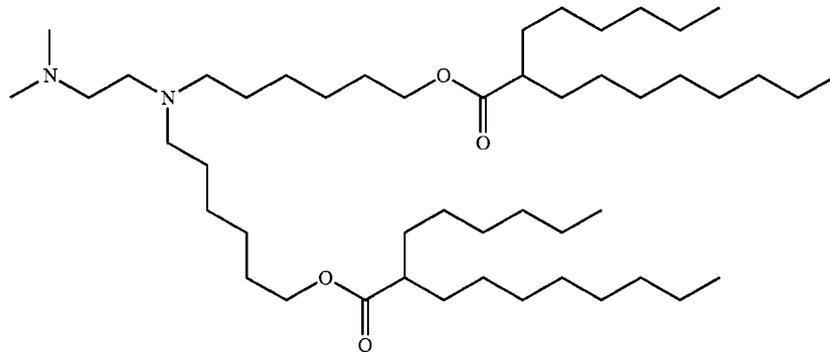
[0207] Другие подходящие катионные липиды для применения в композициях и способах по настоящему изобретению включают в себя катионные липиды, описанные в J. McClellan, MC King, Cell 2010, 141, 210-217 и в Whitehead et al., Nature Communications (2014) 5:4277, которые включены в данный документ посредством ссылки. В определенных вариантах осуществления катионные липиды из композиций

и способов по настоящему изобретению включают в себя катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:

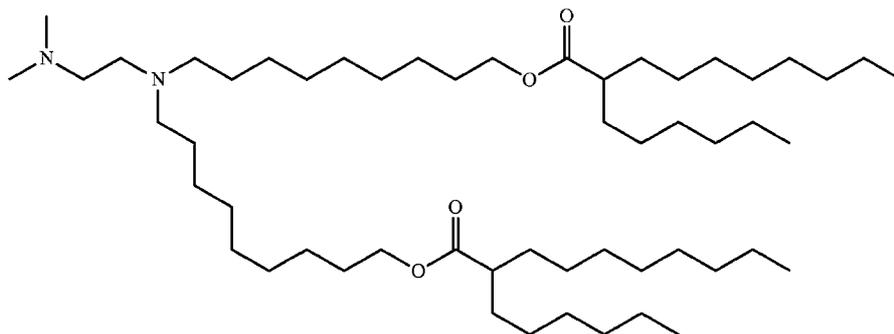


и его фармацевтически приемлемые соли.

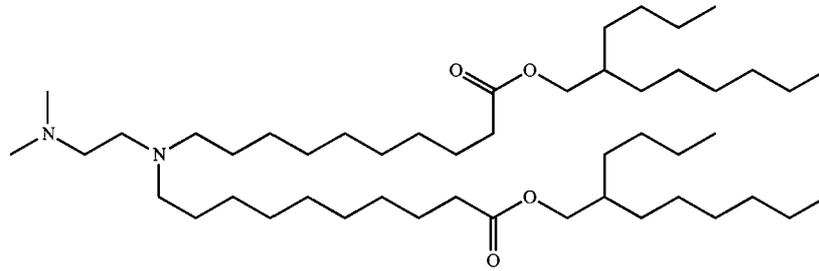
[0208] Другие подходящие катионные липиды для применения в композициях и способах по настоящему изобретению включают в себя катионные липиды, описанные в международной патентной публикации WO 2015/199952, которая включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



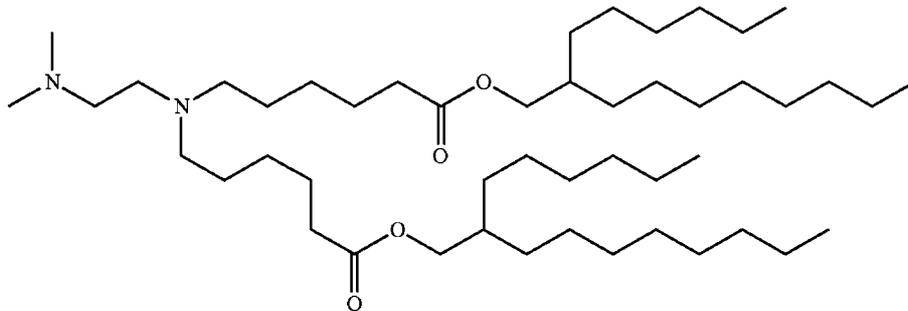
и его фармацевтически приемлемые соли. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



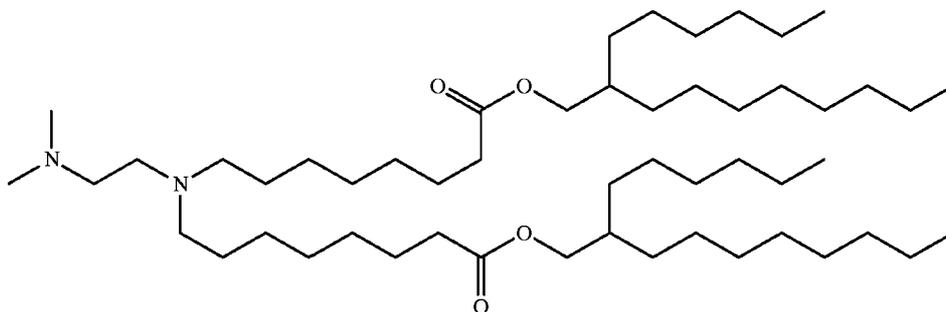
и его фармацевтически приемлемые соли. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



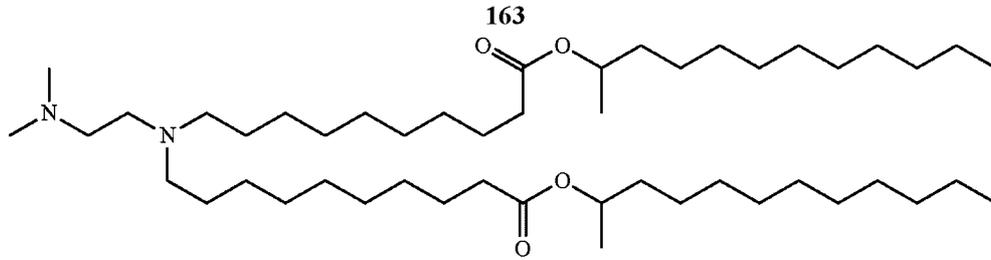
и его фармацевтически приемлемые соли. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



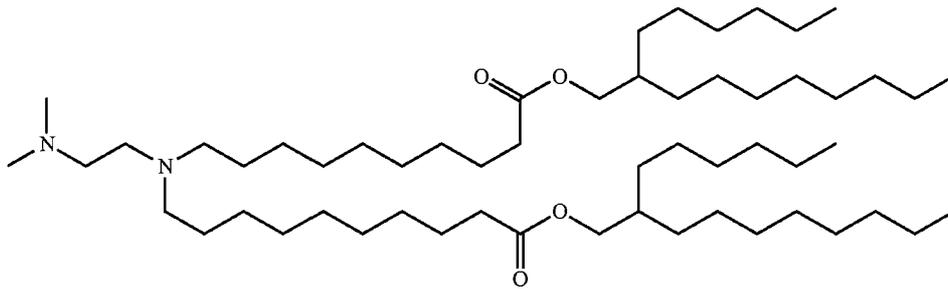
и его фармацевтически приемлемые соли. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



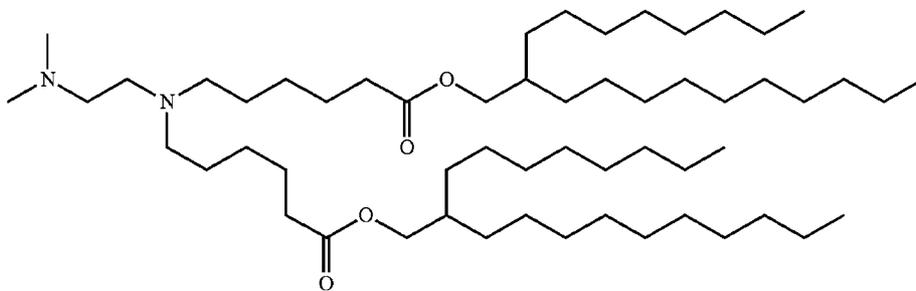
и его фармацевтически приемлемые соли. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



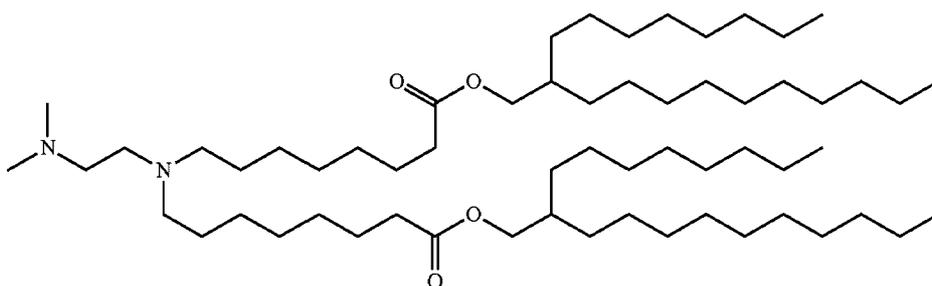
и его фармацевтически приемлемые соли. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



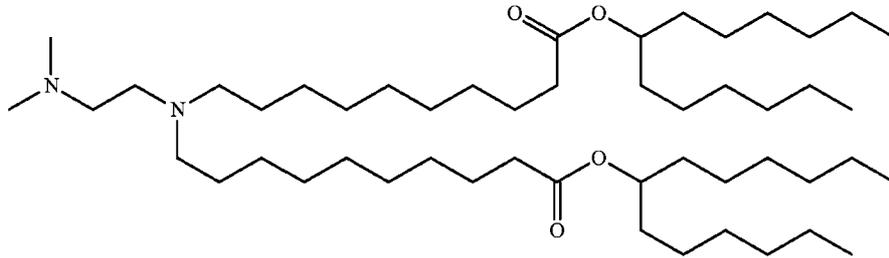
и его фармацевтически приемлемые соли. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



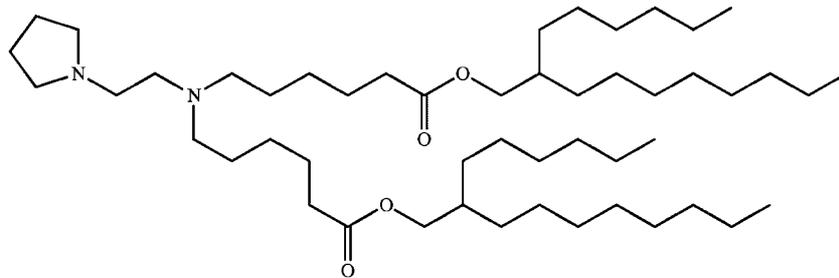
и его фармацевтически приемлемые соли. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



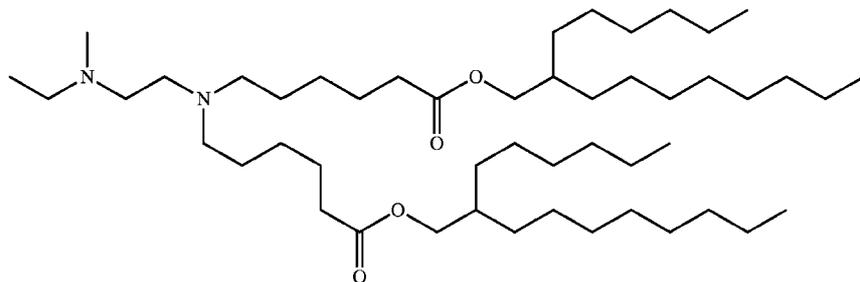
и его фармацевтически приемлемые соли. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



и его фармацевтически приемлемые соли. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:

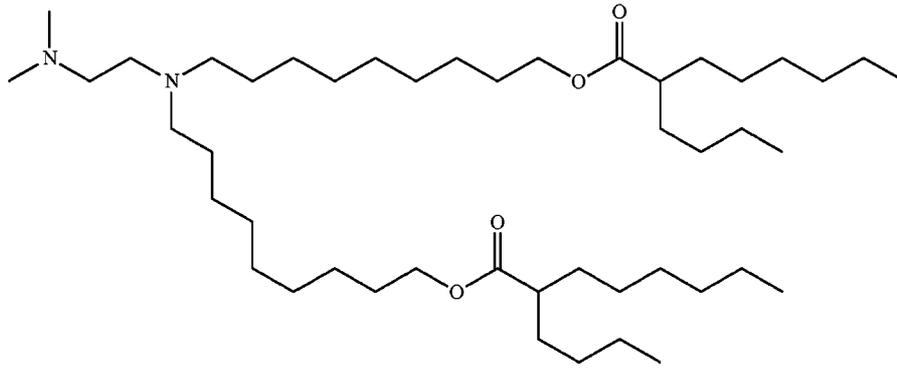


и его фармацевтически приемлемые соли. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



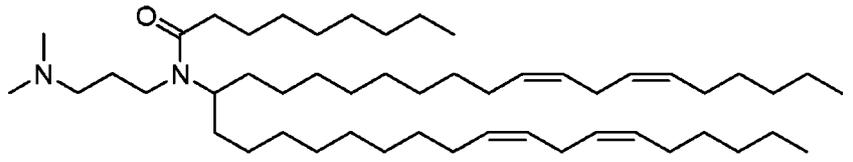
и его фармацевтически приемлемые соли. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:

165

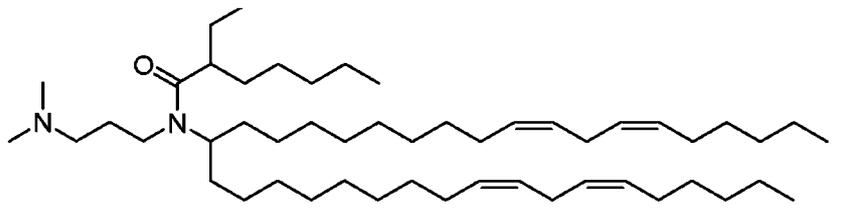


и его фармацевтически приемлемые соли.

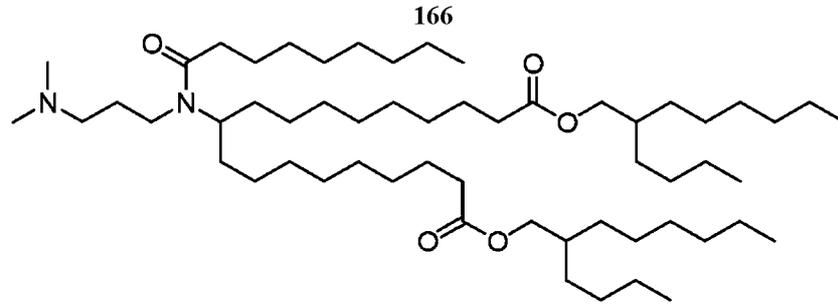
[0209] Другие подходящие катионные липиды для применения в композициях и способах по настоящему изобретению включают в себя катионные липиды, описанные в международной патентной публикации WO 2017/004143, которая включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



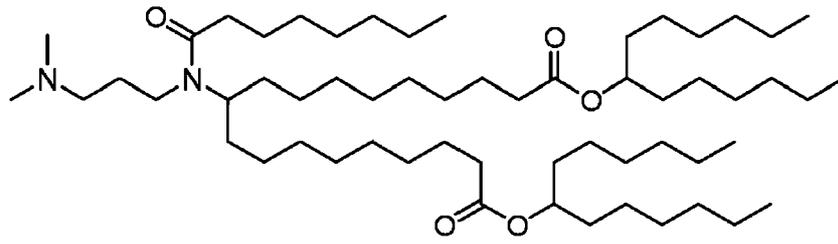
и его фармацевтически приемлемые соли. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



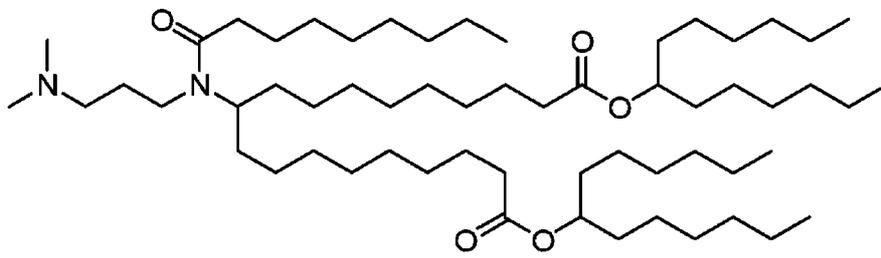
и его фармацевтически приемлемые соли. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



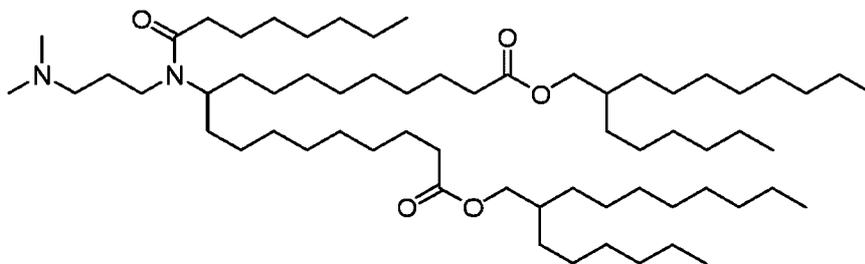
и его фармацевтически приемлемые соли. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



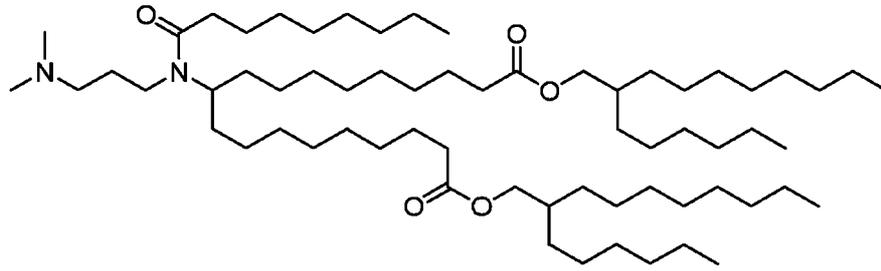
и его фармацевтически приемлемые соли. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



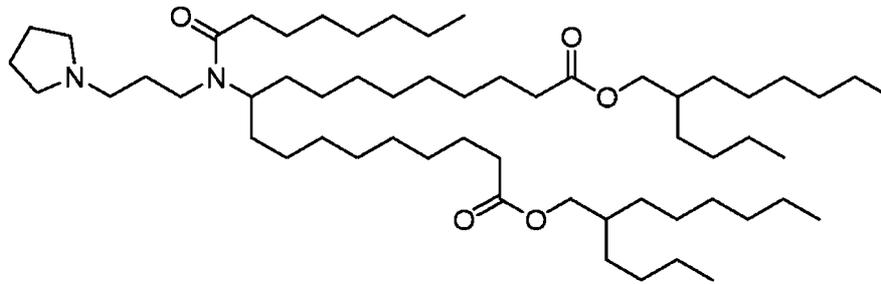
и его фармацевтически приемлемые соли. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



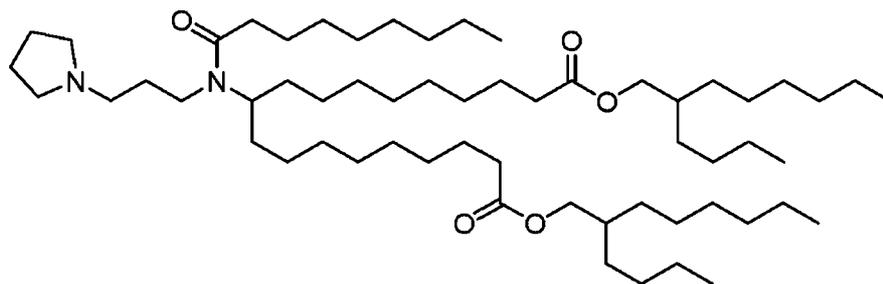
и его фармацевтически приемлемые соли. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



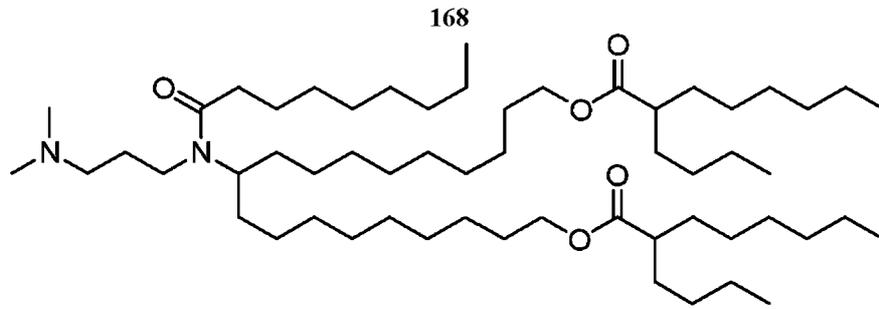
и его фармацевтически приемлемые соли. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



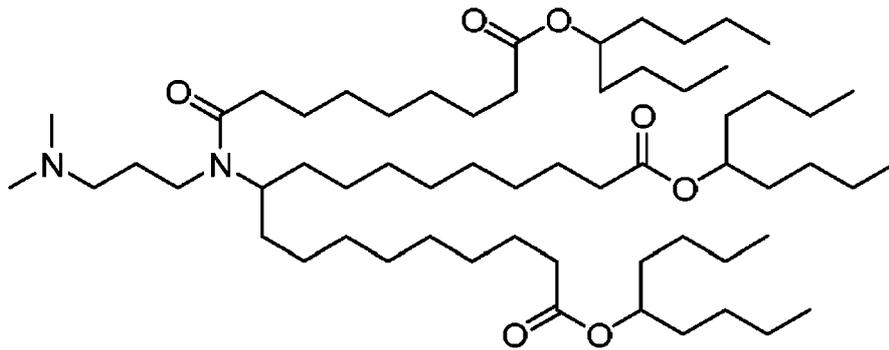
и его фармацевтически приемлемые соли. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



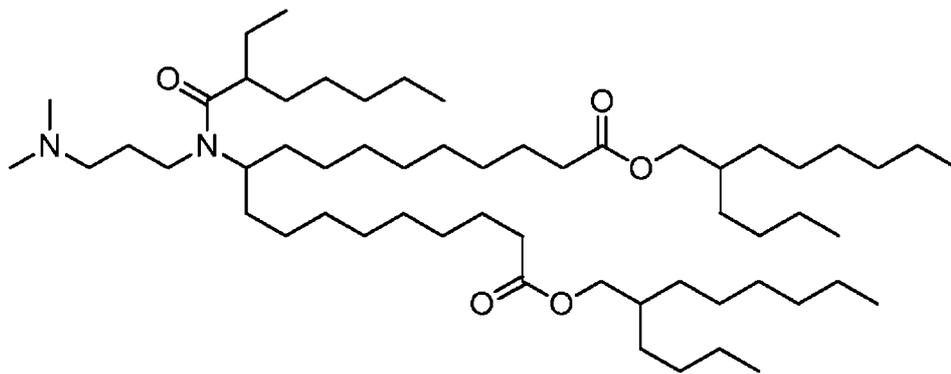
и его фармацевтически приемлемые соли. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



и его фармацевтически приемлемые соли. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:

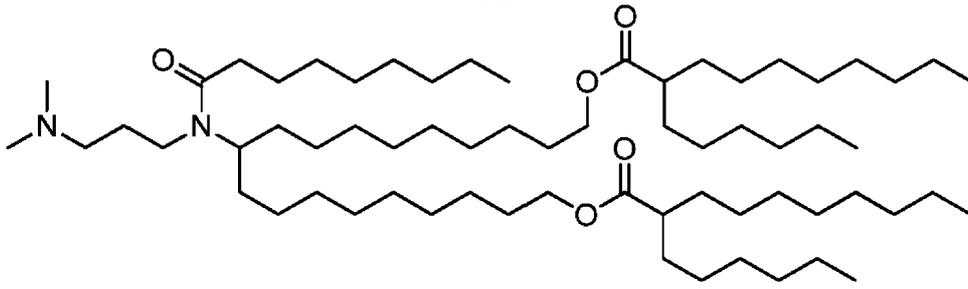


и его фармацевтически приемлемые соли. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:

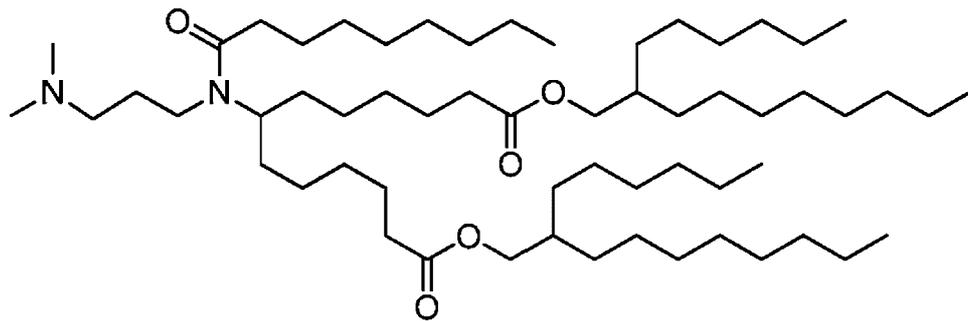


и его фармацевтически приемлемые соли. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:

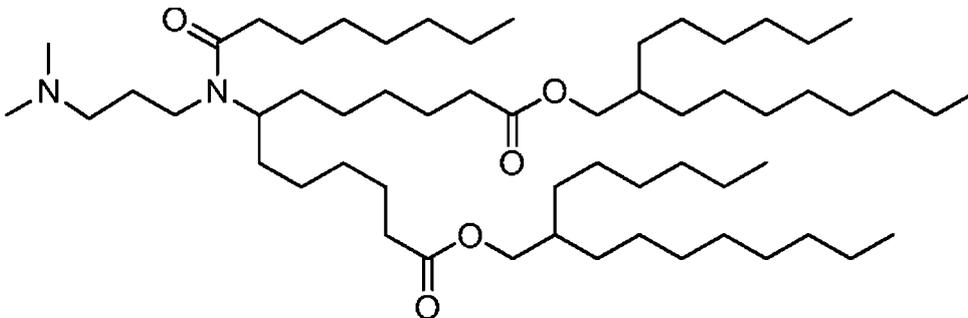
169



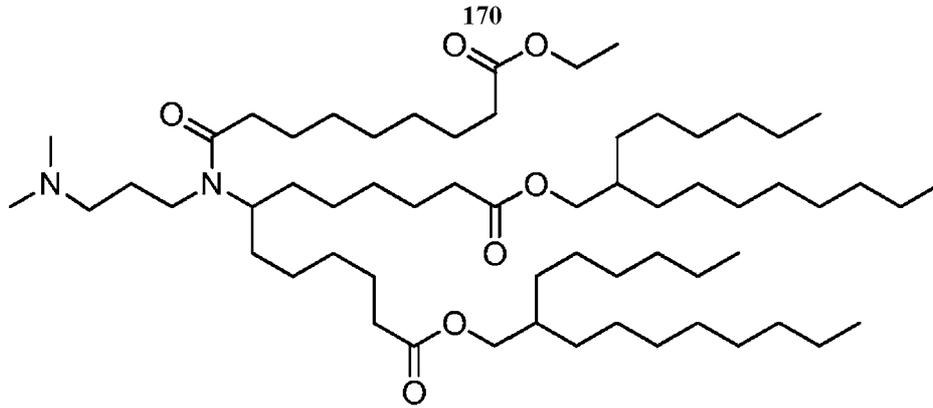
и его фармацевтически приемлемые соли. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



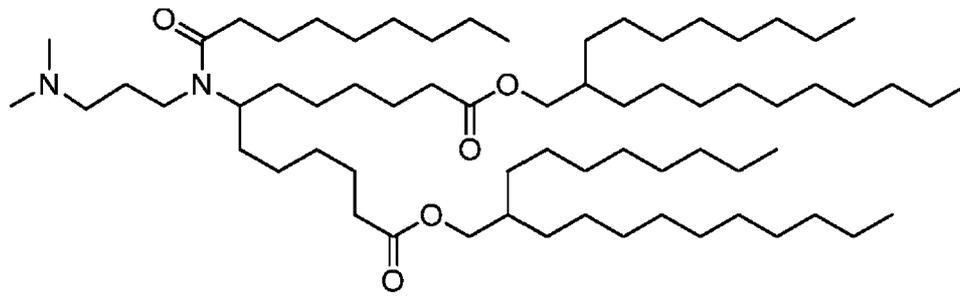
и его фармацевтически приемлемые соли. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



и его фармацевтически приемлемые соли. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:

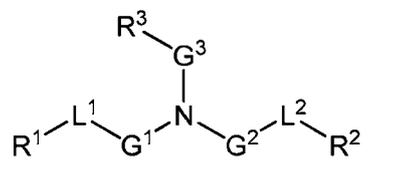


и его фармацевтически приемлемые соли. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



и его фармацевтически приемлемые соли.

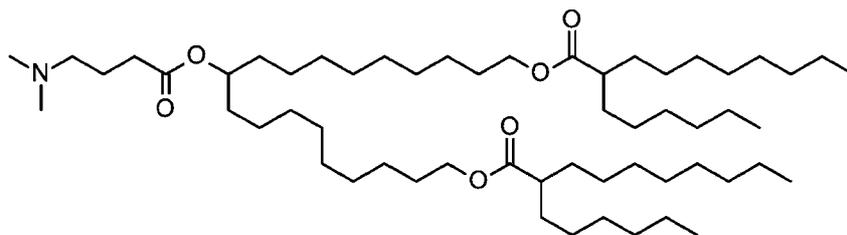
**[0210]** Другие подходящие катионные липиды для применения в композициях и способах по настоящему изобретению включают в себя катионные липиды, описанные в международной патентной публикации WO 2017/075531, которая включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид следующей формулы:



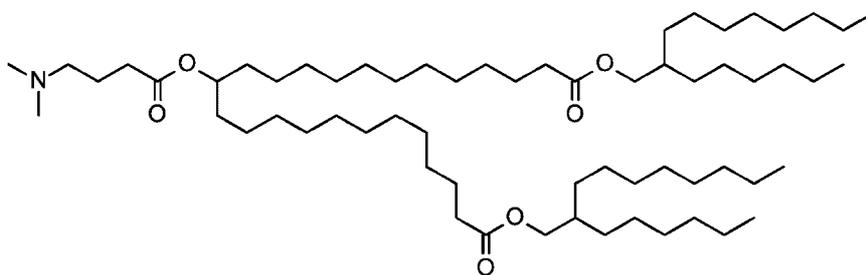
или его фармацевтически приемлемую соль, где один из  $L^1$  или  $L^2$  представляет собой  $-O(C=O)-$ ,  $-(C=O)O-$ ,  $-C(=O)-$ ,  $-O-$ ,  $-S(O)_x$ ,  $-S-S-$ ,  $-C(=O)S-$ ,  $-SC(=O)-$ ,  $-NR^aC(=O)-$ ,  $-C(=O)NR^a$ ,  $NR^aC(=O)NR^a$ ,  $-OC(=O)NR^a$  или  $-NR^aC(=O)O-$ ; а другой из  $L^1$  или  $L^2$  представляет собой  $-O(C=O)-$ ,  $-(C=O)O-$ ,  $-C(=O)-$ ,  $-O-$ ,  $-S(O)_x$ ,  $-S-S-$ ,  $-C(=O)S-$ ,  $SC(=O)-$ ,  $-NR^aC(=O)-$ ,  $-C(=O)NR^a$ ,  $NR^aC(=O)NR^a$ ,  $-OC(=O)NR^a$ , или  $-NR^aC(=O)O-$ , или прямую

связь; каждый из  $G^1$  и  $G^2$  независимо представляет собой незамещенный  $C_1$ - $C_{12}$ -алкилен или  $C_1$ - $C_{12}$ -алкенилен;  $G^3$  представляет собой  $C_1$ - $C_{24}$ -алкилен,  $C_1$ - $C_{24}$ -алкенилен,  $C_3$ - $C_8$ -циклоалкилен,  $C_3$ - $C_8$ -циклоалкенилен;  $R^a$  представляет собой H или  $C_1$ - $C_{12}$ -алкил; каждый из  $R^1$  и  $R^2$  независимо представляет собой  $C_6$ - $C_{24}$ -алкил или  $C_6$ - $C_{24}$ -алкенил;  $R^3$  представляет собой H,  $OR^5$ , CN,  $-C(=O)OR^4$ ,  $-OC(=O)R^4$  или  $-NR^5C(=O)R^4$ ;  $R^4$  представляет собой  $C_1$ - $C_{12}$ -алкил;  $R^5$  представляет собой H или  $C_1$ - $C_6$ -алкил; и  $x$  равняется 0, 1 или 2.

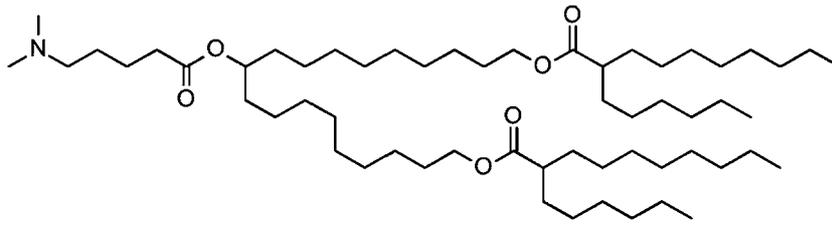
[0211] Другие подходящие катионные липиды для применения в композициях и способах по настоящему изобретению включают в себя катионные липиды, описанные в международной патентной публикации WO 2017/117528, которая включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



и его фармацевтически приемлемые соли. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:

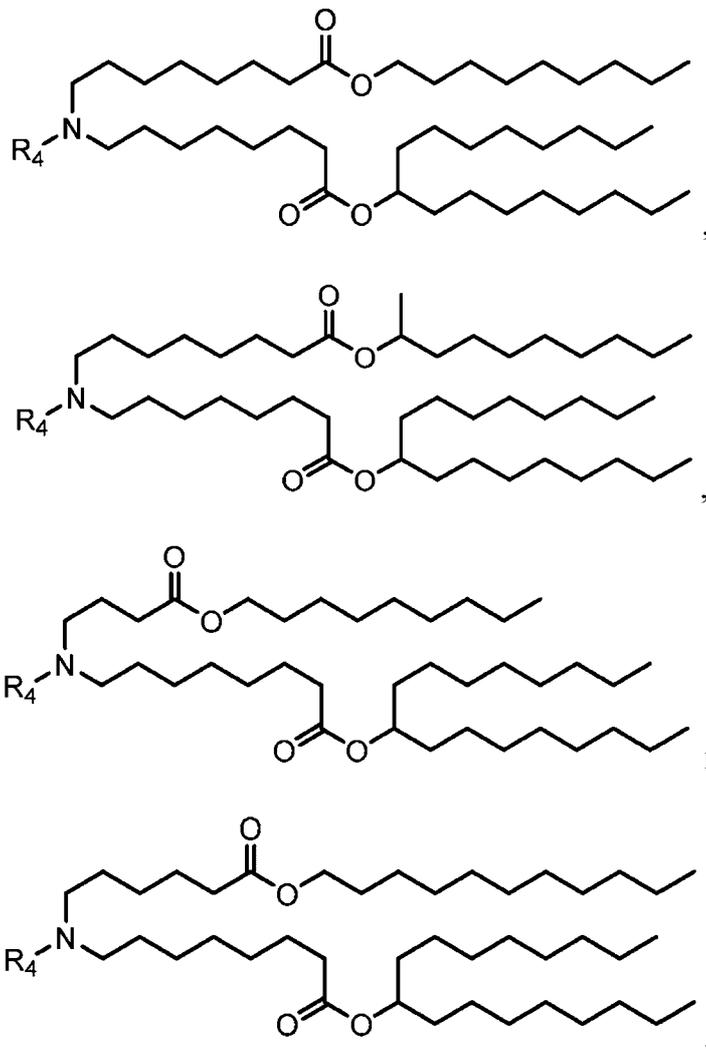


и его фармацевтически приемлемые соли. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



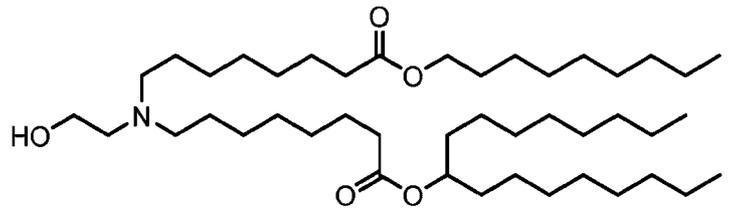
и его фармацевтически приемлемые соли.

[0212] Другие подходящие катионные липиды для применения в композициях и способах по настоящему изобретению включают в себя катионные липиды, описанные в международной патентной публикации WO 2017/049245, которая включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления катионные липиды из композиций и способов по настоящему изобретению включают в себя соединение одной из следующих формул:

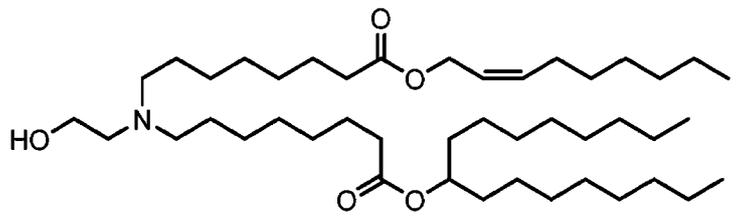


и его фармацевтически приемлемые соли. Для любой из данных четырех формул R<sub>4</sub> независимо выбран из  $-(CH_2)_nQ$  и  $-(CH_2)_nCHQR$ ; Q выбран из группы, состоящей из -

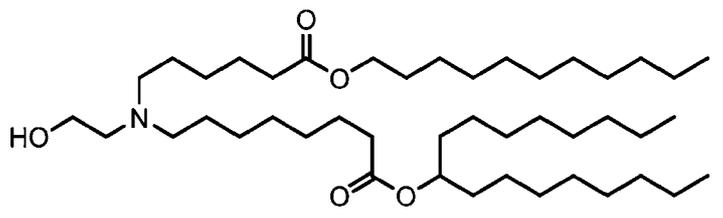
OR, -OH,  $-O(CH_2)_nN(R)_2$ ,  $-OC(O)R$ ,  $-CX_3$ ,  $-CN$ ,  $-N(R)C(O)R$ ,  $-N(H)C(O)R$ ,  $-N(R)S(O)_2R$ ,  $-N(H)S(O)_2R$ ,  $-N(R)C(O)N(R)_2$ ,  $-N(H)C(O)N(R)_2$ ,  $-N(H)C(O)N(H)(R)$ ,  $-N(R)C(S)N(R)_2$ ,  $-N(H)C(S)N(R)_2$ ,  $-N(H)C(S)N(H)(R)$  и гетероцикла; и n равняется 1, 2 или 3. В определенных вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



и его фармацевтически приемлемые соли. В определенных вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:

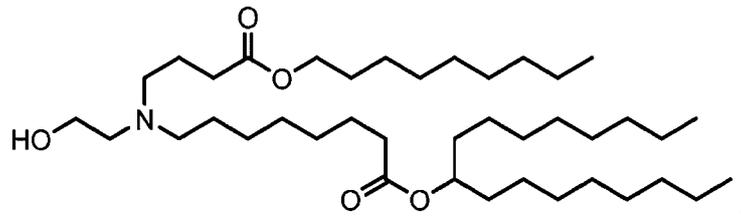


и его фармацевтически приемлемые соли. В определенных вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:



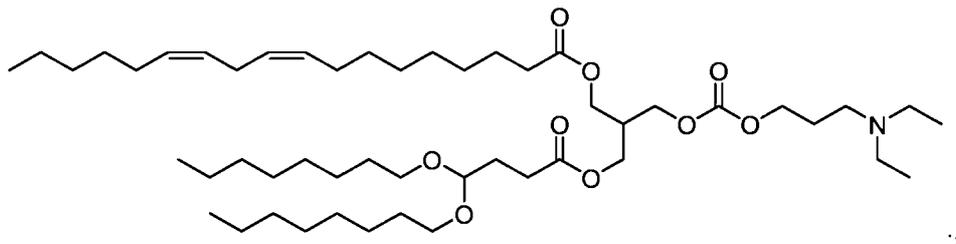
и его фармацевтически приемлемые соли. В определенных вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:

174

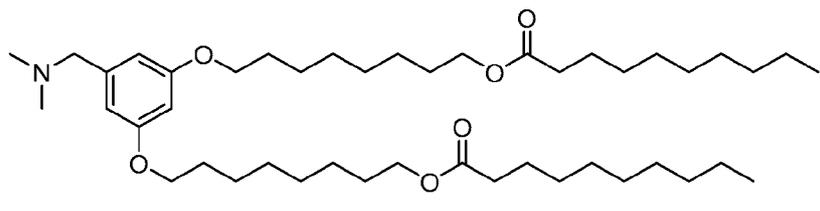


и его фармацевтически приемлемые соли.

[0213] Другие подходящие катионные липиды для применения в композициях и способах по настоящему изобретению включают в себя катионные липиды, которые описаны в международной патентной публикации WO 2017/173054 и WO 2015/095340, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки. В определенных вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:

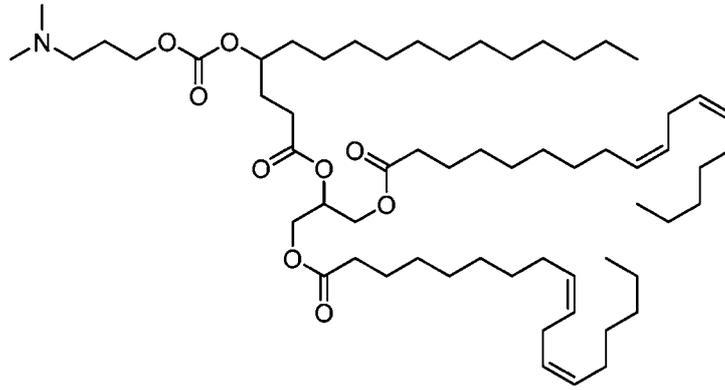


и его фармацевтически приемлемые соли. В определенных вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:

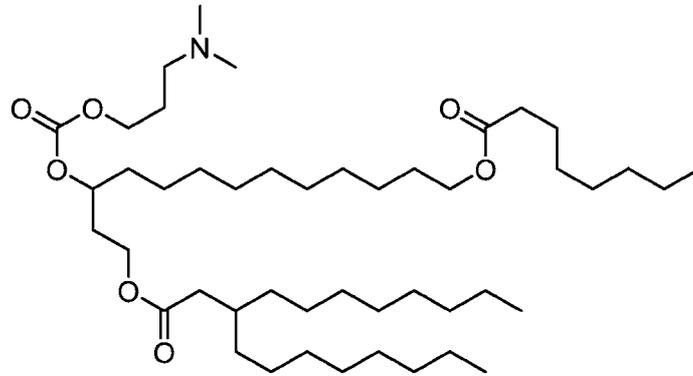


и его фармацевтически приемлемые соли. В определенных вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:

175

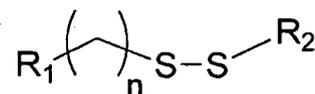


и его фармацевтически приемлемые соли. В определенных вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, имеющий следующую структуру соединения:

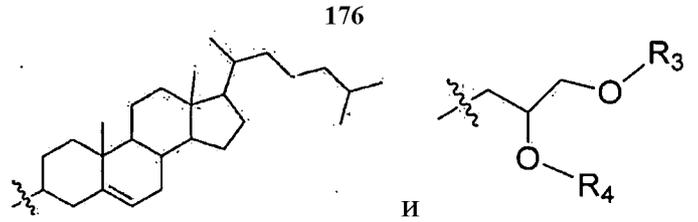


и его фармацевтически приемлемые соли.

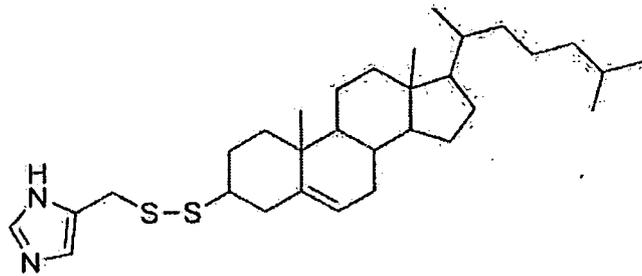
[0214] Другие подходящие катионные липиды для применения в композициях и способах по настоящему изобретению включают в себя расщепляемые катионные липиды, описанные в международной патентной публикации WO 2012/170889, которая включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид следующей формулы:



где  $R_1$  выбран из группы, состоящей из имидазола, гуанидиния, амина, имида, енамина, необязательно замещенного алкиламино (например, такого алкиламино, как диметиламино) и пиридила; где  $R_2$  выбран из группы, состоящей из одной из следующих двух формул:

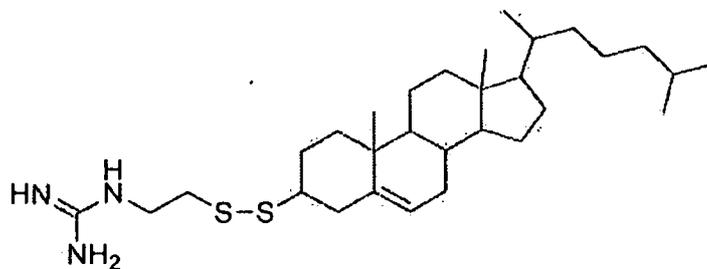


и где каждый из  $R_3$  и  $R_4$  независимо выбран из группы, состоящей из необязательно замещенного характеризующегося переменной насыщенностью или ненасыщенного  $C_6-C_{20}$ -алкила и необязательно замещенного характеризующегося переменной насыщенностью или ненасыщенного  $C_6-C_{20}$ -ацила; и где  $n$  представляет собой ноль или любое положительное целое число (например, один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать, двадцать или больше). В определенных вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид «HGT4001», имеющий следующую структуру соединения:



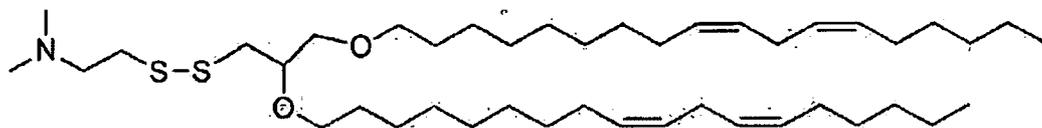
(HGT4001),

и его фармацевтически приемлемые соли. В определенных вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид «HGT4002», имеющий следующую структуру соединения:



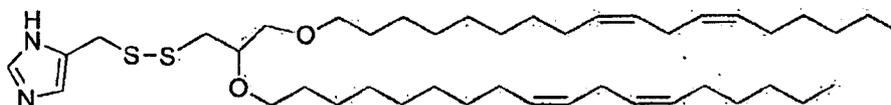
(HGT4002),

и его фармацевтически приемлемые соли. В определенных вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид «HGT4003», имеющий следующую структуру соединения:



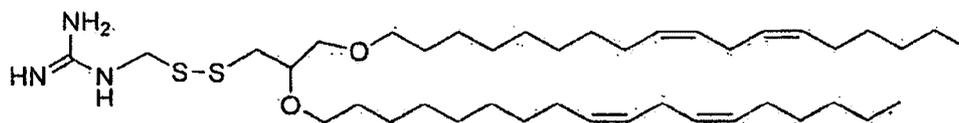
(HGT4003),

и его фармацевтически приемлемые соли. В определенных вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид «HGT4004», имеющий следующую структуру соединения:



(HGT4004),

и его фармацевтически приемлемые соли. В определенных вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид «HGT4005», имеющий следующую структуру соединения:

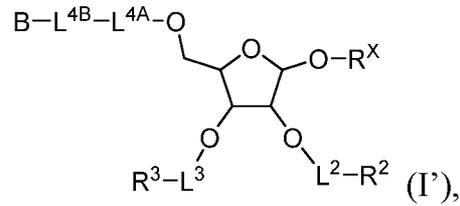


(HGT4005),

и его фармацевтически приемлемые соли.

[0215] Другие подходящие катионные липиды для применения в композициях и способах по настоящему изобретению включают в себя расщепляемые катионные липиды, описанные в предварительной заявке на патент США № 62/672194, поданной 16 мая 2018 года и включенной в данный документ посредством ссылки. В определенных вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, который имеет любую из общих формул или любую из структур (1a)-(21a), и (1b)-(21b), и (22)-(237), описанных в предварительной заявке на патент США № 62/672194. В определенных вариантах

осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, который имеет структуру согласно формуле (I'),



где:

$\text{R}^{\text{X}}$  представляет собой независимо -H,  $-\text{L}^1\text{-R}^1$  или  $-\text{L}^{5\text{A}}\text{-L}^{5\text{B}}\text{-B}'$ ;

каждый из  $\text{L}^1$ ,  $\text{L}^2$  и  $\text{L}^3$  представляют собой независимо ковалентную связь,  $-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{S}-$  или  $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^{\text{L}}-$ ;

каждый  $\text{L}^{4\text{A}}$  и  $\text{L}^{5\text{A}}$  представляют собой независимо  $-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$  или  $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^{\text{L}}-$ ;

каждый  $\text{L}^{4\text{B}}$  и  $\text{L}^{5\text{B}}$  представляют собой независимо  $\text{C}_1\text{-C}_{20}$ алкилен;  $\text{C}_2\text{-C}_{20}$ алкенилен или  $\text{C}_2\text{-C}_{20}$ алкинилен;

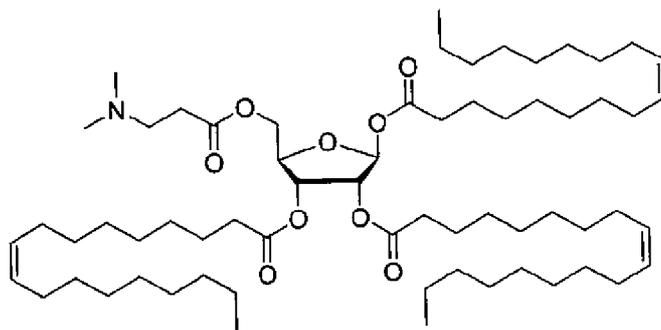
каждый B и B' представляют собой  $\text{NR}^4\text{R}^5$  или 5—10-членный азотсодержащий гетероарил;

каждый  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$  и  $\text{R}^3$  представляют собой независимо  $\text{C}_6\text{-C}_{30}$ алкил,  $\text{C}_6\text{-C}_{30}$ алкенил или  $\text{C}_6\text{-C}_{30}$ алкинил;

каждый  $\text{R}^4$  и  $\text{R}^5$  представляют собой независимо водород,  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ алкил;  $\text{C}_2\text{-C}_{10}$ алкенил или  $\text{C}_2\text{-C}_{10}$ алкинил и

каждый  $\text{R}^{\text{L}}$  представляет собой независимо водород,  $\text{C}_1\text{-C}_{20}$ алкил,  $\text{C}_2\text{-C}_{20}$ алкенил или  $\text{C}_2\text{-C}_{20}$ алкинил.

В определенных вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид, который представляет собой соединение (139) из 62/672194, имеющее следующую структуру соединения:



(«рибозосодержащий липид с углеродным хвостом 18:1»).

[0216] В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают катионный липид хлорид N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмония («DOTMA»). (Feigner et al. (Proc. Nat'l Acad. Sci. 84, 7413 (1987); патент США № 4897355, который включен в данный документ посредством ссылки). Другие катионные липиды, подходящие для композиций и способов по настоящему изобретению, включают в себя, например, 5-карбоксиспермилглициндиоктадециламид («DOGS»), 2,3-диолеилокси-N-[2(сперминкарбоксамидо)этил]-N,N-диметил-1-пропанаминий («DOSPA») (Behr et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. 86, 6982 (1989); патент США № 5171678; патент США № 5334761), 1,2-диолеоил-3-диметиламмонийпропан («DODAP»), 1,2-диолеоил-3-триметиламмонийпропан («DOTAP»).

[0217] Дополнительные иллюстративные катионные липиды, подходящие для композиций и способов по настоящему изобретению, также включают 1,2-дистеарилокси-N,N-диметил-3-аминопропан («DSDMA»), 1,2-диолеилокси-N,N-диметил-3-аминопропан («DODMA»), 1,2-дилинолеилокси-N,N-диметил-3-аминопропан («DLinDMA»), 1,2-дилиноленилокси-N,N-диметил-3-аминопропан («DLenDMA»), хлорид N-диолеил-N,N-диметиламмония («DODAC»), бромид N,N-дистеарил-N,N-диметиламмония («DDAB»), бромид N-(1,2-димиристилоксипроп-3-ил)-N,N-диметил-N-гидроксиэтиламмония («DMRIE»), 3-диметиламино-2-(холест-5-ен-3-бета-оксибутан-4-окси)-1-(цис,цис-9,12-октадекадиенокси)пропан («CLinDMA»), 2-[5'-(холест-5-ен-3-бета-окси)-3'-оксапентокси]-3-диметил-1-(цис,цис-9',12'-октадекадиенокси)пропан («CpLinDMA»), N,N-диметил-3,4-диолеилоксибензиламин («DMOVA»), 1,2-N,N'-диолеилкарбамил-3-диметиламинопропан («DOcarbDAP»), 2,3-дилинолеилокси-N,N-диметилпропиламин («DLinDAP»), 1,2-N,N'-

дилинолеилкарбамил-3-диметиламинопропан («DLincarbDAP»), 1,2-дилинолеилкарбамил-3-диметиламинопропан («DLinCDAP»), 2,2-дилинолеил-4-диметиламинометил-[1,3]-диоксолан («DLin-K-DMA»); 2-((8-[(3P)-холест-5-ен-3-илокси]октил)окси)-N,N-диметил-3-[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси]пропан-1-амин («октил-CLinDMA»); (2R)-2-((8-[(3-бета)-холест-5-ен-3-илокси]октил)окси)-N,N-диметил-3-[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси]пропан-1-амин («октил-CLinDMA (2R)»); (2S)-2-((8-[(3P)-холест-5-ен-3-илокси]октил)окси)-N,N-диметил-3-[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси]пропан-1-амин («октил-CLinDMA (2S)»); 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан («DLin-K-ХТС2-DMA») и 2-(2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)-1,3-диоксолан-4-ил)-N,N-диметилэтанамин («DLin-KC2-DMA») (см. WO 2010/042877, которая включена в данный документ посредством ссылки; Semple et al., Nature Biotech. 28: 172-176 (2010)). (Heyes, J., et al., J Controlled Release 107: 276-287 (2005); Morrissey, DV., et al., Nat. Biotechnol. 23(8): 1003-1007 (2005); международная патентная публикация WO 2005/121348). В некоторых вариантах осуществления один или более катионных липидов содержат по меньшей мере один из имидазольного, диалкиламинового или гуанидиниевого фрагментов.

[0218] В некоторых вариантах осуществления один или более катионных липидов, подходящих для композиций и способов по настоящему изобретению, включают в себя 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан («ХТС»); (3aR,5s,6aS)-N,N-диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диенил)тетрагидро-3aH-циклопента[d][1,3]диоксол-5-амин («ALNY-100») и/или 4,7,13-трис(3-оксо-3-(ундециламино)пропил)-N1,N16-диундецил-4,7,10,13-тетраазагексадекан-1,16-диамид («NC98-5»).

[0219] В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению содержат один или более катионных липидов, которые составляют по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 20%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65% или 70% при измерении по весу от общего содержания липидов в композиции, например, липидной наночастице. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению содержат один или более катионных липидов, которые составляют по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 20%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65% или 70% при измерении в мол. % от общего

содержания липидов в композиции, например липидной наночастице. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению содержат один или более катионных липидов, которые составляют приблизительно 30-70% (например, приблизительно 30-65%, приблизительно 30-60%, приблизительно 30-55%, приблизительно 30-50%, приблизительно 30-45%, приблизительно 30-40%, приблизительно 35-50%, приблизительно 35-45% или приблизительно 35-40%) при измерении по весу от общего содержания липидов в композиции, например, липидной наночастице. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению содержат один или более катионных липидов, которые составляют приблизительно 30-70% (например, приблизительно 30-65%, приблизительно 30-60%, приблизительно 30-55%, приблизительно 30-50%, приблизительно 30-45%, приблизительно 30-40%, приблизительно 35-50%, приблизительно 35-45% или приблизительно 35-40%) при измерении в мол. % от общего содержания липидов в композиции, например, липидной наночастице.

*Некатионные/ вспомогательные липиды*

[0220] В некоторых вариантах осуществления предусмотренные липосомы содержат один или более некатионных липидов («вспомогательные»). Используемое в данном документе выражение «некатионный липид» относится к любому нейтральному, цвиттерионному или анионному липиду. Используемая в данном документе фраза «анионный липид» относится к любому из ряда липидных соединений, которые несут суммарный отрицательный заряд при выбранном pH, таком как физиологический pH. Некатионные липиды включают в себя без ограничения дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеоилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеоилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеоилфосфатидилэтанолламин (DOPE), пальмитоилолеоилфосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеоилфосфатидилэтанолламин (POPE), диолеоилфосфатидилэтанолламин-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат (DOPE-mal), дипальмитоилфосфатидилэтанолламин (DPPE), димиристоилфосфоэтанолламин (DMPE), дистеароилфосфатидилэтанолламин (DSPE), фосфатидилсерин, сфинголипиды, цереброзиды, ганглиозиды, 16-О-монометил-PE,

16-О-диметил-PE, 18-1-транс-PE, 1-стеароил-2-олеоилфосфатидилэтаноламин (SOPE) или их смесь.

[0221] В некоторых вариантах осуществления такие некаатионные липиды могут использоваться отдельно, но предпочтительно используются в комбинации с другими липидами, например катионными липидами. В некоторых вариантах осуществления некаатионный липид может характеризоваться молярным соотношением от приблизительно 5% до приблизительно 90% или от приблизительно 10% до приблизительно 70% от общего количества липидов, присутствующих в липосоме. В некоторых вариантах осуществления некаатионный липид представляет собой нейтральный липид, т. е. липид, который не несет суммарный заряд при условиях, в которых составляется и/или вводится композиция. В некоторых вариантах осуществления процентное содержание некаатионного липида в липосоме может составлять более чем 5%, более чем 10%, более чем 20%, более чем 30% или более чем 40%.

#### *Липиды на основе холестерина*

[0222] В некоторых вариантах осуществления предусмотренные липосомы содержат один или более липидов на основе холестерина. Например, подходящие катионные липиды на основе холестерина включают, например, DC-Chol (N,N-диметил-N-этилкарбоксамидохолестерин), 1,4-бис(3-N-олеиламинопропил)пиперазин (Gao, et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 179, 280 (1991); Wolf et al. BioTechniques 23, 139 (1997); патент США № 5744335) или ICE. В некоторых вариантах осуществления липид на основе холестерина может характеризоваться молярным соотношением от приблизительно 2% до приблизительно 30% или от приблизительно 5% до приблизительно 20% от общего количества липидов, присутствующих в липосоме. В некоторых вариантах осуществления процентное содержание липида на основе холестерина в липидной наночастице может составлять более чем 5%, более чем 10%, более чем 20%, более чем 30% или более чем 40%.

#### *PEG-модифицированные липиды*

[0223] Применение полиэтиленгликоль (PEG)-модифицированных фосфолипидов и дериватизированных липидов, таких как дериватизированные церамиды (PEG-CER), включая N-октаноил-сфингозин-1-

[сукцинил(метоксиполиэтиленгликоль)-2000] (церамид С8 PEG-2000), также предусмотрено в настоящем изобретении либо отдельно, либо предпочтительно в комбинации с другими липидными составами, вместе с которыми они составляют среду-носитель для переноса (например, липидную наночастицу). Рассматриваемые PEG-модифицированные липиды включают без ограничения полиэтиленгликолевую цепь до S кДа в длину, ковалентно присоединенную к липиду с алкильной(алкильными) цепью(цепями) длиной C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>. Добавление таких компонентов может предотвращать агрегацию комплекса, а также может обеспечивать средство повышения продолжительности циркуляции и усиления доставки композиции на основе липида и нуклеиновой кислоты в целевые ткани (Klibanov et al. (1990) FEBS Letters, 268 (1): 235-237), или могут быть выбраны такие компоненты, которые быстро удаляются из состава за счет обмена *in vivo* (см. патент США № 5885613). Особенно применимыми способными к обмену липидами являются PEG-церамиды, имеющие более короткие ацильные цепи (например, C14 или C18). PEG-модифицированный фосфолипид и дериватизированные липиды по настоящему изобретению могут характеризоваться молярным соотношением, составляющим от приблизительно 0% до приблизительно 20%, от приблизительно 0,5% до приблизительно 20%, от приблизительно 1% до приблизительно 15%, от приблизительно 4% до приблизительно 10% или приблизительно 2% от общего количества липидов, присутствующих в липосомной среде-носителе для переноса.

[0224] В различных вариантах осуществления выбор катионных липидов, некаатионных липидов и/или PEG-модифицированных липидов, которые составляют липидную наночастицу, а также относительного молярного соотношения таких липидов друг к другу, основан на характеристиках выбранного(выбранных) липида(липидов), природе предполагаемых целевых клеток, характеристиках МСNA, подлежащей доставке. К дополнительным факторам, которые необходимо учитывать, относится, например, насыщенность алкильной цепи, а также размер, заряд, рН, рКа, фузогенность и токсичность выбранного(выбранных) липида(липидов). Таким образом, можно соответствующим образом корректировать молярные соотношения.

*Полимеры*

[0225] В некоторых вариантах осуществления подходящую среду-носитель для доставки составляют с использованием полимера в качестве носителя, отдельно или в комбинации с другими носителями, в том числе различными липидами, описанными в данном документе. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления липосомные среды-носители для доставки, как используется в данном документе, также охватывают наночастицы, содержащие полимеры. Подходящие полимеры могут включать, например, полиакрилаты, полиалкилцианоакрилаты, полилактид, сополимеры полилактида и полигликолида, поликапролактоны, декстран, альбумин, желатин, альгинат, коллаген, хитозан, циклодекстрины, протамин, пегилированный протамин, PLL, пегилированный PLL и полиэтиленимин (PEI). Если присутствует PEI, это может быть разветвленный PEI с молекулярной массой, находящейся в диапазоне от 10 до 40 кДа, например, разветвленный PEI 25 кДа (Sigma, № 408727).

[0226] Подходящая липосома для настоящего изобретения может содержать один или более из любых катионных липидов, некатионных липидов, липидов на основе холестерина, PEG-модифицированных липидов и/или полимеров, описанных в данном документе, в различных отношениях. В качестве неограничивающих примеров подходящий липосомный состав может включать комбинацию, выбранную из сКК-Е12, DOPE, холестерина и DMG-PEG2K; С12-200, DOPE, холестерина и DMG-PEG2K; HGT4003, DOPE, холестерина и DMG-PEG2K; ICE, DOPE, холестерина и DMG-PEG2K или ICE, DOPE и DMG-PEG2K.

[0227] В различных вариантах осуществления катионные липиды (*например*, сКК-Е12, С12-200, ICE и/или HGT4003) составляют приблизительно 30-60% (*например*, приблизительно 30-55%, приблизительно 30-50%, приблизительно 30-45%, приблизительно 30-40%, приблизительно 35-50%, приблизительно 35-45% или приблизительно 35-40%) липосомы по молярному отношению. В некоторых вариантах осуществления процентное содержание катионных липидов (*например*, сКК-Е12, С12-200, ICE и/или HGT4003) составляет или превышает приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55% или приблизительно 60% липосомы по молярному отношению.

[0228] В некоторых вариантах осуществления соотношение катионного(катионных) липида(липидов), и некатионного(некатионных) липида(липидов), и липида(липидов) на основе холестерина, и PEG-модифицированного(модифицированных) липида(липидов) может составлять приблизительно 30-60:25-35:20-30:1-15 соответственно. В некоторых вариантах осуществления соотношение катионного(катионных) липида(липидов), и некатионного(некатионных) липида(липидов), и липида(липидов) на основе холестерина, и PEG-модифицированного(модифицированных) липида(липидов) составляет приблизительно 40:30:20:10 соответственно. В некоторых вариантах осуществления соотношение катионного(катионных) липида(липидов), и некатионного(некатионных) липида(липидов), и липида(липидов) на основе холестерина, и PEG-модифицированного(модифицированных) липида(липидов) составляет приблизительно 40:30:25:5 соответственно. В некоторых вариантах осуществления соотношение катионного(катионных) липида(липидов), и некатионного(некатионных) липида(липидов), и липида(липидов) на основе холестерина, и PEG-модифицированного(модифицированных) липида(липидов) составляет приблизительно 40:32:25:3 соответственно. В некоторых вариантах осуществления соотношение катионного(катионных) липида(липидов), и некатионного(некатионных) липида(липидов), и липида(липидов) на основе холестерина, и PEG-модифицированного(модифицированных) липида(липидов) составляет приблизительно 50:25:20:5.

*Соотношение отдельных липидных компонентов*

[0229] В вариантах осуществления, где липидная наночастица содержит три и не более трех отдельных компонентов, представляющих собой липиды, соотношение общего содержания липидов (т. е. соотношение липидный компонент (1): липидный компонент (2): липидный компонент (3)) может быть представлено в виде  $x:y:z$ , где

$$(y + z) = 100 - x.$$

[0230] В некоторых вариантах осуществления каждый из «x», «y» и «z» представляет молярные проценты трех отдельных компонентов, представляющих собой липиды, а соотношение представляет собой молярное соотношение.

[0231] В некоторых вариантах осуществления каждый из «x», «y» и «z» представляет весовые проценты трех отдельных компонентов, представляющих собой липиды, а соотношение представляет собой весовое соотношение.

[0232] В некоторых вариантах осуществления липидный компонент (1), представленный переменной «x», представляет собой катионный липид на основе стерина.

[0233] В некоторых вариантах осуществления липидный компонент (2), представленный переменной «y», представляет собой вспомогательный липид.

[0234] В некоторых вариантах осуществления липидный компонент (3), представленный переменной «z», представляет собой липид с PEG.

[0235] В некоторых вариантах осуществления переменная «x», представляющая молярный процент липидного компонента (1) (например, катионного липида на основе стерина), составляет по меньшей мере приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95%.

[0236] В некоторых вариантах осуществления переменная «x», представляющая молярный процент липидного компонента (1) (например, катионного липида на основе стерина), составляет не более чем приблизительно 95%, приблизительно 90%, приблизительно 85%, приблизительно 80%, приблизительно 75%, приблизительно 70%, приблизительно 65%, приблизительно 60%, приблизительно 55%, приблизительно 50%, приблизительно 40%, приблизительно 30%, приблизительно 20% или приблизительно 10%. В вариантах осуществления переменная «x» составляет не более чем приблизительно 65%, приблизительно 60%, приблизительно 55%, приблизительно 50%, приблизительно 40%.

[0237] В некоторых вариантах осуществления переменная «x», представляющая молярный процент липидного компонента (1) (например, катионного липида на основе стерина), составляет: по меньшей мере приблизительно 50%, но менее чем приблизительно 95%; по меньшей мере приблизительно 50%, но менее чем приблизительно 90%; по меньшей мере приблизительно 50%, но менее чем

приблизительно 85%; по меньшей мере приблизительно 50%, но менее чем приблизительно 80%; по меньшей мере приблизительно 50%, но менее чем приблизительно 75%; по меньшей мере приблизительно 50%, но менее чем приблизительно 70%; по меньшей мере приблизительно 50%, но менее чем приблизительно 65%; или по меньшей мере приблизительно 50%, но менее чем приблизительно 60%. В вариантах осуществления переменная «х» составляет по меньшей мере приблизительно 50%, но менее чем приблизительно 70%; по меньшей мере приблизительно 50%, но менее чем приблизительно 65%; или по меньшей мере приблизительно 50%, но менее чем приблизительно 60%.

[0238] В некоторых вариантах осуществления переменная «х», представляющая весовой процент липидного компонента (1) (например, катионного липида на основе стерина), составляет по меньшей мере приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95%.

[0239] В некоторых вариантах осуществления переменная «х», представляющая весовой процент липидного компонента (1) (например, катионного липида на основе стерина), составляет не более чем приблизительно 95%, приблизительно 90%, приблизительно 85%, приблизительно 80%, приблизительно 75%, приблизительно 70%, приблизительно 65%, приблизительно 60%, приблизительно 55%, приблизительно 50%, приблизительно 40%, приблизительно 30%, приблизительно 20% или приблизительно 10%. В вариантах осуществления переменная «х» составляет не более чем приблизительно 65%, приблизительно 60%, приблизительно 55%, приблизительно 50%, приблизительно 40%.

[0240] В некоторых вариантах осуществления переменная «х», представляющая весовой процент липидного компонента (1) (например, катионного липида на основе стерина), составляет: по меньшей мере приблизительно 50%, но менее чем приблизительно 95%; по меньшей мере приблизительно 50%, но менее чем приблизительно 90%; по меньшей мере приблизительно 50%, но менее чем приблизительно 85%; по меньшей мере приблизительно 50%, но менее чем

приблизительно 80%; по меньшей мере приблизительно 50%, но менее чем приблизительно 75%; по меньшей мере приблизительно 50%, но менее чем приблизительно 70%; по меньшей мере приблизительно 50%, но менее чем приблизительно 65%; или по меньшей мере приблизительно 50%, но менее чем приблизительно 60%. В вариантах осуществления переменная «x» составляет по меньшей мере приблизительно 50%, но менее чем приблизительно 70%; по меньшей мере приблизительно 50%, но менее чем приблизительно 65%; или по меньшей мере приблизительно 50%, но менее чем приблизительно 60%.

[0241] В некоторых вариантах осуществления переменная «z», представляющая молярный процент липидного компонента (3) (например, липида с PEG), составляет не более чем приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20% или 25%. В вариантах осуществления переменная «z», представляющая молярный процент липидного компонента (3) (например, липида с PEG), составляет приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%. В вариантах осуществления переменная «z», представляющая молярный процент липидного компонента (3) (например, липида с PEG), составляет от приблизительно 1% до приблизительно 10%, от приблизительно 2% до приблизительно 10%, от приблизительно 3% до приблизительно 10%, от приблизительно 4% до приблизительно 10%, от приблизительно 1% до приблизительно 7,5%, от приблизительно 2,5% до приблизительно 10%, от приблизительно 2,5% до приблизительно 7,5%, от приблизительно 2,5% до приблизительно 5%, от приблизительно 5% до приблизительно 7,5% или от приблизительно 5% до приблизительно 10%.

[0242] В некоторых вариантах осуществления переменная «z», представляющая весовой процент липидного компонента (3) (например, липида с PEG), составляет не более чем приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20% или 25%. В вариантах осуществления переменная «z», представляющая весовой процент липидного компонента (3) (например, липида с PEG), составляет приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%. В вариантах осуществления переменная «z», представляющая весовой процент липидного компонента (3) (например, липида с PEG), составляет от приблизительно 1% до приблизительно 10%, от приблизительно 2% до приблизительно 10%, от приблизительно 3% до приблизительно 10%, от

приблизительно 4% до приблизительно 10%, от приблизительно 1% до приблизительно 7,5%, от приблизительно 2,5% до приблизительно 10%, от приблизительно 2,5% до приблизительно 7,5%, от приблизительно 2,5% до приблизительно 5%, от приблизительно 5% до приблизительно 7,5% или от приблизительно 5% до приблизительно 10%.

[0243] Для композиций, содержащих три и только три отдельных липидных компонента, переменные «x», «y» и «z» могут быть в любой комбинации при условии, что сумма трех переменных составляет 100% от общего содержания липидов.

*Формирование липосом, инкапсулирующих мРНК*

[0244] Липосомные среды-носители для переноса для применения в композициях по настоящему изобретению могут быть получены посредством различных методик, которые в настоящее время известны в данной области техники. Липосомы для применения в предусмотренных композициях могут быть получены посредством различных методик, которые в настоящее время известны в данной области техники. Например, многослойные везикулы (MLV) могут быть получены в соответствии с обычными методиками, например путем осаждения выбранного липида на внутреннюю стенку подходящего контейнера или сосуда путем растворения липида в соответствующем растворителе, а затем выпаривания растворителя с получением тонкой пленки на внутренней стороне сосуда, или с помощью распылительной сушки. Затем в сосуд можно добавить водную фазу путем вихревого перемешивания, что приводит к образованию MLV. Затем могут образовываться однослойные везикулы (ULV) с помощью гомогенизации, обработки ультразвуком или экструзии многослойных везикул. Кроме того, однослойные везикулы могут образовываться с помощью методик с удалением детергента.

[0245] В некоторых вариантах осуществления предусмотренные композиции содержат липосому, в которой мРНК ассоциирована как с поверхностью липосомы, так и инкапсулирована в той же липосоме. Например, во время приготовления композиций по настоящему изобретению катионные липосомы могут ассоциировать с мРНК посредством электростатических взаимодействий. Например, во время

приготовления композиций по настоящему изобретению катионные липосомы могут ассоциировать с мРНК посредством электростатических взаимодействий.

[0246] В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают мРНК, инкапсулированную в липосому. В некоторых вариантах осуществления один или более видов мРНК могут быть инкапсулированы в одну и ту же липосому. В некоторых вариантах осуществления один или более видов мРНК могут быть инкапсулированы в разные липосомы. В некоторых вариантах осуществления мРНК инкапсулирована в одну или более липосом, отличающихся своим липидным составом, молярным соотношением липидных компонентов, размером, зарядом (дзета-потенциалом), нацеливающими лигандами и/или их комбинациями. В некоторых вариантах осуществления одна или более липосом могут иметь другой состав катионных липидов на основе стеринов, нейтральных липидов, PEG-модифицированных липидов и/или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления одна или более липосом могут иметь различное молярное соотношение катионного липида на основе холестерина, нейтрального липида и PEG-модифицированного липида, используемых для создания липосомы.

[0247] Процесс включения требуемой мРНК в липосому часто называют «загрузкой». Иллюстративные способы описаны в Lasic, et al., FEBS Lett., 312: 255-258, 1992, которая включена в данный документ посредством ссылки. Встроенные в липосомы нуклеиновые кислоты могут быть полностью или частично расположены во внутреннем пространстве липосомы, внутри двухслойной мембраны липосомы, или ассоциированы с внешней поверхностью липосомной мембраны. Включение нуклеиновой кислоты в липосомы также упоминается в данном документе как «инкапсуляция», при которой нуклеиновая кислота полностью содержится во внутреннем пространстве липосомы. Целью включения мРНК в среду-носитель для переноса, такую как липосома, часто является защита нуклеиновой кислоты от окружающей среды, которая может содержать ферменты или химические вещества, разрушающие нуклеиновые кислоты, и/или системы или рецепторы, обуславливающие быстрое выведение нуклеиновых кислот. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления подходящая среда-носитель для доставки способна повышать стабильность содержащейся в ней мРНК и/или облегчать доставку мРНК в целевую клетку или ткань.

[0248] Подходящие липосомы в соответствии с настоящим изобретением могут быть изготовлены различных размеров. В некоторых вариантах осуществления предусмотренные липосомы могут быть меньше, чем ранее известные липосомы для инкапсулирования мРНК. В некоторых вариантах осуществления уменьшение размера липосом ассоциировано с более эффективной доставкой мРНК. При выборе соответствующего размера липосомы может учитываться местонахождение целевой клетки или ткани и, в некоторой степени, вариант применения, для которого изготавливается липосома.

[0249] В некоторых вариантах осуществления подходящий размер липосомы выбирается для облегчения системного распределения антитела, кодируемого мРНК. В некоторых вариантах осуществления может иметься необходимость в ограничении уровня трансфекции мРНК в определенные клетки или ткани. Например, для нацеливания на гепатоциты размер липосомы может быть таким, чтобы ее размеры были меньше, чем поры эндотелиального слоя, выстилающего печеночные синусоиды в печени; в таких случаях липосома может легко проникать через такие эндотелиальные поры, чтобы достичь целевых гепатоцитов.

[0250] В качестве альтернативы или дополнительно может обеспечиваться такой размер липосомы, чтобы габариты липосомы предусматривали диаметр, достаточный для ограничения или явного предотвращения распространения в определенные клетки или ткани.

[0251] Для сортировки по размеру популяции липосом доступно множество альтернативных способов, известных в данной области техники. Один из таких способов сортировки по размеру описан в патенте США № 4737323, включенном в данный документ посредством ссылки. Обработка липосомной суспензии ультразвуком либо в ванне, либо зондом, приводит к постепенному уменьшению размера вплоть до получения небольшой ULV диаметром менее чем приблизительно 0,05 микрона. Гомогенизация является еще одним способом, основанным на энергии сдвига для фрагментации крупных липосом на более мелкие. В типичной процедуре гомогенизации обеспечивают рециркуляцию MLV через стандартный гомогенизатор эмульсий до тех пор, пока не будут наблюдаться выбранные размеры липосом, обычно от приблизительно 0,1 микрона до 0,5 микрона. Размер липосом можно

определить с помощью квазиэлектрического светорассеяния (QELS), как описано в Bloomfield, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 10:421-150 (1981), включенной в данный документ посредством ссылки. Средний диаметр липосомы может быть уменьшен путем обработки сформированных липосом ультразвуком. Для осуществления эффективного синтеза липосом периодические циклы обработки ультразвуком можно чередовать с оценкой на основе QELS.

### *Терапевтическое применение композиций*

[0252] В одном аспекте настоящее изобретение, среди прочего, обеспечивает способ индуцирования экспрессии CFTR *in vivo* путем введения нуклеиновых кислот, кодирующих модифицированный белок CFTR, или путем введения модифицированного белка CFTR. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит нуклеиновые кислоты, инкапсулированные в среде-носителе для доставки или в комплексе с ней. В некоторых вариантах осуществления среда-носитель для доставки выбрана из группы, состоящей из липосом, липидных наночастиц, твердых липидных наночастиц, полимеров, вирусов, золь-гелей и наногелей. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие модифицированный белок CFTR, упакованы в вирусную частицу.

### *Генная терапия*

[0253] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую нуклеиновые кислоты, кодирующие модифицированный белок CFTR, используют для лечения нуждающихся в этом субъектов. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую описанный в данном документе вектор на основе гAAV, применяют для лечения нуждающихся в этом субъектов. Фармацевтическая композиция, содержащая вектор или частицу на основе гAAV по настоящему изобретению, содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, разбавитель или носитель. Примеры подходящих фармацевтических носителей хорошо известны в данной области техники и включают забуференные фосфатом солевые растворы, воду, эмульсии, такие как эмульсии масло/вода, различные типы смачивающих средств, стерильные растворы и т. п. Фармацевтическая композиция может быть в лиофилизированной форме. Такие

носители могут быть составлены обычными способами и введены субъекту в терапевтически эффективном количестве.

[0254] Вектор на основе гAAV вводят нуждающемуся в этом субъекту подходящим путем. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV вводят внутривенным, внутрибрюшинным, подкожным или внутрикожным путями. В одном варианте осуществления вектор на основе гAAV вводят внутривенно. В вариантах осуществления внутрикожное введение включает введение с применением «генной пушки» или системы доставки частиц на основе биолистики. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV вводят с помощью липидной наночастицы, не являющейся вирусной. Например, композиция, содержащая вектор на основе гAAV, может содержать один или более разбавителей, буферов, липосом, липидов, липидных комплексов. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV содержится в микросфере или наночастице, такой как липидная наночастица или неорганическая наночастица.

[0255] В некоторых вариантах осуществления гAAV является псевдотипированным. Псевдотипированный гAAV представляет собой инфекционный вирус, содержащий любую комбинацию капсидного белка AAV и генома гAAV. Псевдотипированные гAAV являются применимыми для изменения тканевой или клеточной специфичности гAAV и могут применяться отдельно или в сочетании с непсевдотипированными гAAV для переноса одного или более генов в клетку, например в клетку млекопитающего. Например, псевдотипированный гAAV можно использовать после введения непсевдотипированного гAAV млекопитающему, у которого развился иммунный ответ на непсевдотипированный гAAV. Капсидные белки любого серотипа AAV можно использовать с геномом гAAV, который получен или может быть получен из генома AAV дикого типа другого серотипа или который представляет собой химерный геном, т. е. образованный из ДНК AAV двух или более разных серотипов, например химерный геном, содержащий 2 ITR, где каждая ITR получена из другого серотипа, или являются химерными ITR. Применение химерных геномов, таких как геномы, содержащие ITR двух серотипов AAV, или химерные ITR, может привести к направленной рекомбинации, которая может обеспечить дополнительное усиление продуцирования транскрипционно-активных межмолекулярных конкатамеров. Таким образом, 5'- и 3'-ITR в векторе на основе

гAAV по настоящему изобретению могут быть гомологичными, т. е. принадлежать к одному и тому же серотипу, гетерологичными, т. е. относиться к разным серотипам, или химерными, т. е. ITR, которая содержит последовательности ITR из более чем одного серотипа AAV.

[0256] В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV представляет собой вектор на основе AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 или AAV11. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV представляет собой AAV1. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV представляет собой AAV2. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV представляет собой AAV3. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV представляет собой AAV4. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV представляет собой AAV5. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV представляет собой AAV6. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV представляет собой AAV7. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV представляет собой AAV8. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV представляет собой AAV9. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV представляет собой AAV10. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV представляет собой AAV11. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV оптимизирован по последовательности. В некоторых вариантах осуществления капсид гAAV является модифицированным. Например, в некоторых вариантах осуществления капсид гAAV8 является модифицированным.

#### *Заместительная белковая терапия*

[0257] Термин «замещение белка» относится к введению ненативного очищенного белка индивидууму с дефицитом такого белка. В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок CFTR по настоящему изобретению можно использовать для лечения субъектов, страдающих от недостаточности белка CFTR.

[0258] Модифицированный белок CFTR можно вводить в виде чистого соединения, но преимущественно он представлен в форме фармацевтического препарата. В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок CFTR

вводят в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок CFTR может быть составлен для перорального, парентерального или ректального введения или в формах, подходящих для введения путем ингаляции или инсуффляции (либо через рот, либо через нос).

[0259] В случае, если фармацевтические препараты предназначены для перорального введения, они находятся в форме, например, таблеток или капсул, приготовленных известными способами с фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, такими как связующие вещества (например, прежелатинизированный кукурузный крахмал, поливинилпирролидон или метилцеллюлоза); наполнители (например, лактоза, микрокристаллическая целлюлоза или гидрофосфат кальция); добавки (например, стеарат магния, тальк, диоксид кремния); разрыхлители (например, картофельный крахмал); и/или смазывающие вещества (например, лаурилсульфат натрия). Таблетки могут быть покрыты с использованием известных способов. Жидкие препараты для перорального введения имеют форму, например, растворов, сиропов или суспензий, или могут быть в форме сухого продукта, который перед применением можно растворить в воде или другой жидкости. Указанные препараты готовят известными способами с фармацевтически приемлемыми добавками, такими как суспендирующие средства (например, сорбит, производные целлюлозы, пищевые гидрогенизированные жиры); эмульгаторы (например, лецитин или аравийская камедь); неводные жидкости (например, миндальное масло, масляные эфиры, этиловый спирт или фракционированные растительные масла) и/или консерванты (например, метил- или пропилгидроксibenзоаты, сорбиновая кислота или аскорбиновая кислота). Препараты могут также содержать, в соответствующих случаях, буферные соли, красители, вкусо-ароматические вещества и/или подсластители.

[0260] Препараты для перорального введения составляют известным образом, чтобы обеспечить контролируемое высвобождение активного соединения.

[0261] В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок CFTR составляют известным образом для парентерального введения посредством инъекции или непрерывного введения. Составы для инъекции предпочтительно находятся в форме единиц дозирования, например в ампулах или многодозовых контейнерах,

содержащих консерванты. Композиция может быть в форме суспензии, в виде водных или маслянистых жидкостей и может содержать элементы состава в качестве диспергирующих и стабилизирующих средств. В качестве альтернативы, активное соединение может быть в форме порошка, растворяемого непосредственно перед применением в требуемой жидкости, такой как стерильная вода.

[0262] В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок CFTR может быть составлен для ректального введения в виде суппозитория или клизм, например, содержащих вспомогательные вещества для суппозитория известного типа, такие как масло какао или другие глицериды.

[0263] В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок CFTR также составляют известным образом в виде композиций с замедленным высвобождением. Эти композиции с замедленным высвобождением вводят, например, с помощью имплантата (например, подкожного или внутримышечного) или внутримышечной инъекции. Поэтому, например, модифицированный белок CFTR составляют с подходящими полимерными или гидрофобными материалами (такими как эмульсия или масло), или ионообменными смолами, или относительно слабо растворимыми производными, такими как относительно слабо растворимые соли.

[0264] В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок CFTR вводят путем интраназальной доставки. В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок CFTR составлен для введения с помощью (известного) устройства, например, в виде порошка с подходящей средой-носителем. В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок CFTR вводят посредством легочной доставки.

[0265] В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок CFTR вводят согласно подходящему графику введения доз, например, еженедельно, два раза в неделю, ежемесячно, два раза в месяц и т. д. В определенных вариантах осуществления модифицированный белок CFTR вводят один раз в неделю путем ингаляции. Активированный белок CFTR можно вводить в любом терапевтически эффективном количестве.

**ПРИМЕРЫ**

[0266] Хотя определенные соединения, композиции и способы по настоящему изобретению были описаны конкретно в соответствии с определенными вариантами осуществления, следующие примеры служат исключительно для иллюстрации соединений по настоящему изобретению и не предназначены для его ограничения.

*Пример 1. Схематическая модель регуляции активности канала регулятора трансмембранной проводимости при кистозном фиброзе (CFTR)*

[0267] Этот пример иллюстрирует схематическую модель регуляции активности канала CFTR (фиг. 1).

[0268] Вкратце, CFTR представляет собой хлоридный канал, расположенный в апикальной мембране эпителия и состоящий из 5 доменов: двух трансмембранных доменов (TMD1 и TMD2) с шестью трансмембранными сегментами, каждый из которых образует пору хлоридного канала, двух нуклеотид-связывающих доменов (NBD1 и NBD2), которые взаимодействуют с АТФ и гидролизуют его, а также пятого уникального неструктурированного регуляторного домена, называемого R-доменом.

[0269] Димеризации NBD1-NBD2 способствует фосфорилирование уникального R-домена цАМФ-зависимой протеинкиназой А (РКА). Кроме того, фосфорилирование R-домена регулирует активность CFTR посредством механизмов, независимых от АТФ-индуцированной димеризации NBD.

[0270] CFTR является единственным известным ионным каналом в суперсемействе переносчиков АТФ-связывающей кассеты (ABC). Связывание АТФ с каждым из двух сайтов в нуклеотид-связывающих доменах (поверхность контакта димера NBD1 и NBD2) CFTR вызывает конформационные перестройки трансмембранных доменов, связанных с цитозольными петлями, что приводит к открытию хлоридного канала CFTR (фиг. 1). Гидролиз АТФ в сайте NBD2 приводит к закрытию канала.

*Пример 2. Конструирование мутантных вариантов белков CFTR с повышенной активацией/стабильностью*

[0271] Этот пример иллюстрирует аминокислотные остатки CFTR, полученные в результате внесения мутаций в ген CFTR, которые приводят к активации и

открытию хлоридного канала CFTR. Например, здесь показаны активирующие мутации, которые представляют собой фосфомиметические мутации R-домена, мутации, затрагивающие АТФ-зависимое открытие/закрытие мембранного канала, и мутации, обеспечивающие повышение стабильности/экспрессии белка CFTR.

[0272] Неструктурированный регуляторный домен (R-домен) CFTR содержит несколько сайтов протеинкиназы А (РКА), которые при фосфорилировании обеспечивают открытие/закрытие хлоридного канала с помощью РКА.

[0273] В этом примере фосфомиметики R-домена были получены путем мутирования остатков, описанных в **таблице 5**, где X представляет собой любую аминокислоту. Фосфомиметики R-домена предусматривали мутантные варианты CFTR, такие как S-Quad-D (S660D, S737D, S795D, S813D) и S-Hex-D (S660D, S685D, S700D, S737D, S795D, S813D), при этом они предусматривают аминокислотные замены, обеспечивающие имитацию фосфорилированного CFTR, что приводит к активации (**фиг. 2А, таблица 3**).

**Таблица 5. Мутации, обеспечивающие активацию белка CFTR: фосфомиметики R-домена**

	S	S	S	S	T	S	S	S	S	S	T	T	S	S	S
	4	6	6	6	6	7	7	7	7	7	7	7	7	7	8
	2	6	7	8	9	0	1	3	5	6	8	8	9	9	1
	2	0	0	6	0	0	2	7	3	8	7	8	0	5	3
S-Quad-D (4D)		D						D						D	D
S-Hex-D (6D)		D		D		D		D						D	D
8-D		D		D		D	D	D		D				D	D
15-D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
15-A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
13-D	D	D	D	D	D	D	D		D		D	D	D	D	D
S-Oct-D		D		D		D	D	D		D				D	D
S-Quad-X		X						X						X	X
S-Hex-X		X		X		X		X						X	X
15-X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
13-X	X	X	X	X	X	X	X		X		X	X	X	X	X
S-Oct-X		X		X		X	X	X		X				X	X

[0274] Другая стратегия, используемая для конструирования мутантных вариантов с отличиями в активации CFTR, включала мутирование остатков, участвующих в осуществлении АТФ-зависимого открытия/закрытия мембранного канала, на любую другую аминокислоту, обозначенную X, как проиллюстрировано в таблице 6. Например, мутации K978C и E1371Q приводили к активации (фиг. 2B).

**Таблица 6. Мутации, обеспечивающие активацию белка CFTR: гидролиз АТФ**

	S 4 2 2	S 6 6 0	S 6 7 0	S 6 8 6	T 6 9 0	S 7 0 0	S 7 1 2	S 7 3 7	S 7 5 3	S 7 6 8	T 7 8 7	T 7 8 8	S 7 9 0	S 7 9 5	S 8 1 3	K 9 7 8	E 1 3 7 1
K978C																C	
E1371Q																	Q
15-A E1371Q	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A		Q
15-D E1371Q	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D		Q
K978X																X	
E1371X																	X
15-X E1371X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X

[0275] Белки CFTR подвергаются убиквитинированию по остаткам лизина. Аминокислотные мутации по остаткам лизина, которые приводят к замене лизина другим аминокислотным остатком, приводят к повышению стабильности и экспрессии белка CFTR (фиг. 2C). Иллюстративные мутантные белки CFTR сконструировали, как указано в таблице 7. Экспрессию CFTR измеряли как долю CFTR дикого типа (фиг. 2D).

**Таблица 7. Сконструированные белки CFTR с повышением стабильности/экспрессии**

	K14	K68	K710	K716	K1041	K1218
1	R					
2		R				



[0277] Конструкция дикого типа (белок А CFTR в **таблице 8**) и все мутантные конструкции (сконструированные белки В—Е в **таблице 8**) транслировались в клетках HEK293 на высоком уровне и обеспечивали высокий уровень экспрессии CFTR, наблюдаемый в белковом геле. Полоса CFTR отмечена стрелкой (**фиг. 3А**).

[0278] Транспорт хлорид-ионов измеряли с помощью камеры Уссинга. В этом анализе выявление потока хлоридов обеспечивается исходя из принципа, что эпителий перекачивает ионы с одной стороны на другую, а ионы просачиваются обратно через плотные контакты, расположенные между эпителиальными клетками. Разность потенциалов между двумя сторонами эпителия измеряется с помощью двух электродов напряжения, расположенных рядом с тканью/эпителием. Напряжение компенсируется введением тока с использованием двух других электродов, расположенных вдали от эпителия. Ток короткого замыкания измеряют в качестве показателя суммарного переноса хлорид-ионов.

[0279] Кривые на **фиг. 3В** показывают результаты измерения тока короткого замыкания при измерении тока во времени, сравнивая CFTR дикого типа (белок А) со сконструированным мутантным белком В CFTR (фосфомиметический R-домен S-Quad-D), сконструированным мутантным белком С CFTR (фосфомиметический R-домен S-Hex-D), сконструированным мутантным белком D CFTR (K978C, АТФ-независимая активность), сконструированным мутантным белком Е CFTR (E1371Q, дефицит гидролиза АТФ) при концентрации CFTR 0,5 мкг («высокая концентрация»).

[0280] На кривых показаны результаты измерения тока короткого замыкания при последовательном добавлении форсколина, активатора CFTR-опосредованной секреции хлорида и VX-770 (ивакафтора), потенцирующего соединения, которое непосредственно увеличивает открытие зависимого от фосфорилирования канала CFTR на мембранах, пермеабилizированных амфотерицином В. Белки А—D CFTR реагировали на активацию форсколином, что приводило к увеличению проводимости для хлорид-ионов. Активация форсколином не наблюдалась для белка Е CFTR, мутантного варианта с E1371Q с дефицитом гидролиза АТФ. Дальнейшее добавление VX-770 увеличило проводимость белков В—D CFTR.

[0281] Проводимость во всех случаях терялась при ингибировании CFTR путем обработки ингибитором 172 CFTR.

[0282] Различные профили ответа наблюдались при испытании 0,5 мкг испытываемых сконструированных белков CFTR в высокой концентрации (фиг. 3В).

*Пример 4. Оценка ответа конструкций активированного CFTR в анализе в камере Уссинга с использованием низкой концентрации*

[0283] В этом примере активацию различных сконструированных мутантных вариантов белка CFTR (белки В—Е, обсуждаемые выше) сравнивали с активацией CFTR дикого типа (белок А) с использованием анализа Уссинга, как описано в примере 3. В этом примере активность сконструированного белка CFTR испытывали при низкой концентрации, составлявшей 0,35 мкг (фиг. 4).

[0284] Использование испытываемых белков CFTR при более низкой концентрации (т. е. 0,35 мкг) показало улучшенную воспроизводимость в отношении величины тока в анализе в камере Уссинга.

[0285] Результаты показали стабильные тенденции для ранжированных значений ответа на активацию форсколином. Из всех подвергнутых испытаниям мутантных вариантов сконструированный мутантный белок Е CFTR показал активацию форсколином при более низкой дозе по сравнению с другими подвергнутыми испытаниям конструкциями. Кроме того, на фиг. 4 продемонстрированы два различных эффекта. Замены цистеина на конкретный лизин в цитозольной петле 3 (например, мутантный вариант D CFTR в таблице 8) приводили к получению канала с общей пониженной активностью по сравнению с CFTR дикого типа, хотя он демонстрировал небольшую проводимость до добавления форсколина. Напротив, замена глутаминна на конкретную глутаминовую кислоту в NBD-2 (например, мутантный вариант E CFTR в таблице 8) приводила к значительной проводимости до обработки форсколином, а также к общему повышению активности в клетках FRT.

[0286] Кроме того, данные показали, что добавление ивакафтора приводило к более сильному активационному ответу во всех подвергнутых испытаниям конструкциях. Сконструированный мутантный белок С CFTR проявлял более выраженный ответ на ивакафтор по сравнению с другими подвергнутыми испытаниям конструкциями.

**Пример 5. Оценка зависимости доза-ответ для сконструированного белка E CFTR в анализе в камере Уссинга**

[0287] В этом примере сконструированный белок CFTR с E1371Q испытывали в отношении активации с использованием различных доз в диапазоне 0,05—0,35 мкг/лунка с использованием анализа Уссинга (фиг. 5). Фиг. 5 иллюстрирует поток хлоридов из клетки, экспрессирующей мутантный белок CFTR.

[0288] Данные показали наличие согласованного паттерна активности при лечении в разных испытываемых дозах.

**Пример 6. Оптимизация пермеабиллизации эсцином для истощения АТФ с использованием CFTR дикого типа в различных дозах**

[0289] В этом примере эффект пермеабиллизации эсцином в отношении истощения АТФ оценивали с использованием белка CFTR дикого типа. Для этих исследований использовали анализ Уссинга.

[0290] В этих исследованиях сапонин эсцин использовали в качестве перфорирующего средства, которое обеспечивает проникновение более крупных молекул, включая нуклеотиды и модуляторы активности ионных каналов.

[0291] Обработку эсцином проводили в дозах 10 мкМ, 15 мкМ, 20 мкМ, 25 мкМ в присутствии и в отсутствие АТФ.

[0292] Результаты показали, что пермеабиллизация эсцином привела к потере целостности мембраны на всех испытанных уровнях в зависимости от дозы и времени (фиг. 6). Было замечено, что эсцин в дозе 10 мкМ обеспечивал лишь короткий промежуток времени, в течение которого можно было сравнивать измерения с АТФ и без него, что приводило к дополнительной оптимизации.

[0293] Дальнейший анализ проводили с целью оптимизации пермеабиллизации эсцином для истощения АТФ (фиг. 7).

**Пример 7. Оценка ответа фосфомиметических конструкций CFTR в анализе в камере Уссинга**

[0294] В этом примере активность различных сконструированных фосфомиметических мутантных вариантов белка CFTR (таблица 9) сравнивали с

активностью CFTR дикого типа с использованием анализа в камере Уссинга, как описано в примере 3.

**Таблица 9. Фосфомиметические конструкции CFTR**

Сконструированный CFTR	Мутации
<b>WT</b>	Дикий тип
<b>4D</b>	S660D, S737D, S795D, S813D
<b>6D</b>	S660D, S686D, S700D, S737D, S795D, S813D
<b>8D</b>	S660D, S686D, S700D, S712D, S737D, S768D, S795D, S813D
<b>13D</b>	S422D, S660D, S670D, S686D, T690D, S700D, S712D, S753D, T787D, T788D, T790D, S795D, S813D
<b>15D</b>	S422D, S660D, S670D, S686D, T690D, S700D, S712D, S737D, S753D, S768D, T787D, T788D, T790D, S795D, S813D

[0295] Как показано на **фиг. 8**, комбинации мутаций от S/T до D в R-домене CFTR вызывают различные изменения в функционировании канала. Каналы 4D и 6D демонстрируют большую чувствительность к VX-770, в то время как 13D и 15D демонстрируют форсколин-независимый транспорт хлоридов, а также повышенную общую активность по сравнению с каналами CFTR дикого типа. Все фосфомиметические мутантные варианты CFTR, за исключением мутантного варианта 4D, показали более высокую общую активность по сравнению с CFTR дикого типа. Данные также показали, что увеличение количества фосфомиметических сайтов в белке CFTR может увеличить общую активность в камере Уссинга.

[0296] Затем несколько комбинаций серина и треонина в R-домене заменили отрицательно заряженными аминокислотами, либо глутаминовой кислотой, либо аспарагиновой кислотой с целью имитации электростатической природы фосфорилирования. Было обнаружено, что две комбинации значительно влияют на ток хлорида – одна, содержащая 13 аминокислотных замен, и другая с 15 аминокислотными заменами. На **фиг. 9A** показано сравнение мутантных вариантов CFTR, содержащих 13 аминокислотных замен либо на аспарат, либо на глутамат в R-домене. На **фиг. 9B** показано сравнение мутантных вариантов CFTR, содержащих 15 аминокислотных замен либо на аспарат, либо на глутамат в R-домене. В обоих

случаях замены глутаматом (E) были более эффективными, чем замены аспартатом (D).

[0297] Результаты показали, что фосфомиметические мутантные варианты CFTR были чувствительными как к форсколину, так и к VX-700. Для фосфомиметических мутантных вариантов CFTR также были показаны повышенные значения тока по сравнению с CFTR дикого типа в отсутствие форсколина (после обработки амфотерицином) (фиг. 8, фиг. 9А и фиг. 9 В). Не ограничиваясь конкретной теорией, это может быть связано со сниженным порогом цАМФ-зависимого открытия/закрытия мембранного канала, что согласуется с ожидаемым эффектом фосфомиметика. В то время как открытие каналов дикого типа зависит от активации РКА с помощью цАМФ и последующего фосфорилирования R-домена, точечные мутации, обеспечивающие введение аспартата, частично имитируют конститутивное фосфорилирование, так что конформация открытого состояния принимается даже в отсутствие цАМФ.

*Пример 8. Оценка ответа для конструкций CFTR с увеличенной стабильностью/переносом в анализе в камере Уссинга*

[0298] В этом примере активность различных сконструированных мутантных вариантов белка CFTR с увеличенной стабильностью/переносом (таблица 10) сравнивали с активностью CFTR дикого типа с использованием анализа в камере Уссинга, как описано в примере 3.

[0299] Белки CFTR подвергаются убиквитинированию по нескольким остаткам лизина в белке. Убиквитинирование является обратимым процессом из-за наличия деубиквитинирующих ферментов, способных отщеплять убиквитин от модифицированных белков. Убиквитинирование участвует в регуляции как мембранного переноса, так и разрушения белка. Например, убиквитинированные остатки K710, K716 и K1041 стабилизируют CFTR дикого типа, защищая его от протеолиза. Модификации K14R и K68R приводят к увеличению полосы С, соответствующей зрелому CFTR, которое может быть усилено ингибированием протеасом, обеспечивая перенос на поверхность.

Таблица 10. Конструкции CFTR с увеличенной стабильностью/переносом

Сконструированный CFTR	Мутации
<b>WT</b>	Дикий тип
<b>A</b>	K14R
<b>B</b>	K68R
<b>C</b>	K14R, K68R
<b>D</b>	K1218R
<b>E</b>	K68R, K1218R
<b>F</b>	K14R, K1218R
<b>G</b>	K14R, K68R, K1218R

[0300] Как показано на **фиг. 10**, для мутантных вариантов CFTR из таблицы 10 не наблюдалось существенного повышения активности по сравнению с CFTR дикого типа. Для мутантных вариантов A (K14R), C (K14R, K68R) и D (K1218R) CFTR была показана пониженная активность по сравнению с CFTR дикого типа, как определено с помощью анализа в камере Уссинга.

**Пример 9. Оценка ответа фосфомиметических конструкций CFTR в комбинации с мутацией K14R или E1371Q в анализе в камере Уссинга**

[0301] В этом примере значения активности различных сконструированных мутантных вариантов белка CFTR (**таблица 11**) сравнивали с использованием анализа в камере Уссинга, как описано в примере 3. В частности, испытывали различные комбинации K14R, E1371Q и фосфомиметических мутаций.

[0302] Чтобы проверить, может ли достигаться синергетический эффект путем комбинирования фосфомиметических мутаций с мутацией, обеспечивающей увеличение переноса (K14R), или мутацией, обеспечивающей дефицит гидролиза АТФ (E1371Q), получили мутантные конструкции CFTR, показанные в **таблице 11**.

Таблица 11. Различные мутантные конструкции CFTR

Сконструированный CFTR	Мутации
<b>WT</b>	Дикий тип
<b>13D</b>	S422D, S660D, S670D, S686D, T690D, S700D, S712D, S753D, T787D, T788D, T790D, S795D, S813D
<b>13D/K14R</b>	K14R, S422D, S660D, S670D, S686D, T690D, S700D, S712D, S753D, T787D, T788D, T790D, S795D, S813D
<b>13E</b>	S422E, S660E, S670E, S686E, T690E, S700E, S712E, S753E, T787E, T788E, T790E, S795E, S813E

<b>13E/K14R</b>	K14R, S422E, S660E, S670E, S686E, T690E, S700E, S712E, S753E, T787E, T788E, T790E, S795E, S813E
<b>15E</b>	S422E, S660E, S670E, S686E, T690E, S700E, S712E, S737E, S753E, S768E, T787E, T788E, T790E, S795E, S813E
<b>15E/K14R</b>	K14R, S422E, S660E, S670E, S686E, T690E, S700E, S712E, S737E, S753E, S768E, T787E, T788E, T790E, S795E, S813E
<b>15A</b>	S422A, S660A, S670A, S686A, T690A, S700A, S712A, S737A, S753A, S768A, T787A, T788A, T790A, S795A, S813A
<b>15A/E1371Q</b>	S422A, S660A, S670A, S686A, T690A, S700A, S712A, S737A, S753A, S768A, T787A, T788A, T790A, S795A, S813A, E1371Q
<b>15D/E1371Q</b>	S422D, S660D, S670D, S686D, T690D, S700D, S712D, S737D, S753D, S768D, T787D, T788D, T790D, S795D, S813D, E1371Q

[0303] Чтобы исследовать экспрессию мутантных вариантов CFTR, количественно определяли экспрессию CFTR дикого типа, мутантных вариантов 15E, 13E и E1371Q, как показано на **фиг. 11А** и **фиг. 11В**. Количественная оценка результатов вестерн-блоттинга для трех вариантов CFTR продемонстрировала повышенную экспрессию для полосы С, при этом 13E показал увеличение содержания белка более чем в 2 раза.

[0304] Как показано на **фиг. 11С**, мутация K14R не приводила к дополнительному увеличению активности фосфомиметических мутантных вариантов CFTR. На **фиг. 11D** представлена гистограмма тока при максимальной активации для каждого мутантного варианта. На **фиг. 11D** показано, что при комбинации мутации K14R с фосфомиметическими мутантными вариантами 15E, 13D или 13E не наблюдалось значительного повышения активности белков CFTR.

[0305] Также были проведены исследования, чтобы оценить, были ли какие-либо различия в активности CFTR после аминокислотных замен с S на D по сравнению с аминокислотными заменами с S на E. Для этих исследований активность мутантного варианта 13D CFTR сравнивали с активностью 13E с использованием камеры Уссинга. Активность мутантного варианта 15D CFTR сравнивали с активностью 15E с использованием камеры Уссинга. Данные этих исследований показали, что замены на E обеспечивали получение CFTR, который обладал повышенной активностью по сравнению с теми, у которых были замены на D (**фиг. 11Е**). Таким образом, аминокислотные замены на E можно использовать для

дополнительного повышения активности CFTR. Например, замены S13E и S15E характеризуются большей активностью CFTR, чем замены S13D и S15D соответственно.

[0306] На **фиг. 12А** и **фиг. 12В** показано, что мутантный белок 15А CFTR обладает пониженной активностью по сравнению с CFTR дикого типа. Анализ в камере Уссинга показал снижение тока короткого замыкания на 85% после добавления форсколина по сравнению с CFTR дикого типа, что согласуется с известной ролью рКа-опосредованной активации канала. Кроме того, мутантные белки CFTR (мутантные варианты 15А/Е1371Q и 15D/Е1371Q), содержащие мутацию Е1371Q, характеризуются повышенным значением тока при предварительной обработке. Удивительно, но этот независимый от форсколина эффект наблюдался еще более заметно с мутацией Е1371Q (по сравнению с фосфомиметическими мутациями), которая попадает в АТФ-связывающую область NBD2. Для мутации Е1371Q была показана в целом более высокая проводимость, чем для CFTR дикого типа, особенно до добавления форсколина. Кроме того, для мутантных вариантов CFTR, содержащих мутацию Е1371Q, не наблюдалось значительной активации форсколином и повышения активности при добавлении VX-770. Минимальный ответ на VX-770, по всей видимости, отражает то, что вероятность открытия Е1371Q, приблизилась к теоретическому максимуму полного открытия. Мутантные варианты CFTR 15А, 15А/Е1371Q и 15D/Е1371Q не проявляли повышенной активности по сравнению с белком CFTR дикого типа.

***Пример 10. Оценка ответа конструкции CFTR E1371Q в комбинации с мутацией K14R в анализе в камере Уссинга***

[0307] В этом примере активность мутантного варианта CFTR E1371Q испытывали в комбинации с мутацией K14R с использованием анализа в камере Уссинга, как описано в примере 3.

[0308] Наши результаты также показали, что E1371Q может быть дополнительно усилена путем введения дополнительного варианта, K14R, который представляет собой предполагаемый сайт убиквитинирования (**фиг. 13А**). На **фиг. 13В** показано, что мутантный вариант CFTR E13Q/K14R обладает повышенной активностью и повышенной экспрессией по сравнению как с белком CFTR дикого

типа, так и с белком CFTR, имеющим только точечную мутацию E1371Q. Эти данные указывают на возможность создания варианта CFTR, который является как более активным (повышенная вероятность открытия), так и более стабильным (повышенное число копий).

**Пример 11. Оценка продолжительности активности конструкции CFTR в динамическом анализе в камере Уссинга**

[0309] В этом примере продолжительность активности различных фосфомиметических мутантных вариантов CFTR испытывали в комбинации с мутацией K14R с использованием динамического анализа в камере Уссинга, как описано в примере 3. Мутантные варианты CFTR, испытанные в этом примере, перечислены в таблице 12.

**Таблица 12. Мутантные варианты CFTR, подвергнутые испытаниям в динамическом анализе Уссинга**

Сконструированный CFTR	Мутации
<b>WT</b>	Дикий тип
<b>13E</b>	S422E, S660E, S670E, S686E, T690E, S700E, S712E, S753E, T787E, T788E, T790E, S795E, S813E
<b>13E/K14R</b>	K14R, S422E, S660E, S670E, S686E, T690E, S700E, S712E, S753E, T787E, T788E, T790E, S795E, S813E
<b>15E</b>	S422E, S660E, S670E, S686E, T690E, S700E, S712E, S737E, S753E, S768E, T787E, T788E, T790E, S795E, S813E
<b>15E/K14R</b>	K14R, S422E, S660E, S670E, S686E, T690E, S700E, S712E, S737E, S753E, S768E, T787E, T788E, T790E, S795E, S813E

[0310] Активность различных белков CFTR, перечисленных в таблице 12, измеряли через 22 и 44 часа. Ток короткого замыкания ( $I_{sc}$ ), движение ионов, измеренное в камере Уссинга при активном транспорте, строили для каждого белка CFTR через 22 часа и 44 часа. На **фиг. 14A** показано, что наиболее высокая остаточная активность через 44 часа наблюдалась для мутантных белков 15E/K14R и 13E. На **фиг. 14B** показано, что мутантный вариант E1371Q K14R обладал высокой остаточной активностью через 44 часа.

[0311] Три сконструированных белка CFTR (13E, 15E и E на Q для открытия/закрытия мембранного канала) дополнительно разработаны для изменения паттернов убиквитинирования на N-конце путем замены K14 на аргинин. Как

показано на **фиг. 14С**, дополнительная замена (K14R) при комбинировании с фосфомиметическим белком 13E не влияла на хлоридную проводимость, в отличие от варианта белка 15E и варианта белка с заменой E на Q, у которых обеспечивается влияние на открытие/закрытие мембранного канала, оба из которых продемонстрировали увеличение активности более чем на приблизительно 25%.

**Пример 12. Мутации CFTR, которые модулируют цикл АТФ-зависимого открытия/закрытия мембранного канала**

[0312] В этом примере были осуществлены мутации в аминокислотных остатках CFTR, которые модулируют цикл АТФ-зависимого открытия/закрытия мембранного канала.

[0313] Мутации, которые дестабилизируют или укорачивают продолжительность открытого состояния (например, мутации W401, F409, F430 и/или K464), могут модулировать эффекты E1371Q, создавая промежуточный фенотип. В **таблице 13** ниже показаны иллюстративные мутации, которые были оценены.

**Таблица 13. Отобранные мутации CFTR, которые модулируют цикл АТФ-зависимого открытия/закрытия мембранного канала**

W401	F409	F430	K464	K978	E1371
				C	
					Q
G					Q
G	G				Q
G	G	G			Q
			A		Q

[0314] На **фиг. 15А** показана схема CFTR, который содержит мутации в указанных остатках. CFTR, содержащие мутации, которые модулируют цикл АТФ-зависимого открытия/закрытия мембранного канала, оценивали в отношении времени релаксации канала CFTR. Данные показывают, что изменения в определенных

аминокислотных остатках приводят к модулированию времени релаксации канала (фиг. 15B).

[0315] Дополнительные варианты для E1371Q оценивали путем измерения проводимости при коротком замыкании в камере Уссинга. Данные показали, что мутация K1218R снижает активность белков CFTR как дикого типа, так и с E1371Q (фиг. 15C).

*Пример 13. Для мРНК фосфомиметических CFTR показана различная чувствительность к активации форсколином*

[0316] В этом примере различные мРНК фосфомиметических CFTR испытывали на их чувствительность к активации форсколином.

[0317] В одном исследовании в мРНК CFTR вводили различное количество фосфомиметических мутаций. Количество фосфомиметических мутаций, которые были введены в мРНК CFTR, составляло 0, 4, 6, 8, 13 и 15. Затем эти мРНК CFTR оценивали в отношении активации форсколином путем последовательного добавления 10, 30, 100, 300, 1000 и 10000 нМ форсколина. Активность различных мРНК CFTR, имеющих различное количество фосфомиметических мутаций, оценивали путем измерения проводимости при коротком замыкании, измеренной в камере Уссинга на клетках FRT, трансфицированных мРНК CFTR, имеющих определенное количество мутаций.

[0318] Как показано на **фиг. 16А**, при модификации типичной процедуры в камере Уссинга для включения последовательных возрастающих доз форсколина, продемонстрировано различную чувствительность к форсколину у сконструированных вариантов каналов CFTR. Данные, полученные в результате этих экспериментов, показали, что с увеличением количества фосфомиметических мутаций CFTR наблюдается соответствующее повышение чувствительности к активации форсколином (**фиг. 16А и 16В**). EC50 форсколина (нМ) по отношению к числу мутаций в мРНК CFTR показана в **таблице 14** ниже.

**Таблица 14: мРНК фосфомиметических CFTR обладают разной чувствительностью к активации форсколином**

Число мутаций CFTR	EC50 форсколина (нМ)
0	588,1
4	313,7
6	610,2
8	317,2
13	82,4
15	70,3

[0319] Были также проведены исследования для определения того, показали ли аминокислотные замены 13S на 13D по сравнению с 13S на 13D какую-либо разницу в отношении чувствительности к форсколину. Данные показали, что оба типа аминокислотных замен демонстрируют сходные изменения чувствительности к форсколину, что оценивается по измерениям проводимости при коротком замыкании, измеренной в камере Уссинга на клетках FRT, которые были трансфицированы с помощью мРНК CFTR, имеющих конкретные аминокислотные замены (фиг. 17). EC50 форсколина (нМ) с этими мутантными вариантами CFTR показана в таблице 15 ниже.

**Таблица 15. Мутантные варианты мРНК CFTR с заменами 13S на 13D и 13S на 13E показали сходные изменения чувствительности к форсколину**

Конструкция	EC50 форсколина (нМ)
WT	588,1
13D	82,4

13E	54,72
13E K14R	54,84

**Пример 14. Прогнозирование Т-клеточных и В-клеточных эпитопов *in silico*, а также трансляция и переносимость *in vitro***

[0320] Программное обеспечение EpiQuest® использовали для предсказания Т-клеточных и В-клеточных эпитопов в отношении мутантных вариантов CFTR. Анализ с использованием этого программного обеспечения показал, что все оцененные мутации (т. е. K14R, 13D, 13E, 15D, 15E, K68R, K1218R и E1371Q) находились за пределами потенциальных областей для цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL).

[0321] Данные, полученные в результате анализов, показали, что все оцененные пептидные последовательности показали низкий потенциал иммуногенности или его отсутствие. Кроме того, эпитопы с потенциалом гуморальной иммуногенности были труднодоступными и/или находились не на поверхности. Данные также показали, что не было предсказано никаких мутаций, создающих или усиливающих потенциал эпитопов CTL. Более того, программное обеспечение ActivSite® предсказывает, что все испытанные мутации будут находиться за пределами критических областей молекулы CFTR, участвующих в обеспечении функциональной и структурной целостности.

[0322] В совокупности эти данные показали, что мутации будут иметь низкий потенциал иммуногенности или таковой будет отсутствовать, и что мутации не будут отрицательно влиять на функциональную и структурную целостность CFTR.

[0323] Также были проведены исследования для оценки трансляции и переносимости мутантных вариантов CFTR *in vitro*. Данные этих исследований показали, что кодон-оптимизированная последовательность WT, варианты 13E и E1371Q K14R показали повышенную экспрессию в полосе С лизатов HEK293 (фиг.18А, 18В и 18С). «Полоса С» относится к зрелой сложной гликозилированной форме CFTR..

[0324] Переносимость *in vitro* мутантных мРНК CFTR также оценивали в клетках HEK293 с использованием коммерчески доступного анализа

цитотоксичности. Данные этих исследований показали, что ни один из вариантов CFTR не продемонстрировал повышенной цитотоксичности по сравнению с контрольной средой-носителем в клетках HEK293 (фиг. 19).

*Пример 15. Оптимизация кодонов CFTR увеличивает общую активность в камере Уссинга для подвергнутых испытаниям белков CFTR*

[0325] В этом примере оценивали общую активность последовательностей CFTR, которые были кодон-оптимизированы («СО»), по сравнению с аналогом, не являющимся кодон-оптимизированным. Перечень кодон-оптимизированных последовательностей CFTR показан в таблице 4. Для этих анализов оценивали следующие мутантные варианты CFTR: дикого типа, E1271Q/K14R, 13E/K14R, 15E/K14R и 13E. Оценки включали измерения активности между мутантными вариантами CFTR, не являющимися кодон-оптимизированными, и кодон-оптимизированными мутантными вариантами CFTR.

[0326] Данные этих анализов показали, что кодон-оптимизированные конструкции обладали повышенной активностью в анализах в камере Уссинга для всех подвергнутых испытаниям вариантов (фиг. 20А, 20В, 20С, 20Е и 20F) по сравнению с аналогом, не являющимся кодон-оптимизированным.

[0327] В другом исследовании каждая из кодон-оптимизированных последовательностей продемонстрировала сопоставимую активность по сравнению с другими кодон-оптимизированными последовательностями, независимо от характера мутации, содержащейся в кодон-оптимизированной последовательности (фиг. 20D).

### ЭКВИВАЛЕНТЫ

[0328] Специалистам в данной области техники будут известны или они смогут установить, используя не более чем рутинный эксперимент, многочисленные эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанного в данном документе. Объем настоящего изобретения не предназначен для ограничения приведенным выше описанием, а определяется следующей формулой изобретения.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Фармацевтическая композиция для лечения кистозного фиброза, содержащая мРНК, кодирующую регулятор трансмембранной проводимости при кистозном фиброзе (CFTR), где CFTR содержит одну или более мутаций, которые обеспечивают получение активированного белка CFTR.
2. Фармацевтическая композиция для лечения кистозного фиброза, содержащая мРНК, кодирующую регулятор трансмембранной проводимости при кистозном фиброзе (CFTR), где CFTR содержит одну или более мутаций, которые обеспечивают получение белка CFTR, который является более стабильным, чем белок CFTR дикого типа.
3. Фармацевтическая композиция по п. 1 или п. 2, где одна или более мутаций расположены в пределах регуляторного домена, трансмембранного домена (MSD) и/или нуклеотид-связывающего домена CFTR.
4. Фармацевтическая композиция по п. 3, где одна или более мутаций расположены в пределах аминокислотных остатков 634—835 регуляторного домена CFTR.
5. Фармацевтическая композиция по любому из предыдущих пунктов, где CFTR содержит по меньшей мере 2 мутации в аминокислотных остатках по сравнению с белком CFTR дикого типа.
6. Фармацевтическая композиция по п. 5, где CFTR содержит от 2 до 16 мутаций в аминокислотных остатках по сравнению с белком CFTR дикого типа.
7. Фармацевтическая композиция по любому из предыдущих пунктов, где мутация представляет собой аминокислотную замену.
8. Фармацевтическая композиция по п. 1 или п. 2, где одна или более мутаций осуществлены по остаткам K14, K68, S422, S660, S670, S686, T690, S700, K710, S712, K716, S737, S753, S768, T787, T788, S790, S795, S813, K978, K1041, K1080, K1218, E1371 и их комбинациям.
9. Фармацевтическая композиция по п. 8, где одна или более мутаций выбраны из K14R, K68R, K710R, K716R, K1041R, K1080R, K1218R и их комбинаций.

10. Фармацевтическая композиция по п. 9, где CFTR содержит мутации, выбранные из K14R, K68R, K1218R, K14R/K68R, K14R/K1218R, K68R/K1218R и K14R/K68R/K1218R.
11. Фармацевтическая композиция по п. 8, где CFTR содержит мутации S660D/S737D/S795D/S813D, S660DD/S686D/S700D/S737D/S795D/S813D, S660D/S686D/S700D/S712D/S737D/S768D/S795D/S813D, K978C или E1371Q.
12. Фармацевтическая композиция по п. 8, где CFTR содержит мутации S422D/S660D/S670D/S686D/T690D/S700D/S712D/S753D/T787D/T788D/S790D/S795D/S813D.
13. Фармацевтическая композиция по п. 8, где CFTR содержит мутации S422D/S660D/S670D/S686D/T690D/S700D/S712D/S737D/S753D/S768D/T787D/T788D/S790D/S795D/S813D.
14. Фармацевтическая композиция по п. 8, где одна или более мутаций, осуществленных по остаткам S422, S660, S670, S686, T690, S700, S712, S737, S753, S768, T787, T788, S790, S795, S813, представляют собой замену аминокислоты на глутаминовую кислоту (E).
15. Фармацевтическая композиция по п. 14, где CFTR содержит мутации S422E/S660E/S670E/S686E/T690E/S700E/S712E/S753E/T787E/T788E/S790E/S795E/S813E.
16. Фармацевтическая композиция по п. 14, где CFTR содержит мутации S422E/S660E/S670E/S686E/T690E/S700E/S712E/S737E/S753E/S768E/T787E/T788E/S790E/S795E/S813E.
17. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 11—16, где CFTR дополнительно содержит мутацию K14R и/или мутацию E1371Q.
18. Фармацевтическая композиция по любому из предыдущих пунктов, где мРНК, кодирующая CFTR, является кодон-оптимизированной.
19. Фармацевтическая композиция по п. 18, где кодон-оптимизированная мРНК CFTR дополнительно содержит последовательность 5'-нетранслируемой области (UTR), представленную в SEQ ID NO: 4.

20. Фармацевтическая композиция по п. 18, где кодон-оптимизированная мРНК CFTR дополнительно содержит последовательность 3'-нетранслируемой области (UTR), представленную в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.
21. Фармацевтическая композиция по любому из предыдущих пунктов, где кодон-оптимизированная мРНК CFTR инкапсулирована в наночастице.
22. Фармацевтическая композиция по п. 21, где наночастица представляет собой липосому.
23. Фармацевтическая композиция по п. 22, где липосома содержит один или более катионных липидов, один или более некаатионных липидов, один или более липидов на основе холестерина и один или более PEG-модифицированных липидов.
24. Фармацевтическая композиция по п. 23, где липосома содержит не более трех отдельных липидных компонентов.
25. Фармацевтическая композиция по п. 24, где один отдельный липидный компонент представляет собой катионный липид на основе стерина.
26. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 22—25, где липосома характеризуется размером, составляющим менее чем приблизительно 100 нм.
27. Фармацевтическая композиция по любому из предыдущих пунктов, дополнительно содержащая потенцирующее средство, корректор и/или активатор для CFTR.
28. Фармацевтическая композиция по п. 27, где фармацевтическая композиция содержит потенцирующее средство для CFTR.
29. Фармацевтическая композиция по п. 28, где потенцирующее средство для CFTR представляет собой ивакафтор.
30. Полинуклеотид, содержащий последовательность, комплементарную последовательности мРНК по любому из предыдущих пунктов.
31. Полинуклеотид по п. 30, где полинуклеотид представляет собой линейный или кольцевой полинуклеотид, содержащий дезоксирибонуклеотидные остатки.
32. Культивируемая клетка, содержащая полинуклеотид по п. 30 или п. 31.

33. Способ индуцирования экспрессии CFTR в эпителиальных клетках легкого млекопитающего, где способ включает приведение эпителиальных клеток легкого млекопитающего в контакт с композицией по любому из пп. 1—29.
34. Способ по п. 33, где кодон-оптимизированную мРНК CFTR вводят посредством легочной доставки.
35. Способ по п. 34, где легочная доставка представляет собой распыление.
36. Способ лечения кистозного фиброза, включающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, фармацевтической композиции по любому из пп. 1—29.
37. Способ по п. 36, где кодон-оптимизированную мРНК CFTR вводят субъекту посредством легочной доставки.
38. Способ по п. 37, где легочная доставка представляет собой распыление.
39. Способ по любому из пп. 36—38, где лечение субъекта достигается при более низкой терапевтически эффективной дозе по сравнению с лечением субъекта с помощью мРНК, кодирующей CFTR дикого типа.
40. Способ по п. 39, где лечение субъекта, нуждающегося в этом, приводит к обеспечению более короткого времени распыления для введения терапевтически эффективной дозы по сравнению с лечением с помощью мРНК, кодирующей CFTR дикого типа.
41. Нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированный белок регулятора трансмембранной проводимости при кистозном фиброзе (CFTR), где модифицированный белок CFTR содержит одну или более аминокислотных замен на глутаминовую кислоту.
42. Нуклеиновая кислота по п. 41, где одна или более аминокислотных замен осуществлены по остаткам серина.
43. Нуклеиновая кислота по п. 41, где одна или более аминокислотных замен осуществлены по остаткам треонина.
44. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 41—43, где одна или более аминокислотных замен расположены в пределах регуляторного домена CFTR.

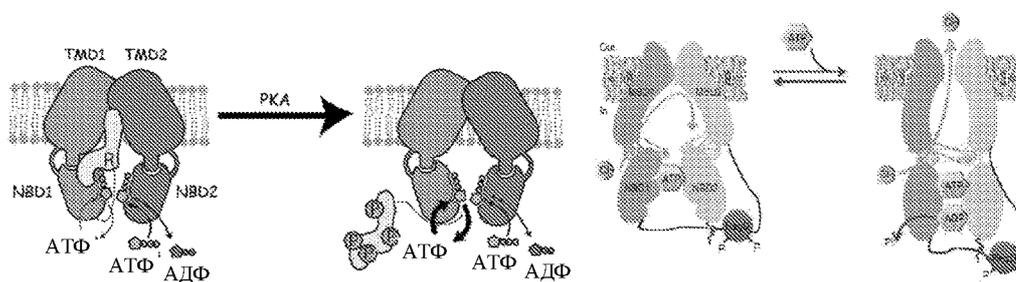
45. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 41—44, где одна или более аминокислотных замен расположены в аминокислотных остатках 440—820.
46. Нуклеиновая кислота по п. 45, где одна или более аминокислотных замен осуществлены по остатку S422, S660, S670, S686, T690, S700, S712, S737, S753, S768, T787, T788, S790, S795, S813 и их комбинациям.
47. Нуклеиновая кислота по п. 41, где модифицированный белок CFTR содержит одну или более мутаций из S422E, S660E, S670E, S686E, T690E, S700E, S712E, S737E, S753E, S768E, T787E, T788E, S790E, S795E, S813E и их комбинаций.
48. Нуклеиновая кислота по п. 47, где модифицированный белок CFTR содержит мутации S422E/S660E/S670E/S686E/T690E/S700E/S712E/S753E/T787E/T788E/S790E/S795E/S813E.
49. Нуклеиновая кислота по п. 47, где модифицированный белок CFTR содержит мутации S422E/S660E/S670E/S686E/T690E/S700E/S712E/S737E/S753E/S768E/T787E/T788E/S790E/S795E/S813E.
50. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 41—49, где модифицированный белок CFTR дополнительно содержит мутацию K14R.
51. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 41—50, где модифицированный белок CFTR дополнительно содержит мутацию E1371Q.
52. Нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированный белок регулятора трансмембранной проводимости при кистозном фиброзе (CFTR), где модифицированный белок CFTR содержит мутации K14R и E1371Q.
53. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 41—52, где модифицированный белок CFTR дополнительно содержит одну или более мутаций в регуляторном домене, трансмембранном домене (MSD) и/или нуклеотид-связывающем домене CFTR.
54. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 41—53, где нуклеиновая кислота представляет собой ДНК, кДНК, РНК, мРНК или РНА.
55. Нуклеиновая кислота по п. 54, где нуклеиновая кислота представляет собой мРНК.

56. Нуклеиновая кислота по п. 55, где мРНК, кодирующая модифицированный белок CFTR, является кодон-оптимизированной.
57. Нуклеиновая кислота по п. 56, где кодон-оптимизированная мРНК CFTR дополнительно содержит последовательность 5'-нетранслируемой области (UTR), представленную в SEQ ID NO: 4.
58. Нуклеиновая кислота по п. 56, где кодон-оптимизированная мРНК CFTR дополнительно содержит последовательность 3'-нетранслируемой области (UTR), представленную в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.
59. Фармацевтическая композиция, содержащая любую из нуклеиновых кислот по пп. 41—58.
60. Фармацевтическая композиция по п. 59, где нуклеиновая кислота представляет собой мРНК.
61. Фармацевтическая композиция по п. 60, где мРНК CFTR инкапсулирована в наночастице.
62. Фармацевтическая композиция по п. 61, где наночастица представляет собой липосому.
63. Фармацевтическая композиция по п. 62, где липосома содержит один или более катионных липидов, один или более некаатионных липидов, один или более липидов на основе холестерина и один или более PEG-модифицированных липидов.
64. Фармацевтическая композиция по п. 63, где липосома содержит не более трех отдельных липидных компонентов.
65. Фармацевтическая композиция по п. 64, где один отдельный липидный компонент представляет собой катионный липид на основе стерина.
66. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 62—65, где липосома характеризуется размером, составляющим менее чем приблизительно 100 нм.
67. Вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), содержащий любую из нуклеиновых кислот по пп. 41—58.
68. Модифицированный белок CFTR, содержащий одну или более аминокислотных замен на глутаминовую кислоту.

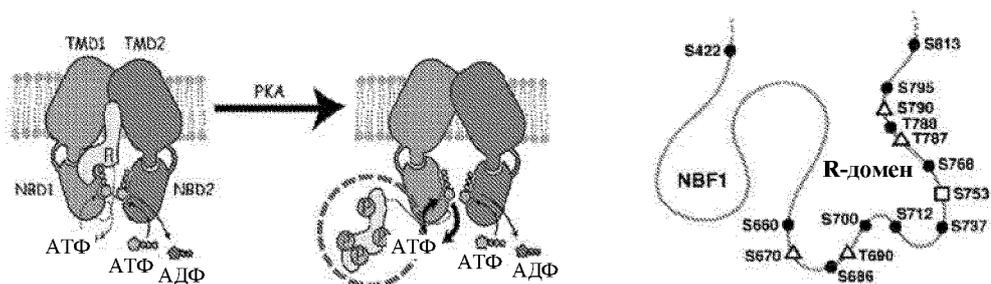
69. Модифицированный белок CFTR по п. 68, где одна или более аминокислотных замен осуществлены по остаткам серина.
70. Модифицированный белок CFTR по п. 68, где одна или более аминокислотных замен осуществлены по остаткам треонина.
71. Модифицированный белок CFTR по любому из пп. 68—70, где одна или более аминокислотных замен расположены в пределах регуляторного домена CFTR.
72. Модифицированный белок CFTR по любому из пп. 68—71, где одна или более аминокислотных замен расположены в аминокислотных остатках 440—820.
73. Модифицированный белок CFTR по п. 72, где одна или более аминокислотных замен осуществлены по остатку S422, S660, S670, S686, T690, S700, S712, S737, S753, S768, T787, T788, S790, S795, S813 и их комбинациям.
74. Модифицированный белок CFTR по п. 73, где модифицированный белок CFTR содержит одну или более мутаций из S422E, S660E, S670E, S686E, T690E, S700E, S712E, S737E, S753E, S768E, T787E, T788E, S790E, S795E, S813E и их комбинаций.
75. Модифицированный белок CFTR по п. 74, где модифицированный белок CFTR содержит мутации  
S422E/S660E/S670E/S686E/T690E/S700E/S712E/S753E/T787E/T788E/S790E  
/S795E/S813E.
76. Модифицированный белок CFTR по п. 74, где модифицированный белок CFTR содержит мутации S422E/S660E/S670E/S686E/T690E/S700E/S712E/S737E/S753E/  
S768E/T787E/T788E/S790E/S795E/S813E.
77. Модифицированный белок CFTR по любому из пп. 68—76, где модифицированный белок CFTR дополнительно содержит мутацию K14R.
78. Модифицированный белок CFTR по любому из пп. 68—77, где модифицированный белок CFTR дополнительно содержит мутацию E1371Q.
79. Модифицированный белок CFTR, содержащий мутации K14R и E1371Q.
80. Модифицированный белок CFTR по любому из пп. 68—79, где модифицированный белок CFTR дополнительно содержит одну или более мутаций в

регуляторном домене, трансмембранном домене (MSD) и/или нуклеотид-связывающем домене CFTR.

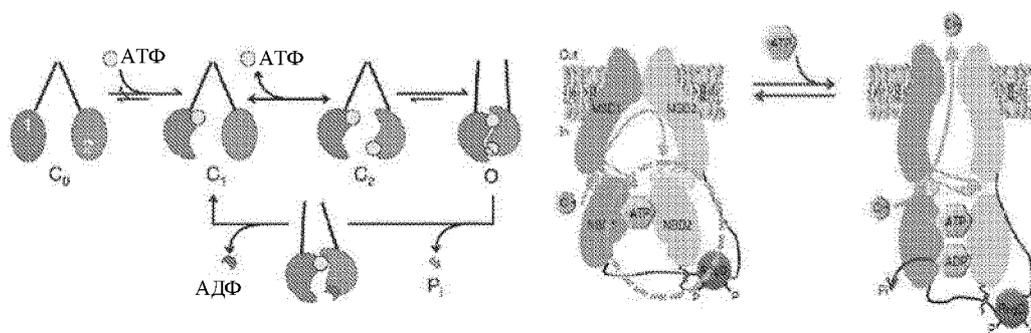
81. Способ индуцирования экспрессии CFTR в эпителиальных клетках легкого млекопитающего, где способ включает приведение эпителиальных клеток легкого млекопитающего в контакт с композицией по любому из пп. 59—66.
82. Способ по п. 81, где композицию вводят посредством легочной доставки.
83. Способ по п. 82, где легочная доставка представляет собой распыление.
84. Способ индуцирования экспрессии CFTR у субъекта, где способ включает введение вектора на основе AAV по п. 67.
85. Способ лечения кистозного фиброза, включающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, фармацевтической композиции по любому из пп. 59—66.
86. Способ по п. 85, где фармацевтическую композицию вводят субъекту посредством легочной доставки.
87. Способ по п. 86, где легочная доставка представляет собой распыление.
88. Способ лечения кистозного фиброза, включающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, вектора на основе AAV по п. 67.
89. Способ по любому из пп. 85—88, где лечение субъекта достигается при более низкой терапевтически эффективной дозе по сравнению с лечением субъекта с помощью нуклеиновой кислоты, кодирующей CFTR дикого типа.
90. Способ лечения кистозного фиброза, включающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, модифицированного белка CFTR по любому из пп. 68—80.



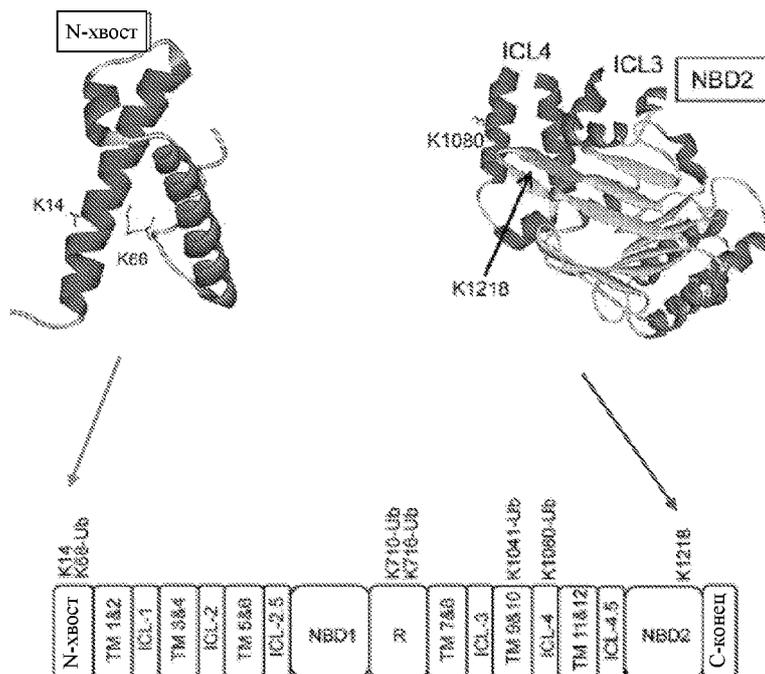
ФИГ. 1



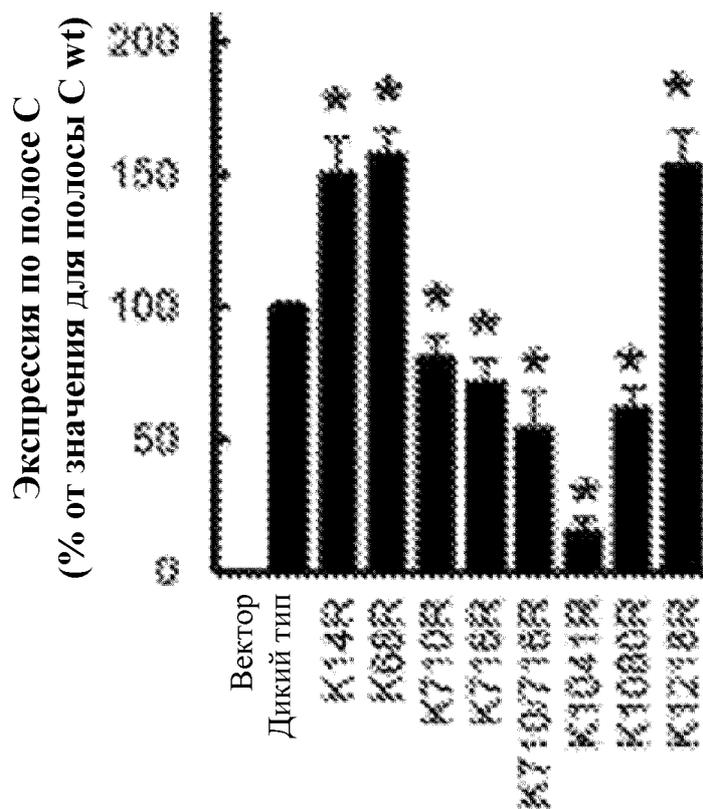
ФИГ. 2А

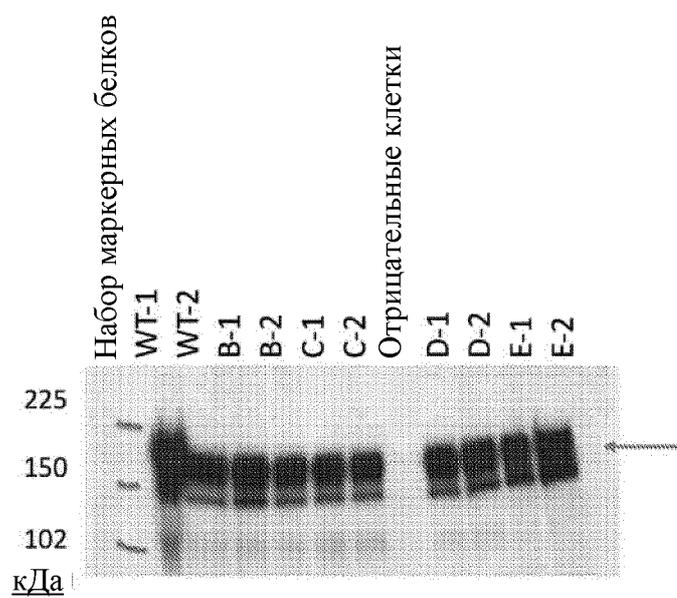


ФИГ. 2В



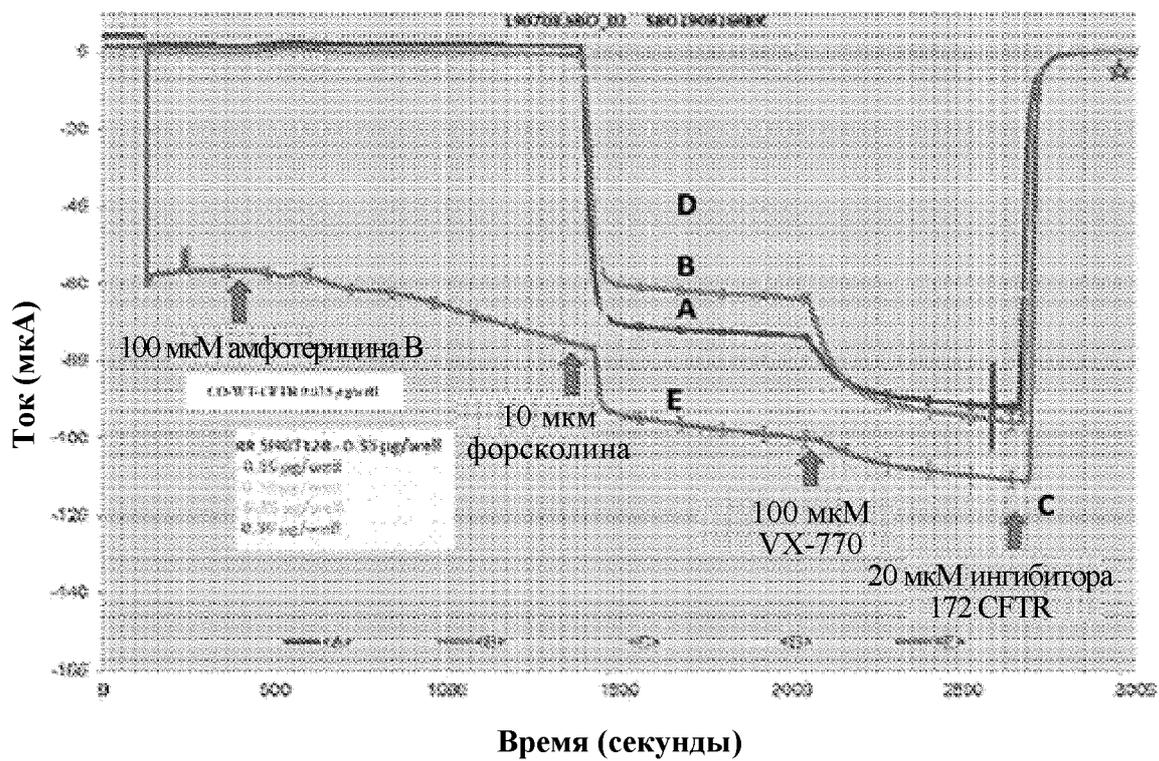
ФИГ. 2С

ФИГ. 2D

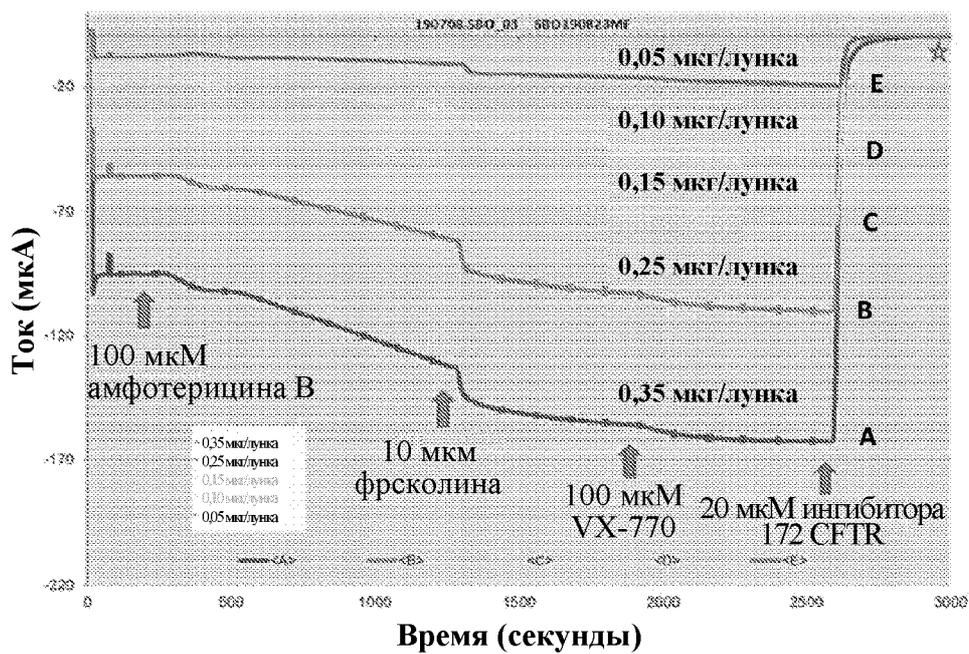


ФИГ. 3А

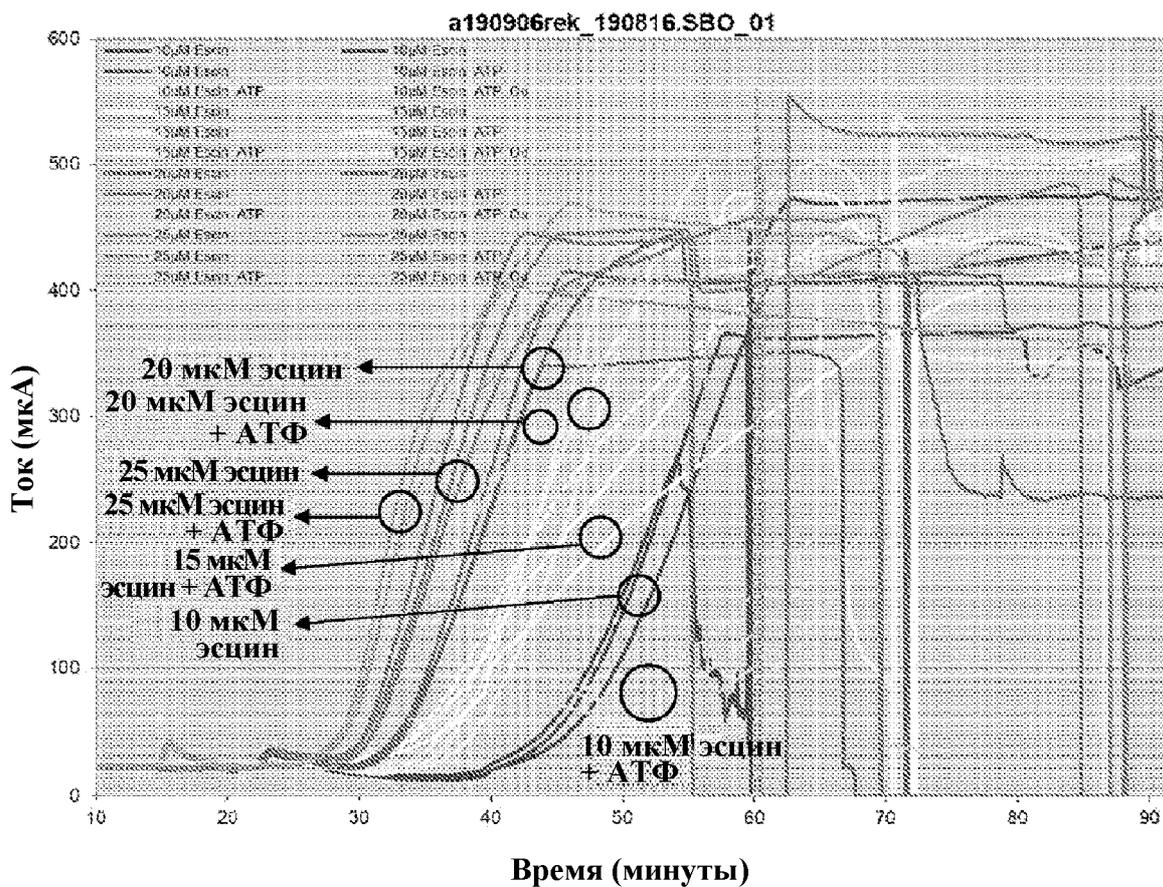




ФИГ. 4

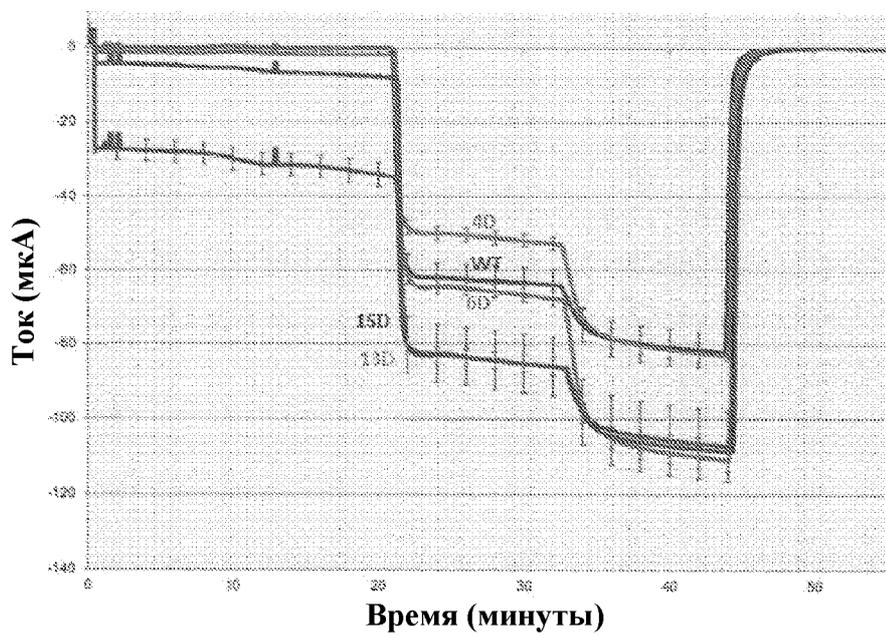


ФИГ. 5

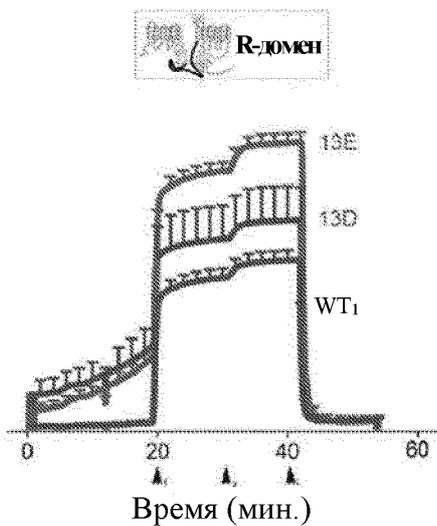


ФИГ. 6

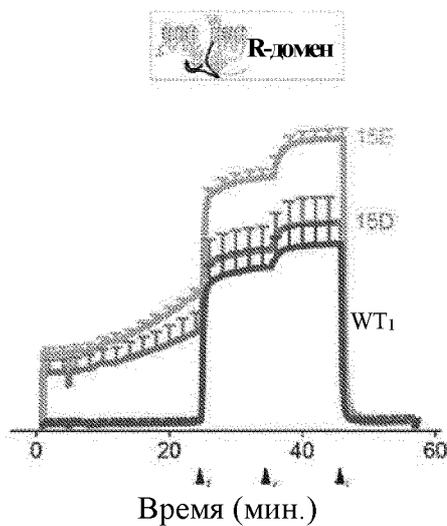




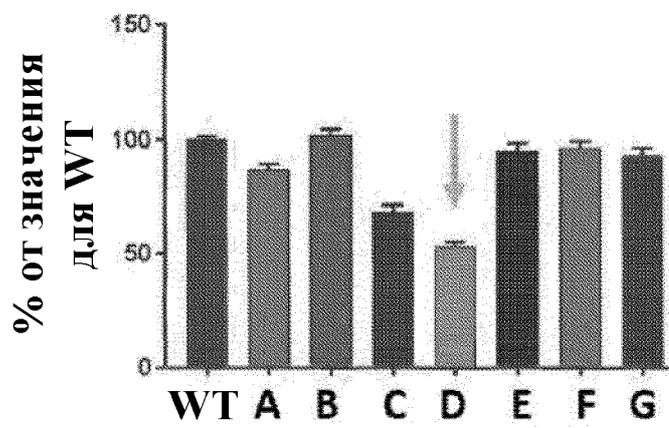
ФИГ. 8



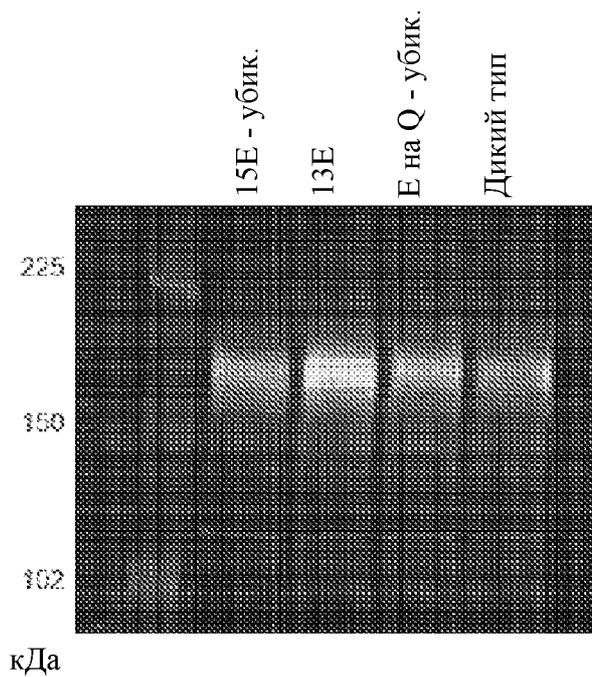
ФИГ. 9А



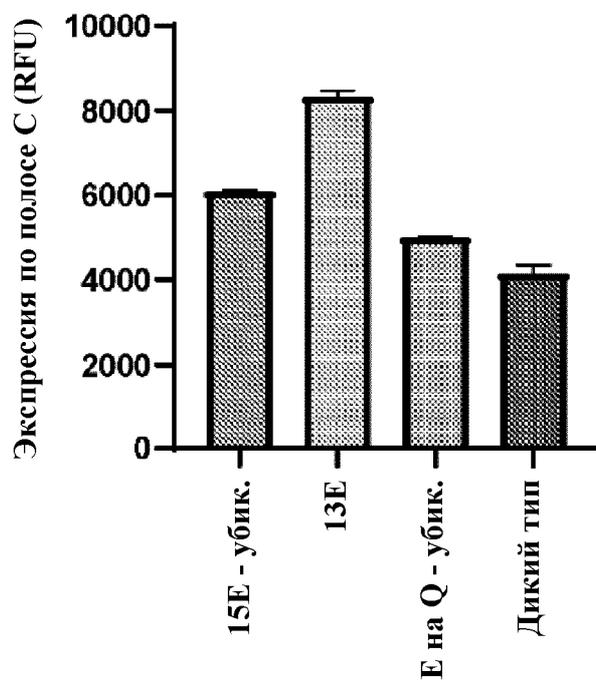
ФИГ. 9В



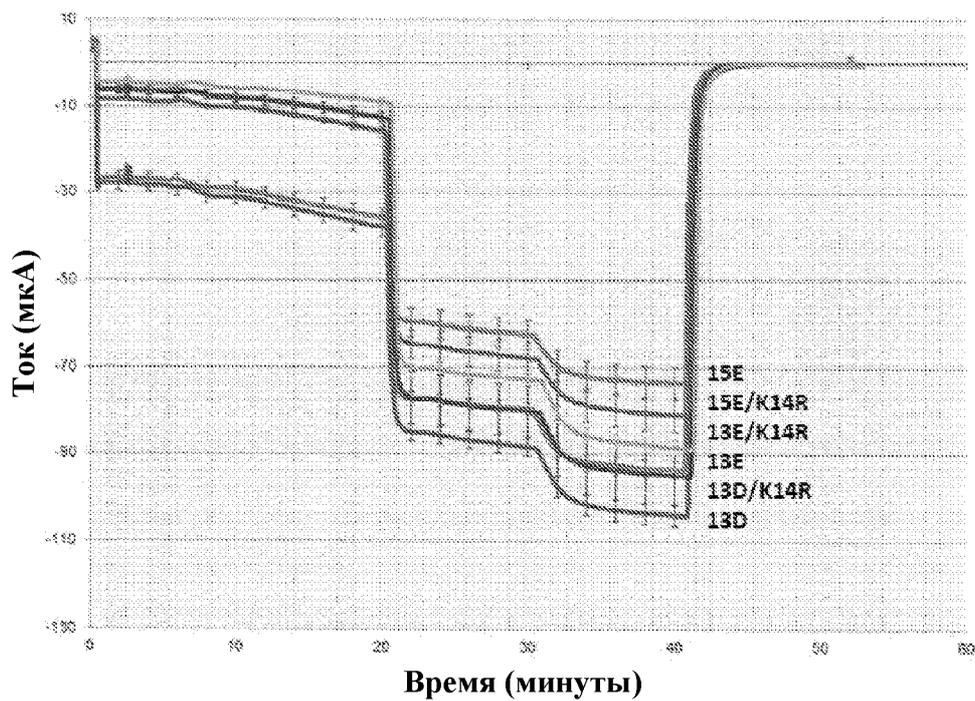
ФИГ. 10



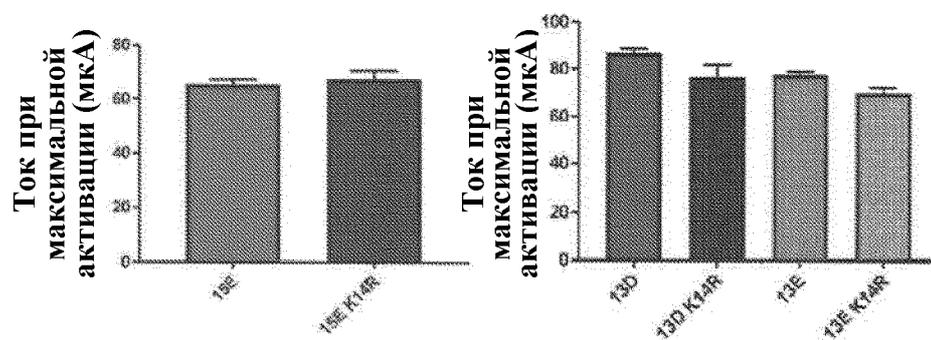
ФИГ. 11А



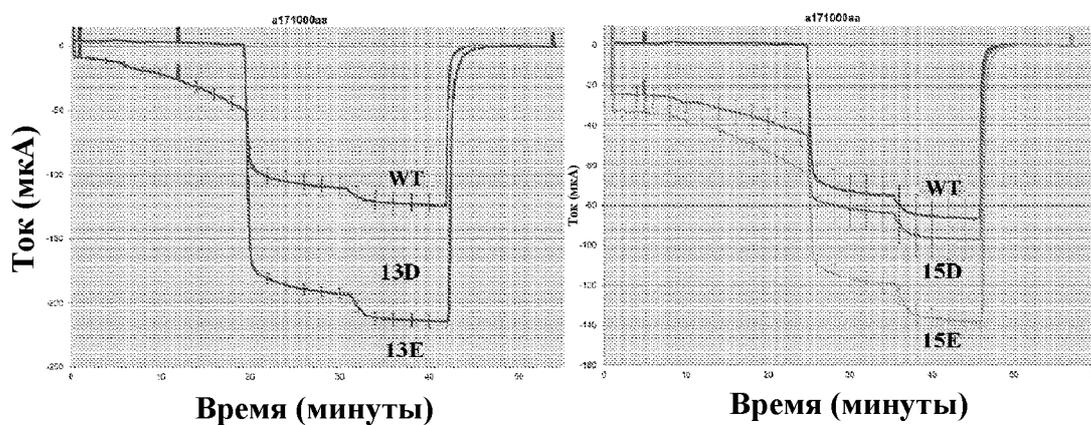
ФИГ. 11В



ФИГ. 11С



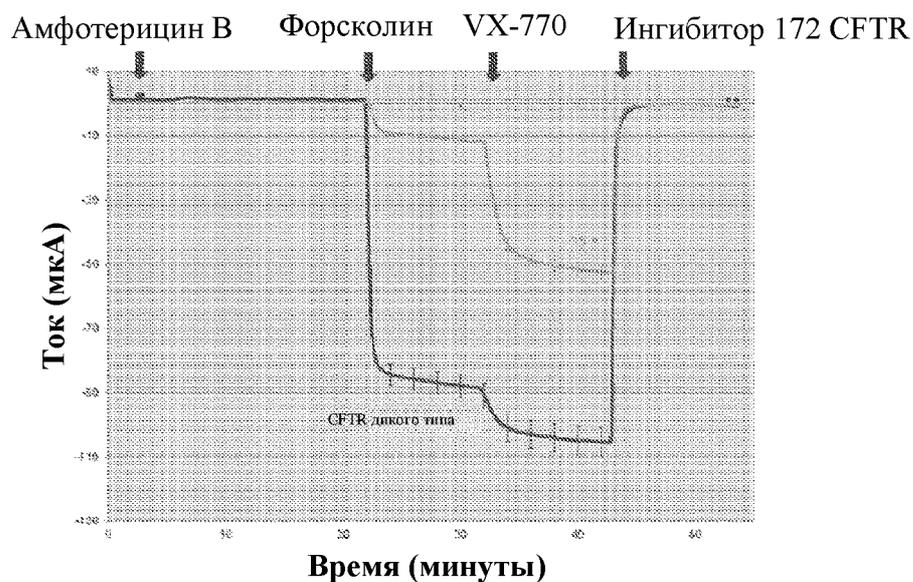
ФИГ. 11D



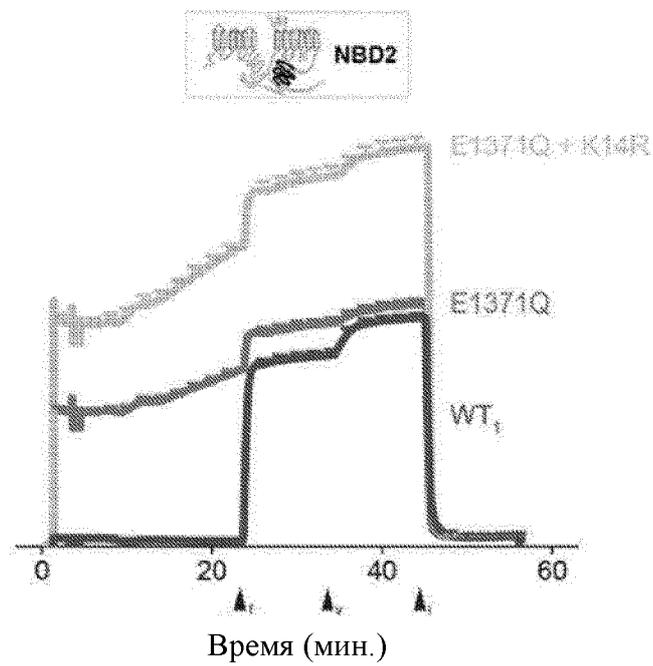
ФИГ. 11E

мРНК для трансфекции Испытуемые группы:	Значение тока на исходном уровне (до обработки амфотерицином В), среднее $\pm$ SEM (n) (мкА/см <sup>2</sup> )	Ответ на форсколин, среднее $\pm$ SEM (n) (мкА/см <sup>2</sup> )	Ответ на VX-770, среднее $\pm$ SEM (n) (мкА/см <sup>2</sup> )	$\Sigma$ ответ на форсколин и VX-770, среднее $\pm$ SEM (n) (мкА/см <sup>2</sup> )	Ответ на ингибитор 172 CFTR, среднее $\pm$ SEM (n) (мкА/см <sup>2</sup> )
WT	-4,66 $\pm$ 1,43 (4) <sup>A</sup>	-80,30 $\pm$ 3,43 (44) <sup>D</sup>	-15,13 $\pm$ 0,89 (4) <sup>C</sup>	-95,43 $\pm$ 4,19 (4) <sup>D</sup>	94,25 $\pm$ 3,93 (4) <sup>A</sup>
15A	-1,01 $\pm$ 0,11 (4) <sup>A</sup>	-10,91 $\pm$ 0,41 (4) <sup>A</sup>	-36,41 $\pm$ 1,48 (4) <sup>D</sup>	-47,33 $\pm$ 1,87 (4) <sup>B</sup>	47,01 $\pm$ 1,79 (4) <sup>D</sup>
15A/E1371Q	-56,01 $\pm$ 1,34 (4) <sup>B</sup>	-8,61 $\pm$ 0,21 (4) <sup>A</sup>	-4,02 $\pm$ 0,27 (4) <sup>A</sup>	-12,83 $\pm$ 0,44 (4) <sup>A</sup>	70,62 $\pm$ 1,33 (4) <sup>B</sup>
15D/E1371Q	-64,75 $\pm$ 1,32 (3) <sup>C</sup>	-4,33 $\pm$ 0,14 (3) <sup>A</sup>	-5,46 $\pm$ 0,11 (3) <sup>A</sup>	-8,76 $\pm$ 0,07 (3) <sup>A</sup>	71,51 $\pm$ 1,84 (3) <sup>B</sup>

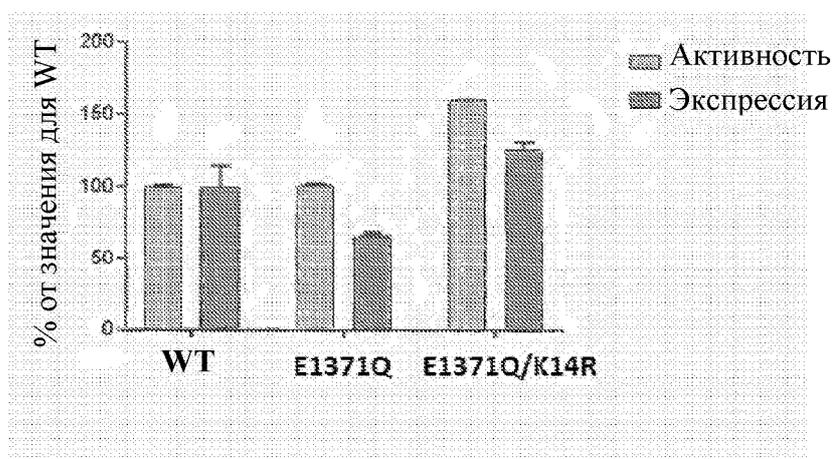
ФИГ. 12А



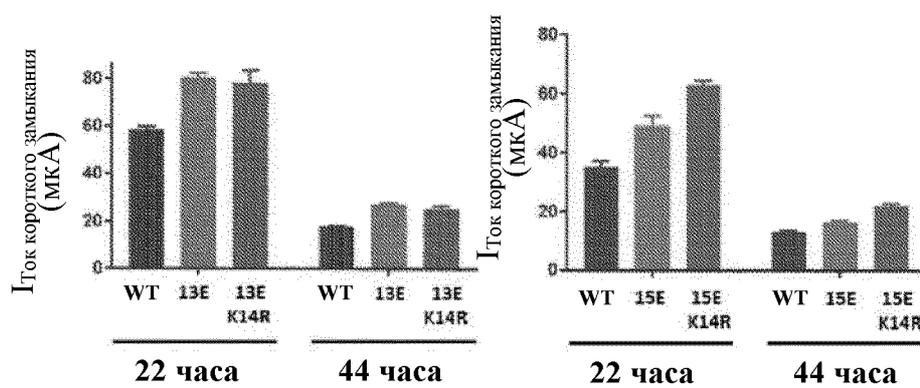
ФИГ. 12В



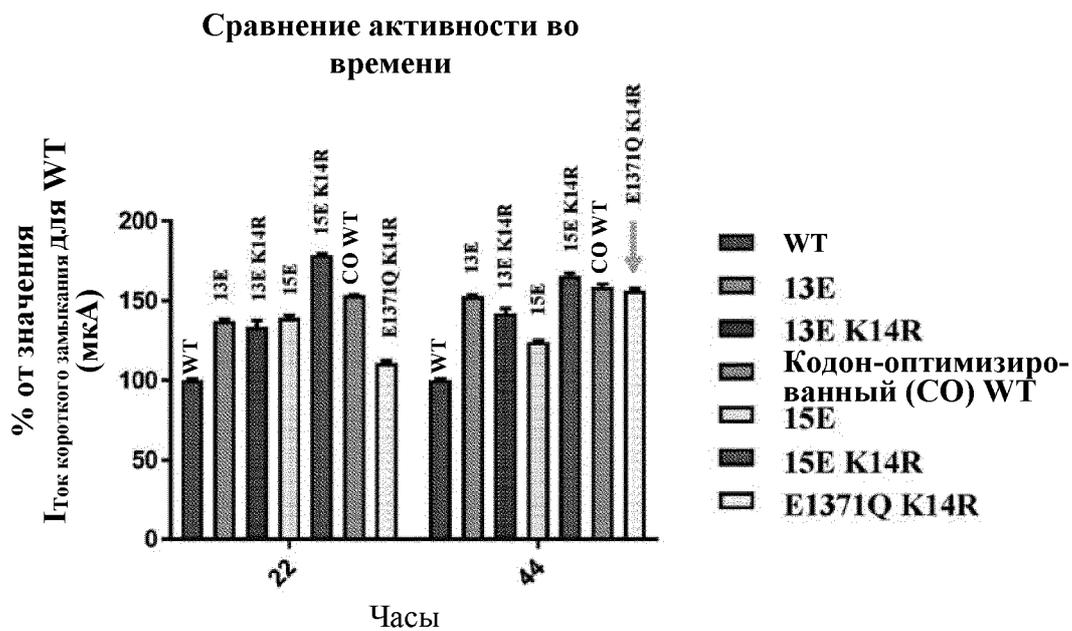
ФИГ. 13А



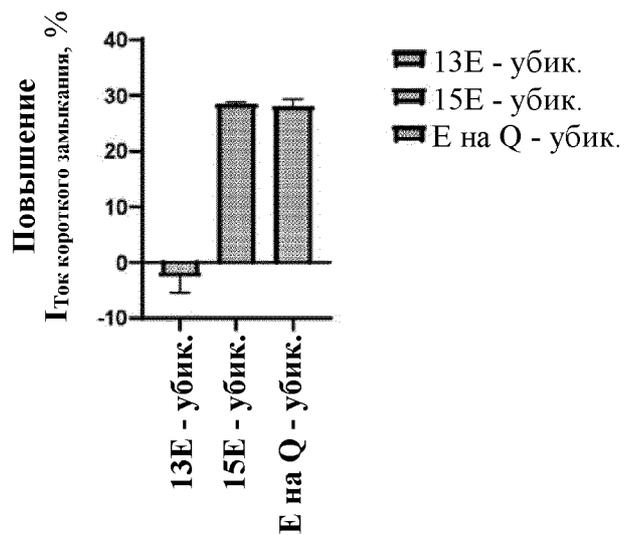
ФИГ. 13В



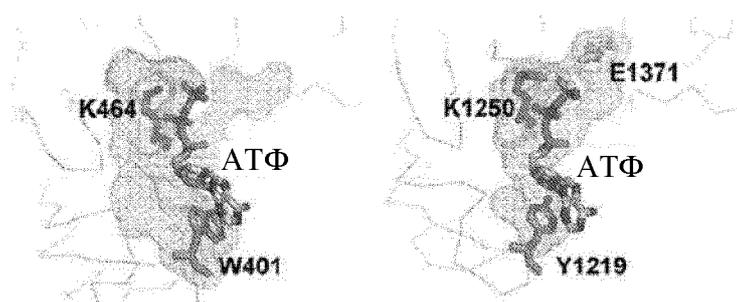
ФИГ. 14А



ФИГ. 14В

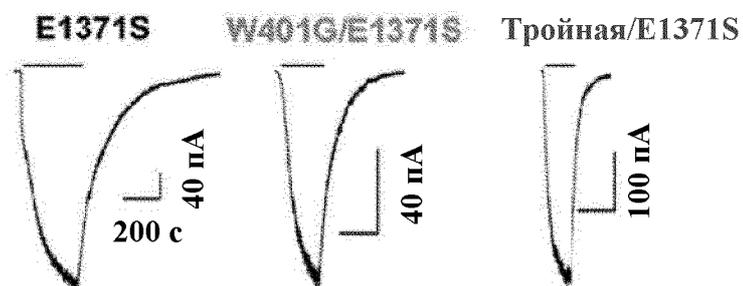


ФИГ. 14С



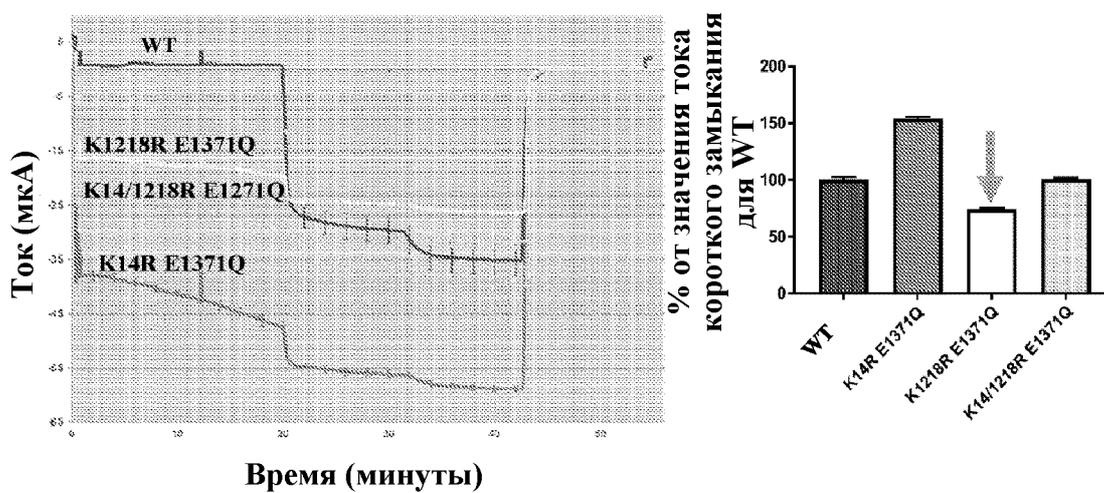
АТФ взаимодействует с указанными остатками в NBD1 и NBD2

ФИГ. 15А

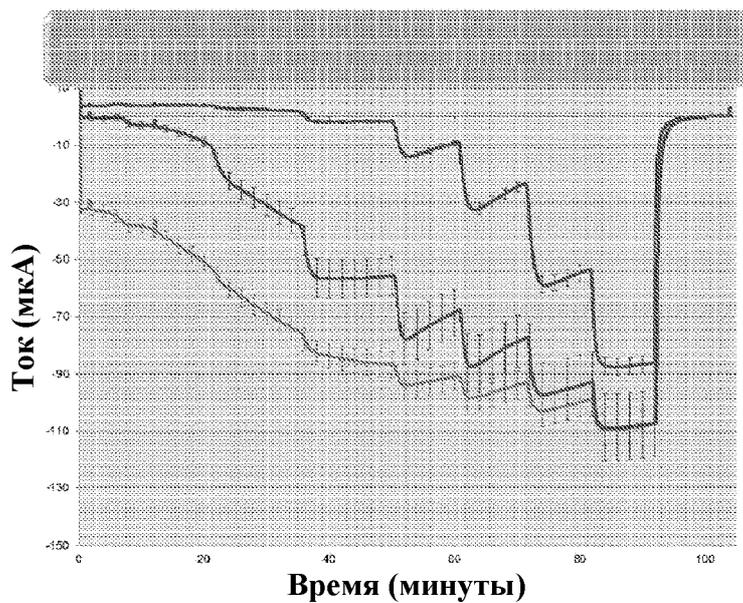


Изменения в указанных остатках модулируют время релаксации канала

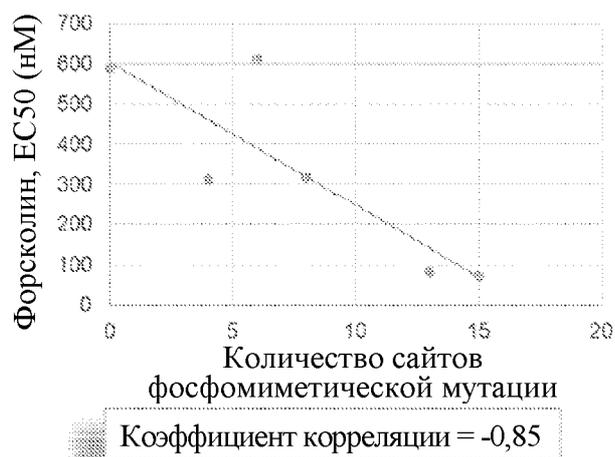
ФИГ. 15В



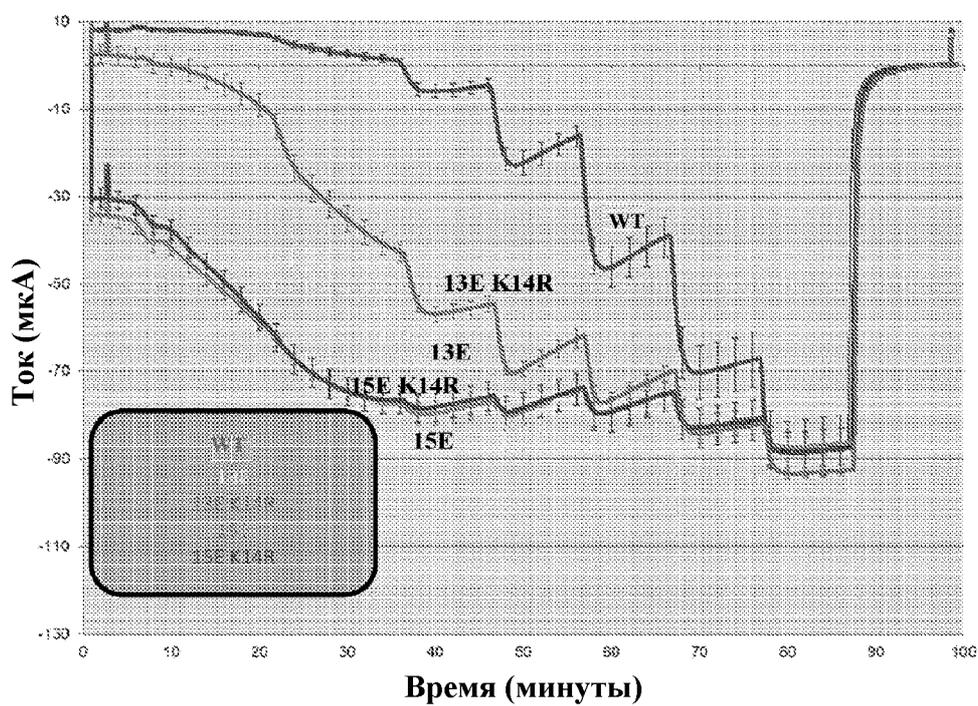
ФИГ. 15С



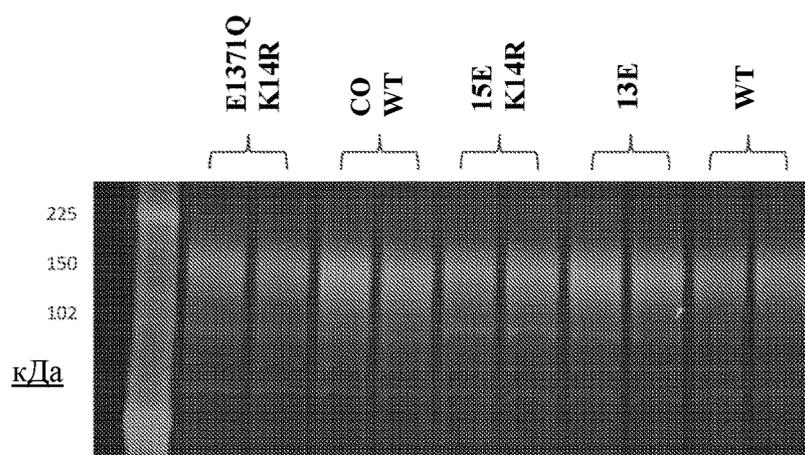
ФИГ. 16А



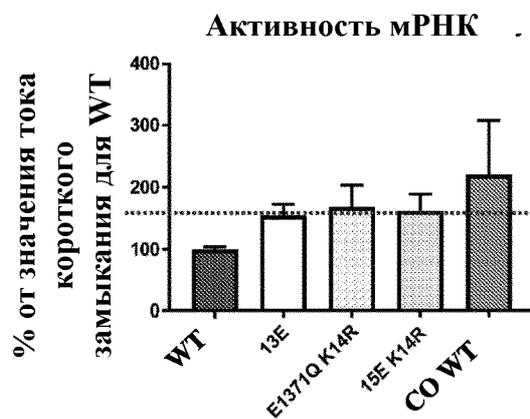
ФИГ. 16В



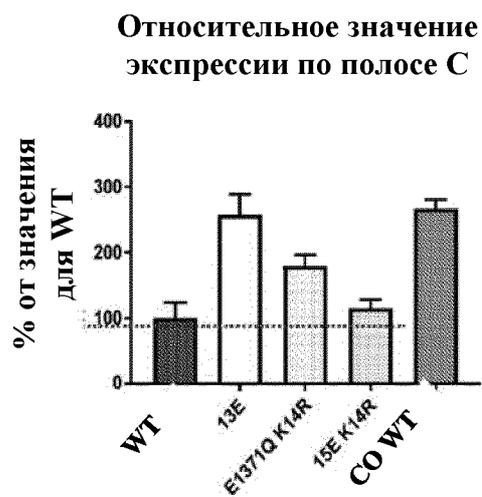
ФИГ. 17



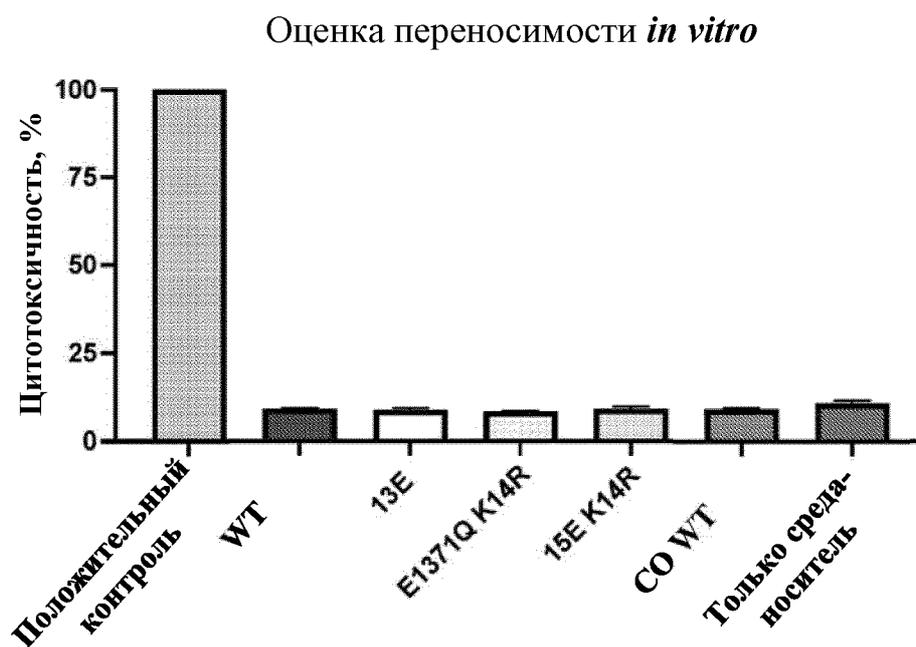
ФИГ. 18А



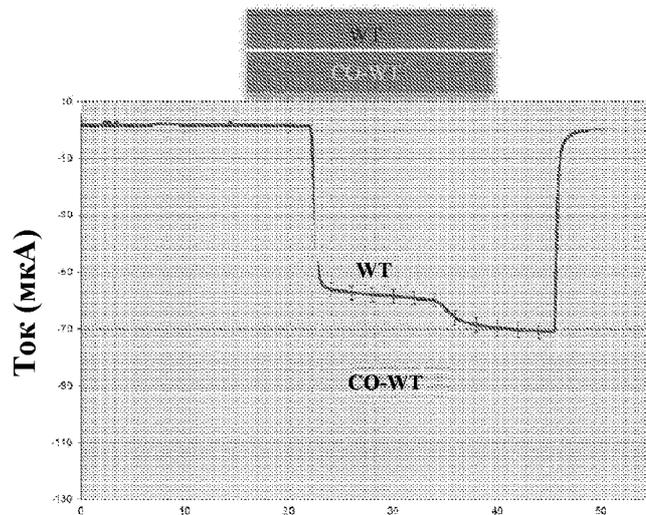
ФИГ. 18В



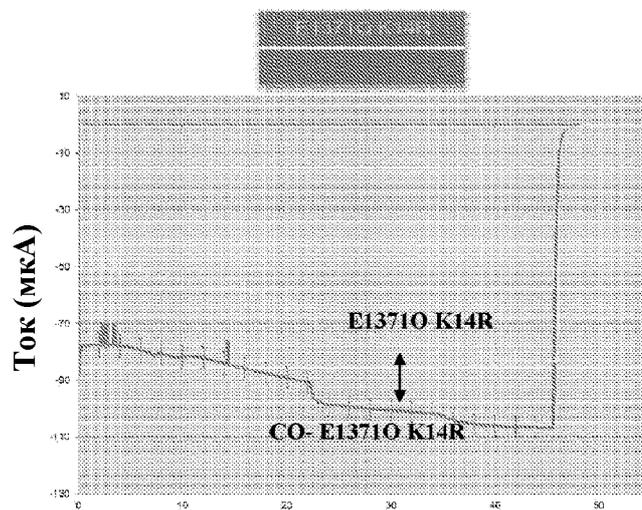
ФИГ. 18С



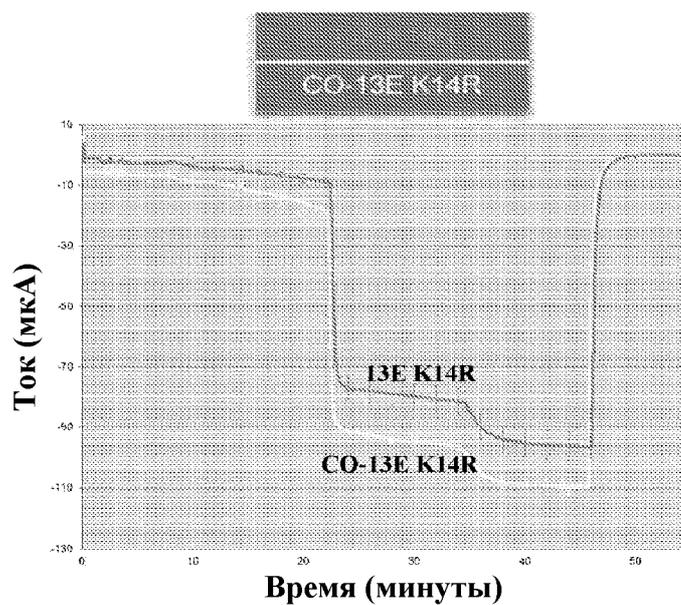
ФИГ. 19



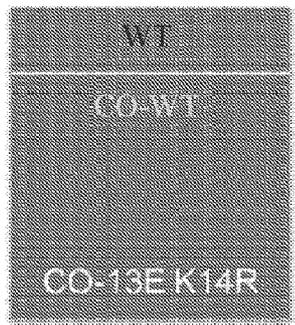
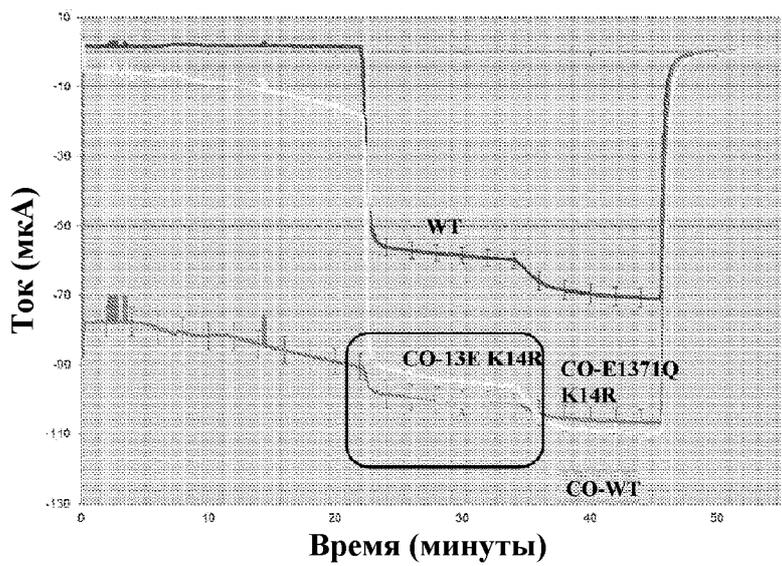
Время (минуты)  
ФИГ. 20А



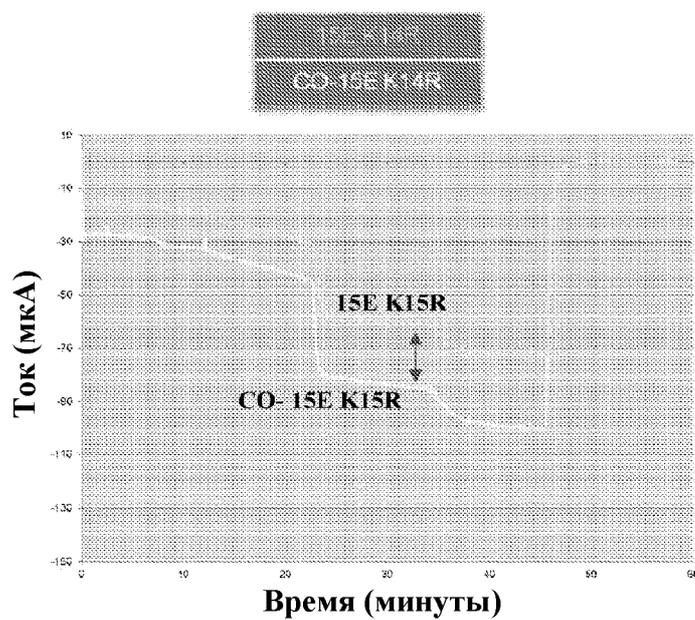
Время (минуты)  
ФИГ. 20В



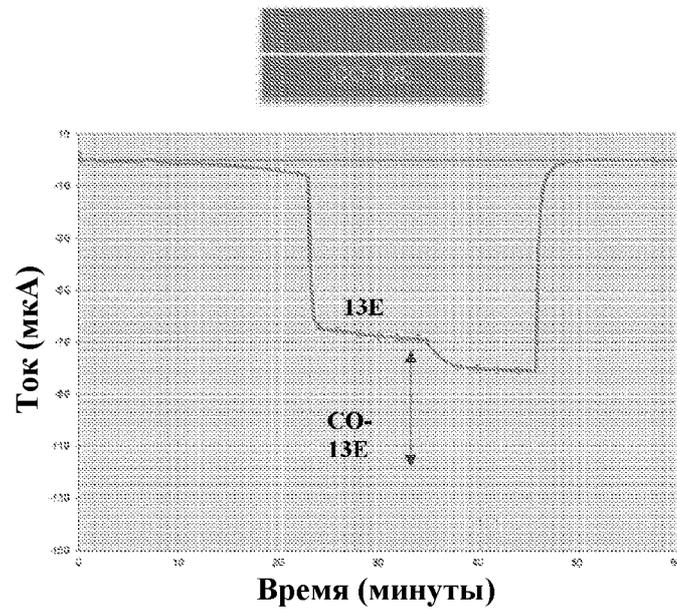
ФИГ. 20С



ФИГ. 20D



ФИГ. 20E



ФИГ. 20F