

R U 2 5 7 3 9 1 2 C 2



(19) RU⁽¹¹⁾ 2 573 912⁽¹³⁾ C2

(51) МПК
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 15/19 (2006.01)
C12N 15/24 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 5/0784 (2010.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011113660/10, 08.10.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
08.10.2009

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
08.10.2008 US 61/103,810

(43) Дата публикации заявки: 20.11.2012 Бюл. № 32

(45) Опубликовано: 27.01.2016 Бюл. № 3

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 2004265288 A1, 30.12.2004. US 2005191659 A1, 01.09.2005. KARZENOWSKI D. ET AL, RheoSwitch(R) Therapeutic System-Inducible Recombinant AAV Vectors for Tightly Regulated Transgene Expression, MOLECULAR THERAPY, 2006, v.13, p. S194. LESSARD J. ET AL., Characterization of the RSLI-dependent conditional expression system in LNCaP prostate cancer (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 10.05.2011

(86) Заявка РСТ:
US 2009/005510 (08.10.2009)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2010/042189 (15.04.2010)

Адрес для переписки:
190000, Санкт-Петербург, ул. Малая Морская,
15, офис 5, BOX 1125, ООО "ПАТЕНТИКА",
М.И.Ниловой

(72) Автор(ы):

БИЧ Роберт Паттерсон (US),
РИД Томас Д. (US)

(73) Патентообладатель(и):

ИНТРЕКСОН КОРПОРЕЙШН (US)

(54) СКОНСТРУИРОВАННЫЕ КЛЕТКИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ МНОЖЕСТВЕННЫЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРЫ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

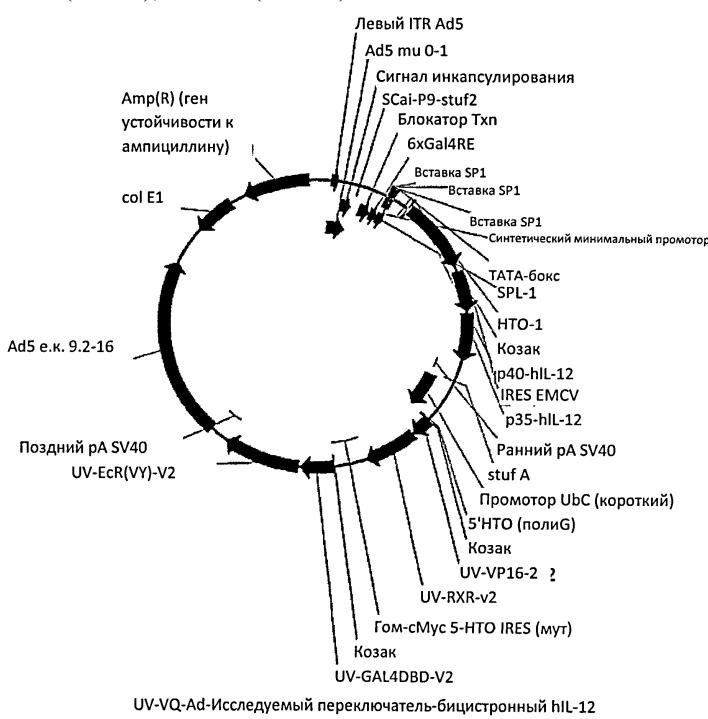
(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии и может быть использовано для рекомбинантной экспрессии иммуномодуляторных белков. Конструируют вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий генный переключатель, при этом указанный полинуклеотид содержит (1) по меньшей мере

одну последовательность фактора транскрипции, которая функционально связана с промотором, при этом указанная по меньшей мере одна последовательность фактора транскрипции кодирует лиганд-зависимый фактор транскрипции, и (2) полинуклеотид, кодирующий полипептид IL-12 и один или более

иммуномодуляторных полипептидов, выбранных из IL-2, IL-7, IL-15, IL-18, GM-CSF, CCL3 (MIP-1a), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP3), XCL1 (лимфотактин), CCL19 (MIP-3b), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10), CXCL12 (SDF-1), CCL21 (6Ckine)

или TNF-альфа. Изобретение позволяет использовать вектор для управляемой экспрессии иммуномодуляторных белков. 4 н. и 8 з.п. ф-лы, 9 ил., 4 табл., 2 пр.



ФИГ. 1

(56) (продолжение):

cells and development of a single vector format, PROSTATE, 2007, v. 67, n. 8, p. 808-819. US 20080124360 A1, 29.05.2008. VUJANOVIC L. ET AL., IL-12p70 and IL-18 gene-modified dendritic cells loaded with tumor antigen-derived peptides or recombinant protein effectively stimulate specific Type-1 CD4(+) T-cell responses from normal donors and melanoma patients in vitro, CANCER GENE THERAPY, 2006, v.13, n.8, p.798-805. MAZZOLINI G. et al., Intratumoral injection of dendritic cells engineered to secrete interleukin-12 by recombinant adenovirus in patients with metastatic gastrointestinal carcinomas, J. Clin. Oncol., 2005, v.23, n.5, p.999-1010. RU 2313365 C2, 27.12.2007.

C2

RU 2573912

RU

RU 2573912 C2



(19) RU (11) 2 573 912 (13) C2

(51) Int. Cl.
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 15/19 (2006.01)
C12N 15/24 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 5/0784 (2010.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2011113660/10, 08.10.2009

(24) Effective date for property rights:
08.10.2009

Priority:

(30) Convention priority:
08.10.2008 US 61/103,810

(43) Application published: 20.11.2012 Bull. № 32

(45) Date of publication: 27.01.2016 Bull. № 3

(85) Commencement of national phase: 10.05.2011

(86) PCT application:
US 2009/005510 (08.10.2009)

(87) PCT publication:
WO 2010/042189 (15.04.2010)

Mail address:

190000, Sankt-Peterburg, ul. Malaja Morskaja, 15,
ofis 5, VOKh 1125, OOO "PATENTIKA",
M.I.Nilovoj

(72) Inventor(s):

BICh Robert Patterson (US),
RID Tomas D. (US)

(73) Proprietor(s):

INTREKSON KORPOREJSHN (US)

R U 2 5 7 3 9 1 2 C 2

(54) CONSTRUCTED CELLS, EXPRESSING MULTIPLE IMMUNOMODULATORS, AND THEREOF APPLICATION

(57) Abstract:

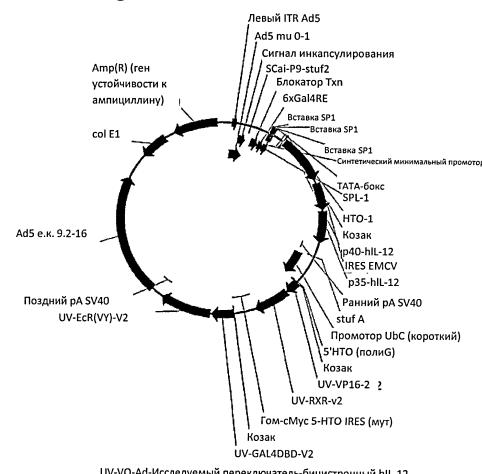
FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: claimed invention relates to field of biotechnology and can be used for recombinant expression of immunomodulatory proteins. Vector, containing polynucleotide which codes gene switch, is constructed, with said polynucleotide containing (1) at least one transcription factor sequence which is functionally bound with promoter, with said at least one transcription factor sequence coding ligand-dependent transcription factor, and (2) polynucleotide, which codes peptide IL-12 an one or more immunomodulatory polypeptides, selected from IL-2, IL-7, IL-15, IL-18, IL-21, GM-CSF, CCL3 (MIP-1a), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP3), XCL1 (lymphotoxin), CCL19 (MIP-3b), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10), CXCL12 (SDF-1), CCL21 (6Ckine) or TNF-alpha.

EFFECT: invention makes it possible to use vector

for controlled expression of immunomodulatory proteins.

12 cl, 9 dwg, 4 tbl, 2 ex



ФИГ. 1

ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США, номер 61/103,810, поданной 8 октября 2008 г., которая настоящим полностью включена в данную заявку посредством ссылки.

⁵ **ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРИЛОЖЕННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ ПОСРЕДСТВОМ СИСТЕМЫ EFS-WEB**

[0002] Содержание приложенного в электронном виде перечня последовательностей (название: sequence listing.ST25.txt; размер: 213102 байта; дата создания: 8 октября 2009 г.), поданного вместе с настоящей заявкой, полностью включено в данную заявку

¹⁰ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Область техники

[0003] Настоящее изобретение относится к области генной терапии, направленной на лечение заболеваний и расстройств, таких как рак. В одном варианте реализации ¹⁵ настоящее изобретение обеспечивает конструирование иммунных клеток или вспомогательных клеток для терапии (TSC) таким образом, чтобы они экспрессировали один или более иммуномодуляторов, и применение указанных клеток в качестве лекарственного средства.

Уровень техники

²⁰ [0004] Интерлейкин-12 (IL-12) представляет собой член семейства цитокинов I типа, который участвует во множестве биологических процессов, включая защитный иммунный ответ и подавление онкогенеза, но не ограничивается ими (Abdi и др., 2006; Adorini, 1999; Adorini, 2001; Adorini и др., 2002; Adorini и др., 1996; Akhtar и др., 2004; Akiyama и др., 2000; Al-Mohanna и др., 2002; Aliberti и др., 1996; Allavena и др., 1994; Alii ²⁵ и Khar, 2004; Alzona и др., 1996; Amemiya и др., 2006; Araujo и др., 2001; Arulanandam и др., 1999; Athie и др., 2000; Athie-Morales и др., 2004; Bertagnolli и др., 1992; Bhardwaj и др., 1996; Biedermann и др., 2006; Brunda и Gately, 1994; Buchanan и др., 1995; Romani и др., 1997; Rothe и др., 1996; Satoskar и др., 2000; Schopfn и др., 1999; Thomas и др., 2000; Tsung и др., 1997; Wolf и др., 1994; Yuminamochi и др., 2007). Все большее число ³⁰ полученных данных позволяет предположить, что IL-12 может представлять собой перспективную мишень для борьбы с заболеваниями человека (например, раком).

[0005] Несмотря на тот факт, что IL-12 остается перспективным агентом для терапии рака, благодаря наличию сильного вспомогательного действия на противоопухолевые клетки NK 1 типа, CD4⁺ T-клетки и CD8⁺ T-клетки (Trinchieri, 2003), описанная ³⁵ токсичность рекомбинантного IL-12 человека (rhIL-12) у пациентов (Atkins и др., 1997), а также ограниченное количество источников, из которых можно получить rhIL-12 со степенью чистоты, удовлетворяющей требованиям GMP для клинического применения, создают препятствия для успешного применения терапевтических подходов, основанных на IL-12. Таким образом, возможно геннотерапевтические подходы могут представлять ⁴⁰ собой более безопасные, более надежные варианты лечения. Действительно, в I фазе клинических испытаний введение рекомбинантной кДНК IL-12 на основе вируса внутрь опухоли или рядом с ней (Sangro и др., 2004; Triozzi и др., 2005) или плазмида (Heinzerling и др., 2005), или аутологических фибробластов, модифицированных геном IL-12 (Kang и др., 2001), оказалась безопасной и хорошо переносимой.

⁴⁵ [0006] Тем не менее, объективные клинические ответы пациентов, страдающих меланомой или разнообразными формами карцином, которые получали данные геннотерапевтические средства, были редкими, переменными, временными и преимущественно сосредоточенными в месте введения лекарственного средства

(Heinzeriing и др., 2005; Kang и др., 2001; Sangro и др., 2004; Trizzi и др., 2005). В случаях, когда наблюдалось частичное или полное излечение от заболевания, отмечали повышенную встречаемость инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (Heinzeriing и др., 2005; Sangro и др., 2004) и повышенные уровни опухолеспецифических CD8+ Т-клеток в кровотоке (Heinzeriing и др., 2005), что согласуется с улучшенным примирением перекрестнореагирующими антигеном антигенспецифических Т-клеток у таких пациентов.

[0007] Поскольку примирение перекрестнореагирующими антигеном специфических Т-клеток лучше всего осуществляют дендритные клетки (DC), которые служат природным, хотя и регулируемым, источником IL-12 (Berard и др., 2000), недавние сообщения о превосходной доклинической эффективности основанной на дендритных клетках генной терапии IL-12 представляли огромный интерес (Satoh и др., 2002; Tatsumi и др., 2003; Yamanaka и др., 2002). Например, было показано, что внутриопухолевая (i.t.) инъекция DC, сконструированных таким образом, что они продуцировали IL-12p70 (путем инфекции рекомбинантным аденоовирусом), приводит к значительному улучшению примирения перекрестнореагирующими антигеном набора опухолеспецифических CD8⁺ Т-клеток широкого спектра действия и к отторжению опухоли в моделях на мышах (Tatsumi и др., 2003). С учетом предыдущего применения рекомбинантного аденоовириуса, кодирующего mIL-12 под контролем промотора CMV (rAd.cIL12, (Tatsumi и др., 2003)), продуцирование IL-12 сконструированными DC было конститутивным, следовательно, иммунологическое действие данного цитокина, направленное сначала на повреждение опухоли, а затем на дренирующие опухоль лимфатические узлы, невозможно предугадать по отношению к результату терапии. Таким образом, существует потребность в DC, сконструированных для экспрессии IL-12 при определенных условиях, с целью регуляции как уровня экспрессии трансгена, так и момента активации трансгена. Настоящее изобретение обеспечивает многообещающий результат терапии при применении таких клеток.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0008] Настоящее изобретение обеспечивает рекомбинантный вектор, кодирующий белок (белки), обладающий (обладающие) функцией (функциями) одного или нескольких иммуномодуляторов, под контролем одного или нескольких промоторов. В одном варианте реализации настоящего изобретения, один или более промоторов являются промоторами, функционирующими при определенных условиях. В другом варианте реализации настоящего изобретения, один или более промоторов являются конститутивными. В другом варианте реализации настоящего изобретения, вектор представляет собой аденоовириусный вектор, кодирующий белок (белки), экспрессия которого (которых) запускается промотором, который может быть активирован при определенных условиях путем обеспечения растворимого низкомолекулярного лиганда, такого как диацилгидразины (например, RG-115819, RG-115830 или RG-115932). Такой вектор позволяет контролировать экспрессию указанного белка (белков) иммунными клетками и TSC.

[0009] В одном варианте реализации, настоящее изобретение обеспечивает вектор для определяемой условиями экспрессии белка(белков), обладающего функцией (функциями) одного или нескольких иммуномодуляторов, содержащий полинуклеотид, кодирующий генный переключатель, при этом указанный полинуклеотид, кодирующий генный переключатель, содержит (1) по меньшей мере одну последовательность фактора транскрипции, функционально связанную с промотором, при этом указанная по меньшей мере одна последовательность фактора транскрипции кодирует лиганд-зависимый фактор транскрипции, и (2) полинуклеотид, кодирующий один или более белков,

обладающих функцией иммуномодулятора, связанный с промотором, который активируется указанным лиганд-зависимым фактором транскрипции. В одном варианте реализации настоящего изобретения, иммуномодулятор выбирают из IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10R DN или его субъединицы, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, IL-24, IL-27, GM-CSF, IFN-альфа, IFN-гамма, CCL3 (MIP-1a), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP3), XCL1 (лимфотактина), CXCL1 (MGSA-альфа), CCR7, CCL19 (MIP-3b), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10), CXCL12 (SDF-1), CCL21 (6Ckine), OX40L, 4-1BBL, CD40, CD70, GITRL, LIGHT, б-дефензина, HMGB1, Flt3L, IFN-бета, TNF-альфа, dnFADD, TGF-альфа, РНКи PD-L1, антисмылового олигонуклеотида PD-L1, TGFbRII DN, ICOS-L и S100.

- 5 [00010] В другом варианте реализации, настоящее изобретение обеспечивает вектор для экспрессии белка (белков), обладающего функцией (функциями) одного или нескольких иммуномодуляторов, и белка, обладающего функцией IL-12, содержащий полинуклеотид, кодирующий генный переключатель, при этом указанный полинуклеотид содержит (1) по меньшей мере одну последовательность фактора транскрипции, 10 функционально связанную с промотором, при этом указанная по меньшей мере одна последовательность фактора транскрипции кодирует лиганд-зависимый фактор транскрипции, (2) полинуклеотид, кодирующий указанный белок(белки), обладающий функцией (функциями) одного или нескольких иммуномодуляторов, и (3) полинуклеотид, кодирующий белок, обладающий функцией IL-12; при этом по меньшей мере один 15 полинуклеотид из (2) и (3) связан с промотором, который активируется лиганд-зависимым фактором транскрипции.

20 [00011] Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает способ получения популяции клеток, например, иммунных клеток или TSC, экспрессирующих белок (белки), обладающие функцией (функциями) одного или нескольких иммуномодуляторов, 25 путем модификации (например, трансфекции, электропорации и т.д.) указанных клеток рекомбинантным вектором, при определенных условиях экспрессирующем белок (белки), обладающий функцией (функциями) одного или нескольких иммуномодуляторов, при этом указанный вектор содержит полинуклеотид, кодирующий генный переключатель, при этом указанный полинуклеотид содержит (1) по меньшей мере одну последовательность фактора транскрипции, функционально связанную с 30 промотором, при этом указанная по меньшей мере одна последовательность фактора транскрипции кодирует лиганд-зависимый фактор транскрипции, и (2) полинуклеотид, кодирующий один или более белков, обладающих функцией иммуномодулятора, связанный с промотором, который активируется указанным лиганд- зависимым 35 фактором транскрипции.

40 [00012] В другом варианте реализации, настоящее изобретение обеспечивает способ получения популяции клеток, например, иммунных клеток или TSC, экспрессирующих белки, обладающие функцией (функциями) одного или нескольких иммуномодуляторов, и белок, обладающий функцией IL-12, путем модификации клеток рекомбинантным вектором, содержащим полинуклеотид, кодирующий генный переключатель, при этом указанный полинуклеотид содержит (1) по меньшей мере одну последовательность фактора транскрипции, функционально связанную с промотором, при этом указанная по меньшей мере одна последовательность фактора транскрипции кодирует лиганд- зависимый фактор транскрипции, (2) полинуклеотид, кодирующий указанный белок 45 (белки), обладающий функцией (функциями) одного или нескольких иммуномодуляторов, и (3) полинуклеотид, кодирующий белок, обладающий функцией IL-12; при этом по меньшей мере один полинуклеотид из (2) и (3) связан с промотором, который активируется указанным лиганд- зависимым фактором транскрипции.

[00013] Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает популяцию клеток, например, иммунных клеток или TSC, экспрессирующих белок (белки), обладающий функцией (функциями) одного или нескольких иммуномодуляторов, которая была модифицирована (например, путем трансфекции, электропорации и т.д.)

- 5 рекомбинантным вектором, при определенных условиях экспрессирующим белок (белки), обладающий функцией (функциями) одного или нескольких иммуномодуляторов, при этом указанный вектор содержит полинуклеотид, кодирующий генный переключатель, при этом указанный полинуклеотид содержит (1) по меньшей мере одну последовательность фактора транскрипции, функционально связанную с
- 10 промотором, при этом указанная по меньшей мере одна последовательность фактора транскрипции кодирует лиганд-зависимый фактор транскрипции, и (2) полинуклеотид, кодирующий один или более белков, обладающих функцией иммуномодулятора, связанный с промотором, который активируется указанным лиганд- зависимым фактором транскрипции.

- 15 [00014] В другом варианте реализации, настоящее изобретение обеспечивает популяцию клеток, например, иммунных клеток или TSC, экспрессирующих белки, обладающие функцией(ями) одного или нескольких иммуномодуляторов, и белок, обладающий функцией IL-12, которая была модифицирована рекомбинантным вектором, включающим полинуклеотид, кодирующий генный переключатель, при этом указанный
- 20 полинуклеотид содержит (1) по меньшей мере одну последовательность фактора транскрипции, функционально связанную с промотором, при этом указанная по меньшей мере одна последовательность . фактора транскрипции кодирует лиганд-зависимый фактор транскрипции, (2) полинуклеотид, кодирующий указанный белок (белки), обладающий функцией (функциями) одного или нескольких иммуномодуляторов, и (3)
- 25 полинуклеотид, кодирующий белок, обладающий функцией IL-12; при этом по меньшей мере один полинуклеотид из (2) и (3) связан с промотором, который активируется указанным лиганд- зависимым фактором транскрипции.

- [00015] В другом варианте реализации, настоящее изобретение обеспечивает композицию, содержащую две или более популяций клеток согласно настоящему изобретению, например, иммунных клеток или TSC, при этом каждая популяция клеток в указанной композиции экспрессирует один или более иммуномодуляторов, которые отличаются от одного или нескольких иммуномодуляторов, экспрессируемых другой популяцией (популяциями) клеток в указанной композиции. В одном варианте реализации, указанная композиция содержит две популяции клеток. В другом варианте реализации, композиция содержит более двух популяций клеток. В другом варианте реализации, композиция содержит три популяции клеток. В другом варианте реализации, композиция содержит четыре популяции клеток.

- [00016] В другом варианте реализации, настоящее изобретение обеспечивает сконструированную *in vitro* клетку, например, иммунную клетку или TSC, содержащую вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий генный переключатель, при этом указанный полинуклеотид содержит (1) по меньшей мере одну последовательность фактора транскрипции, функционально связанную с промотором, при этом указанная по меньшей мере одна последовательность фактора транскрипции кодирует лиганд- зависимый фактор транскрипции, и (2) полинуклеотид, кодирующий белок, обладающий функцией иммуномодулятора, связанный с промотором, который активируется указанным лиганд- зависимым фактором транскрипции. В другом варианте реализации, настоящее изобретение обеспечивает сконструированную *in vitro* клетку, например, иммунную клетку или TSC, содержащую вектор, включающий полинуклеотид,

кодирующий генный переключатель, при этом указанный полинуклеотид содержит (1) по меньшей мере одну последовательность фактора транскрипции, функционально связанную с промотором, при этом указанная по меньшей мере одна последовательность фактора транскрипции кодирует лиганд-зависимый фактор транскрипции, (2)

5 полинуклеотид, кодирующий белок, обладающий функцией иммуномодулятора, и (3) полинуклеотид, кодирующий белок, обладающий функцией IL-12; при этом по меньшей мере один полинуклеотид из (2) и (3) связан с промотором, который активируется указанным лиганд- зависимым фактором транскрипции.

[00017] В другом варианте реализации, настоящее изобретение обеспечивает

10 композицию, содержащую две или более популяций сконструированных *in vitro* клеток, например, иммунных клеток или TSC, согласно настоящему изобретению, при этом каждая из популяций сконструированных *in vitro* клеток в композиции содержит вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий генный переключатель, при этом указанный полинуклеотид содержит (1) по меньшей мере одну последовательность фактора

15 транскрипции, функционально связанную с промотором, при этом указанная по меньшей мере одна последовательность фактора транскрипции кодирует лиганд- зависимый фактор транскрипции, и (2) полинуклеотид, кодирующий белок, обладающий функцией иммуномодулятора, связанный с промотором, который активируется указанным лиганд- зависимым фактором транскрипции, и при этом каждая популяция сконструированных

20 *in vitro* клеток в композиции экспрессирует один или более иммуномодуляторов, которые отличаются от одного или нескольких иммуномодуляторов, экспрессируемых другой популяцией(ями) сконструированных *in vitro* клеток в указанной композиции. В одном варианте реализации, настоящее изобретение обеспечивает композицию, содержащую две или более популяций сконструированных *in vitro* клеток, например, иммунных клеток

25 или TSC, при этом каждая из указанных популяций клеток содержит вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий генный переключатель, при этом указанный полинуклеотид содержит (1) по меньшей мере одну последовательность фактора транскрипции, функционально связанную с промотором, при этом указанная по меньшей мере одна последовательность фактора транскрипции кодирует лиганд- зависимый

30 фактор транскрипции, (2) полинуклеотид, кодирующий белок, обладающий функцией иммуномодулятора, и (3) полинуклеотид, кодирующий белок, обладающий функцией IL-12; при этом по меньшей мере один полинуклеотид из (2) и (3) связан с промотором, который активируется указанным лиганд- зависимым фактором транскрипции. В одном варианте реализации, указанная композиция содержит две популяции сконструированных

35 *in vitro* клеток. В другом варианте реализации, композиция содержит более двух популяций сконструированных *in vitro* клеток. В другом варианте реализации, композиция содержит три популяции сконструированных *in vitro* клеток. В другом варианте реализации, композиция содержит четыре популяции сконструированных *in vitro* клеток.

40 [00018] Настоящее изобретение также обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую популяцию клеток, например, иммунных клеток или TSC, описанных в данной заявке.

[00019] В одном варианте реализации настоящего изобретения, полинуклеотид, кодирующий один или более белков, обладающих функциями иммуномодуляторов, 45 находится под контролем промотора генного переключателя и полинуклеотид, кодирующий белок, обладающий функцией IL-12, находится под контролем конститутивного промотора. В другом варианте реализации настоящего изобретения, как полинуклеотид, кодирующий белок (белки), обладающий функцией

иммуномодулятора(ов), так и полинуклеотид, кодирующий белок, обладающий функцией IL-12, находятся под контролем мультицистронного промотора генного переключателя. В другом варианте реализации настоящего изобретения, полинуклеотид, кодирующий белок (белки), обладающий функцией(ями) иммуномодулятора(ов), находится под

- 5 контролем промотора генного переключателя и полинуклеотид, кодирующий белок, обладающий функцией IL-12, находится под контролем промотора, функционирующего в определенных условиях, который отличается от промотора генного переключателя. В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения, система регуляции генов для полинуклеотида, кодирующего белок (белки), обладающий функцией(ями) 10 иммуномодулятора(ов), и система регуляции генов для полинуклеотида, обладающего функцией IL-12, являются независимыми. В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения, система регуляции генов для каждого полинуклеотида, кодирующего каждый белок, является независимой.

[00020] В одном варианте реализации, настоящее изобретение также обеспечивает

- 15 лечение рака, такого как, меланомные опухоли, глиомные опухоли, рак почки и раки предстательной железы, а также раков, перечисленных в данной заявке в Таблице 1, но не ограничивается ими. Генотерапия IL-12 продемонстрировала противоопухолевую эффективность в исследованиях моделей на животных в виде вектора рекомбинантной кДНК (Faure и др., 1998; Sangro и др., 2005), но даже более того, в контексте 20 генномодифицированных дендритных клеток (Satoh и др., 2002; Svane и др., 1999; Tatsumi и др., 2003; Yamanaka и др., 2002). На сегодняшний день, тем не менее, I фаза клинических испытаний на человеке генотерапии IL-12 с внедрением плазмид или вирусных векторов не позволила достигнуть длительных, объективных клинических ответов для лечения рака (Heinzerling и др., 2005; Kang и др., 2001; Sangro и др., 2004; Triozi и др., 2005). 25 Генотерапия, описанная в данной заявке, обеспечивает многообещающее терапевтическое воздействие.

[00021] В одном варианте реализации, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения опухоли у млекопитающего, включающий следующие этапы:

- (a) введение в микроокружение опухоли популяции иммунных клеток или TSC, 30 которые сконструированы *in vitro* таким образом, что они при определенных условиях экспрессируют один или более белков, обладающих функцией иммуномодулятора; и (b) введение указанному млекопитающему терапевтически эффективного количества активирующего лиганда;

вызывая тем самым экспрессию белка, обладающего функцией иммуномодулятора, 35 и лечение указанной опухоли.

[00022] В другом варианте реализации, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения опухоли у млекопитающего, включающий следующие этапы:

- (a) введение в микроокружение опухоли двух или более популяций иммунных клеток или TSC, которые сконструированы *in vitro* таким образом, что они при определенных 40 условиях экспрессируют один или более белков, обладающих функцией иммуномодулятора, при этом каждая популяция иммунных клеток или TSC экспрессирует различный набор одного или нескольких иммуномодуляторов; и (b) введение указанному млекопитающему терапевтически эффективного количества одного или нескольких активирующих лигандов;

45 вызывая тем самым экспрессию белков, обладающих функциями иммуномодуляторов, и лечение указанной опухоли.

[00023] В другом варианте реализации, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения опухоли у млекопитающего, включающий следующие этапы:

(а) введение в микроокружение опухоли популяции иммунных клеток или TSC, которые сконструированы *in vitro* таким образом, что они при определенных условиях экспрессируют один или более белков, обладающих функцией иммуномодулятора, и белок, обладающий функцией IL-12, при этом по меньшей мере один из белков,

5 обладающих функцией иммуномодулятора или IL-12, находится под контролем функционирующего при определенных условиях промотора, который активируется лигандом; и

(б) введение указанному млекопитающему терапевтически эффективного количества активирующего лиганда;

10 вызывая тем самым экспрессию белка, обладающего функцией иммуномодулятора, и/или белка, обладающего функцией IL-12, и лечение указанной опухоли.

[00024] В другом варианте реализации, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения опухоли у млекопитающего, включающий следующие этапы:

(а) введение в микроокружение опухоли двух или более популяций иммунных клеток

15 или TSC, которые сконструированы *in vitro* таким образом, что они при определенных условиях экспрессируют один или более белков, обладающих функцией иммуномодулятора, и белок, обладающий функцией IL-12, при этом каждая популяция иммунных клеток или TSC экспрессирует различный набор одного или нескольких белков, обладающих функцией иммуномодулятора, при этом по меньшей мере один

20 из белков, обладающих функцией иммуномодулятора или IL-12, находится под контролем функционирующего при определенных условиях промотора, который активируется лигандом; и

(б) введение указанному млекопитающему терапевтически эффективного количества одного или нескольких активирующих лигандов;

25 вызывая тем самым экспрессию белка, обладающего функциями иммуномодуляторов, и/или белка, обладающего функцией IL-12, и лечение указанной опухоли.

[00025] В другом варианте реализации, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения заболевания или расстройства у млекопитающего, включающий следующие этапы:

30 (а) введение указанному млекопитающему популяции модифицированных клеток, которые модифицированы таким образом, что они при определенных условиях экспрессируют один или более белков, обладающих функцией иммуномодулятора; и

(б) введение указанному млекопитающему терапевтически эффективного количества активирующего лиганда;

35 вызывая тем самым экспрессию белка, обладающего функцией иммуномодулятора, и лечение указанного заболевания или расстройства.

[00026] В другом варианте реализации, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения заболевания или расстройства у млекопитающего, включающий следующие этапы:

40 (а) введение указанному млекопитающему двух или более популяций модифицированных клеток, которые модифицированы таким образом, что они при определенных условиях экспрессируют один или более белков, обладающих функцией иммуномодулятора, при этом каждая популяция модифицированных клеток экспрессирует различный набор одного или нескольких иммуномодуляторов; и

45 (б) введение указанному млекопитающему терапевтически эффективного количества одного или нескольких активирующих лигандов;

вызывая тем самым экспрессию белков, обладающих функциями иммуномодуляторов, и лечение указанного заболевания или расстройства.

[00027] В другом варианте реализации, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения заболевания или расстройства у млекопитающего, включающий следующие этапы:

(а) введение указанному млекопитающему популяции модифицированных клеток,

5 которые модифицированы таким образом, что они при определенных условиях экспрессируют один или более белков, обладающих функцией иммуномодулятора, и белок, обладающий функцией IL-12, при этом по меньшей мере один из белков, обладающих функцией иммуномодулятора или IL-12, находится под контролем функционирующего при определенных условиях промотора, который активируется 10 лигандом; и

(б) введение указанному млекопитающему терапевтически эффективного количества активирующего лиганда;

вызывая тем самым экспрессию белка, обладающего функцией иммуномодулятора, и/или белка, обладающего функцией IL-12, и лечение указанного заболевания или 15 расстройства.

[00028] В другом варианте реализации, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения заболевания или расстройства у млекопитающего, включающий следующие этапы:

(а) введение указанному млекопитающему двух или более популяций

20 модифицированных клеток, которые модифицированы таким образом, что они при определенных условиях экспрессируют один или более белков, обладающих функцией иммуномодулятора, и белок, обладающий функцией IL-12, при этом каждая популяция модифицированных клеток экспрессирует различный набор одного или нескольких белков, обладающих функцией иммуномодулятора, при этом по меньшей мере один 25 из белков, обладающих функцией иммуномодулятора или IL-12, находится под контролем функционирующего при определенных условиях промотора, который активируется лигандом; и

(б) введение указанному млекопитающему терапевтически эффективного количества одного или нескольких активирующих лигандов;

30 вызывая тем самым экспрессию белка, обладающего функциями иммуномодуляторов, и/или белка, обладающего функцией IL-12, и лечение указанного заболевания или расстройства.

[00029] Настоящее изобретение также обеспечивает способ определения эффективности терапии, основанной на сконструированной клетке, например, иммунной 35 клетке или TSC, путем измерения уровня экспрессии или активности IFN-гамма у пациента перед началом терапии, таким образом получая контрольный уровень, затем введения клеток, сконструированных таким образом, что они экспрессируют один или более белков, обладающих функцией иммуномодулятора, и возможно белок, обладающий функцией IL-12, введения эффективного количества активирующего 40 лиганда, а затем измерения уровня экспрессии IFN-гамма, чтобы получить тестовый уровень, и сравнения контрольного уровня с тестовым уровнем, чтобы определить, является ли схема лечения эффективной.

[00030] В одном варианте реализации, настоящее изобретение обеспечивает способ определения эффективности для пациента схемы лечения, основанной на 45 сконструированной *in vitro* клетке, например, иммунной клетке или TSC, включающей:

(а) измерение уровня экспрессии, или уровня активности, или обоих уровней для интерферона-гамма (IFN-гамма) в первом биологическом образце, полученном из указанного пациента, нуждающегося в лечении, перед введением сконструированных

in vitro клеток, таким образом получая контрольный уровень;

(b) введение пациенту, нуждающемуся в этом, сконструированных in vitro клеток, полученных таким образом, что они при определенных условиях экспрессируют один или более белков, обладающих функцией иммуномодулятора, и возможно белок, обладающий функцией IL-12;

5 (c) введение указанному пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества активирующего лиганда;

(d) измерение уровня экспрессии, или уровня активности, или обоих уровней IFN-гамма во втором биологическом образце, полученном от указанного пациента,

10 нуждающегося в лечении, после введения сконструированных in vitro иммунных клеток и активирующего лиганда, таким образом получая тестовый уровень; и

(e) сравнение контрольного уровня с тестовым уровнем IFN-гамма, при этом повышение тестового уровня экспрессии, активности или обоих уровней IFN-гамма относительно контрольного уровня указывает на то, что указанная схема лечения

15 эффективна для указанного нуждающегося в лечении пациента.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

[00031] На Фиг.1 показана карта плазмида для системы экспрессии с регулируемого промотора для бицистронного транскрипта, кодирующего hIL-12.

20 [00032] На Фиг.2 показана карта плазмида для системы экспрессии с регулируемого промотора для бицистронного транскрипта, кодирующего hIL-21 и hIL-15.

[00033] На Фиг.3 показана карта плазмида для системы экспрессии с регулируемого промотора для бицистронного транскрипта, кодирующего mIL-12.

[00034] На Фиг.4 показана карта плазмида для системы экспрессии с регулируемого промотора для бицистронного транскрипта, кодирующего mIL-21 и mIL-15.

25 [00035] На Фиг.5 показана карта плазмида для системы экспрессии с регулируемого промотора hIL-21.

[00036] На Фиг.6 показана карта плазмида для системы экспрессии с регулируемого промотора mIL-21.

30 [00037] На Фиг.7 показана карта плазмида для системы экспрессии с регулируемого промотора трицистронного транскрипта, кодирующего hIL-12 и hIL-21.

[00038] На Фиг.8 показана карта плазмида для системы экспрессии с регулируемого промотора трицистронного транскрипта, кодирующего mIL-12 и mIL-21.

35 [00039] На Фиг.9 показана структура вектора rAd.RheoIL12, в котором участки E1 и E3 были удалены и участок E1 был заменен на компоненты терапевтической системы RheoSwitch® Therapeutic System (RTS)-IL-12. Прямоугольник с надписью "IL12" представляет собой последовательности, кодирующие IL-12p40 и IL-12p35, разделенные участком внутренней посадки рибосомы (IRES).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Иммуномодуляторы

40 Цитокины

[00040] Полинуклеотидные последовательности интерлейкина 1 (IL-1), который представляет собой цитокин, важный для воспалительного ответа на инфекцию,

доступны в открытых базах данных под номерами доступа: M28983 (IL-1 α человека); M15330 (IL-1 β человека); AF201830 (IL-1 δ человека); AF201831 (IL-1 ϵ человека); AF201832

45 (IL-1 ζ человека); AF201833 (IL-1 η человека); NM_010554 (IL-1 α мыши); NM_008361 (IL-1 β мыши); NM_019451 (IL-1 δ мыши); NM_019450 (IL-1f6 мыши); NM_027163 (IL-1f8 мыши); NM_53511 (IL-1f9 мыши); NM_204524 (IL-1 β цыпленка); NM_017019 (IL-1 α крысы) и NM_031512 (IL-1 β крысы), перечисленные последовательности включены в

настоящее описание посредством ссылки.

[00041] Последовательности аминокислот интерлейкина 1 (IL-1) доступны в открытых базах данных под номерами доступа AAA59134 (IL-1 α человека); AAA59135 (IL-1 β человека);AAF25210 (IL-1 δ человека);AAF25211 (IL-1 ϵ человека);AAF25212 (IL-1 ζ человека);AAF25213 (IL-1 η человека);NP_034684 (IL-1 α мыши);NP_032387 (IL-1 β мыши);NP_062324 (IL-1 δ мыши);NP_062323 (IL-1f6 мыши);NP_081439 (IL-1f8 мыши);NP_705731 (IL-1f9 мыши);NP_989855 (IL-1 β цыпленка);NP_058715 (IL-1 α крысы) и

NP_113700 (IL-1 β крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки. Laurent и др., Psychiatr. Genet. 7: 103 (1997) обнаружили полиморфные мутации в гене интерлейкина-1-бета человека.

[00042] Полинуклеотидные последовательности интерлейкина 2 (IL-2), который принадлежит к семейству цитокинов, включающему IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 и IL-21, доступны в открытых базах данных под номерами доступа U25676 (человека); NM_008366 (мыши); NM_204153 (цыпленка) и NM_053836 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00043] Последовательности аминокислот интерлейкина 2 (IL-2) доступны в открытых базах данных под номерами доступа AAA70092 (человека); NP_032392 (мыши); NP_989484 (цыпленка) и NP_446288 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00044] Liu и др., Appl. Biochem. Biotechnol. 133: 77 (2006) сконструировали мутантный IL-2 человека, а Lorberboum и др., J. Biol. Chem. 265: 16311 (1990) описали конструирование химерного IL-2.

[00045] Полинуклеотидные последовательности интерлейкина 4 (IL-4), который представляет собой цитокин, который вызывает дифференцировку наивных хелперных Т-клеток в клетки Th2, доступны в открытых базах данных под номерами доступа M23442 (человека); NM_021283 (мыши); NM_001007079 (цыпленка) и NM_201270 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00046] Последовательности аминокислот интерлейкина 4 (IL-4) доступны в открытых базах данных под номерами доступа AAA59150 (человека); NP_067258 (мыши); NP_001007080 (цыпленка) и NP_958427 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00047] Kawashima и др., J. Med. Genet. 35: 502 (1998) описывают полиморфизмы в гене IL-4, которые связаны с атопическим дерматитом.

[00048] Интерлейкин 7 (IL-7) представляет собой цитокин, важный для развития В- и Т-клеток. Полинуклеотидные последовательности IL-7 доступны в открытых базах данных под номерами доступа J04156 (человека); NM_008371 (мыши); NM_001037833 (цыпленка) и NM_013110 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00049] Последовательности аминокислот интерлейкина 7 (IL-7) доступны в открытых базах данных под номерами доступа AAA59156 (человека); NP_032397 (мыши); NP_001032922 (цыпленка) и NP_037242 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00050] Feng и др., Genetics 175:545 (2007) обнаружил точечные мутации в IL-7, которые приводят к функциональному дефекту IL-7.

[00051] Интерлейкин 9 (IL-9) представляет собой цитокин, продуцируемый Т-клетками, и является регулятором гематopoэтических клеток. Полинуклеотидные последовательности IL-9 доступны в открытых базах данных под номерами доступа

NM_000590 (человека); NM_008373 (мыши); NM_001037825 (цыпленка) и NM_001105747 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00052] Последовательности аминокислот интерлейкина 9 (IL-9) доступны в открытых

5 базах данных под номерами доступа NP_000581 (человека); NP_032399 (мыши); NP_001032914 (цыпленка) и NP_001099217 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00053] IL-12 представляет собой цитокин, который может действовать как фактор роста для активированных Т- и NK-клеток, повышать лимитическую активность NK/

10 лимфокин- активированных клеток-киллеров и стимулировать продукцию IFN-гамма покоящимися мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC).

Полинуклеотидные последовательности IL-12 доступны в открытых базах данных под номерами доступа NM_000882 (IL12A человека); NM_002187 (IL12B человека);

NM_008351 (IL12a мыши); NM_008352 (IL12b мыши); NM_213588 (IL12A цыпленка);

15 NM_213571 (IL12B цыпленка); NM_053390 (IL12a крысы) и NM_022611 (IL12b крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00054] Последовательности аминокислот интерлейкина 12 (IL-12) доступны в открытых базах данных под номерами доступа NP_000873 (IL12A человека); NP_002178

20 (IL12B человека); NP_032377 (IL12a мыши); NP_032378 (IL12b мыши); NP_998753 (IL12A цыпленка); NP_998736 (IL12B цыпленка); NP_445842 (IL12a крысы) и NP_072133 (IL12b крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00055] Интерлейкин 15 (IL-15) представляет собой цитокин, который регулирует

25 активацию и пролиферацию Т-клеток и клеток естественных киллеров.

Полинуклеотидные последовательности IL-15 доступны в открытых базах данных под номерами доступа U14407 (человека); NM_008357 (мыши); EU334509 (цыпленка) и AF015719 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

30 [00056] Последовательности аминокислот интерлейкина 15 (IL-15) доступны в открытых базах данных под номерами доступа AAA21551 (человека); NP_032383 (мыши); ABY55312 (цыпленка) и AAB94536 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00057] Интерлейкин 18 (IL-18), цитокин, продуцируемый макрофагом, который

35 вместе с интерлейкином 12 вызывает клеточно-опосредованный иммунитет после инфекции микробными продуктами. Полинуклеотидные последовательности IL-18 доступны в открытых базах данных под номерами доступа U90434 (человека); NM_008360 (мыши); EU747333 (цыпленка) и AY258448 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

40 [00058] Последовательности аминокислот интерлейкина 18 (IL-18) доступны в открытых базах данных под номерами доступа AAB50010 (человека); NP_032386 (мыши); ACE79188 (цыпленка) и AAP14669 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00059] Полинуклеотидные последовательности интерлейкина 21 (IL-21), который

45 представляет собой цитокин, который оказывает сильное регуляторное действие на клетки иммунной системы, включая клетки - естественные киллеры и цитотоксические Т-клетки, путем индукции пролиферации клеток, доступны в открытых базах данных под номерами доступа AF254069 (человека); NM_021782 (мыши); NM_001024835

(цыпленка) и NM_001108943 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00060] Последовательности аминокислот интерлейкина 21 (IL-21) доступны в открытых базах данных под номерами доступа, AAG29348 (человека); NP_068554

5 (мыши); NP_001020006 (цыпленка) и NP_001102413 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00061] Интерлейкин 27 (IL-27) представляет собой цитокин, который играет важную роль в регуляции активности В- и Т-лимфоцитов. Полинуклеотидные последовательности IL-27 доступны в открытых базах данных под номерами доступа AY099296 (человека);

10 NM_145636 (мыши) и XM_344962 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00062] Последовательности аминокислот интерлейкина 27 (IL-27) доступны в открытых базах данных под номерами доступа AAM34498 (человека); NP_663611 (мыши) и XP_344963 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00063] Полинуклеотидные последовательности интерферона бета-1 (IFNB1), который представляет собой член группы белков-интерферонов, которые связываются с определенными рецепторами на поверхности клетки (IFNAR) и стимулируют как

20 макрофаги, так и клетки - естественные киллеры (NK), чтобы вызвать противовирусный ответ, доступны в открытых базах данных под номерами доступа NM_002176 (человека); NM_010510 (мыши); NM_00102483 6 (цыпленка) и NM_019127 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00064] Последовательности аминокислот интерферона бета 1 (IFNB1) доступны в открытых базах данных под номерами доступа NP_002167 (человека); NP_034640

25 (мыши); NP_001020007 (цыпленка) и NP_062000 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00065] Интерферон гамма (IFN-гамма) представляет собой растворимый цитокин, который представляет собой единственный интерферон II типа и проявляет противовирусную, иммунорегуляторную и противоопухолевую активность.

30 Полинуклеотидные последовательности IFN-гамма доступны в открытых базах данных под номерами доступа NM_000619 (человека); NM_008337 (мыши) и NM_138880 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00066] Последовательности аминокислот интерферона гамма (IFN-гамма) доступны

35 в открытых базах данных под номерами доступа NP_000610 (человека); NP_032363 (мыши) и NP_620235 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00067] Полинуклеотидные последовательности фактора некроза опухоли (TNF-альфа), который представляет собой многофункциональный провоспалительный

40 цитокин, секретируемый преимущественно моноцитами/макрофагами, который влияет на метаболизм липидов, коагуляцию, устойчивость к инсулину и эндотелиальную функцию, доступны в открытых базах данных под номерами доступа X02910 (человека); NM_013693 (мыши) и BC107671 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

45 [00068] Последовательности аминокислот TNF-альфа доступны в открытых базах данных под номерами доступа CAA26669 (человека); NP_038721 (мыши) и AAI07672 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

Хемокины

[00069] Хемокиновый (С-мотив) лиганд 1 (XCL1, также известный как лимфотактин) является хемотаксическим для CD4+ и CD8+ Т-клеток, но не для моноцитов, и индуцирует повышение количества внутриклеточного кальция в лимфоцитах периферической крови.

5 Полинуклеотидные последовательности XCL1 доступны в открытых базах данных под номерами доступа NM_002995 (человека); NM_008510 (мыши) и NM_134361 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00070] Последовательности аминокислот XCL1 доступны в открытых базах данных

10 под номерами доступа NP_002986 (человека); NP_032536 (мыши) и NP_599188 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки. В патенте США номер 6,022,534 описан лимфотактин и его применение для привлечения цитотоксических Т-клеток и/или NK-клеток, и/или для индукции пролиферации резидентных клеток. В указанном патенте также описаны способы

15 получения и применения антитела против лимфотактина и слитого белка XCL1.

[00071] Полинуклеотидные последовательности СС хемокинового лиганда 3 (CCL3), также известного как воспалительный белок макрофагов-1 (MIP-1), который также называют монокином (тип цитокина, продуцируемого главным образом моноцитами и макрофагами), который участвует в состоянии острого воспаления в привлечении и 20 активации полиморфоядерных лейкоцитов, доступны в открытых базах данных под номерами доступа NM_002983 (человека); NM_011337 (мыши) и NM_013025 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00072] Последовательности аминокислот CCL3 доступны в открытых базах данных

25 под номерами доступа NP_002974 (человека); NP_035467 (мыши) и NP_037157 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00073] Полинуклеотидные последовательности CCL5 (RANTES), который 30 представляет собой провоспалительный цитокин, участвующий в воспалении и развитии астмы, доступны в открытых базах данных под номерами доступа AF043341 (человека); NM_013653 (мыши) и NM_031116 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00074] Последовательности аминокислот CCL5 доступны в открытых базах данных под номерами доступа AAC03541 (человека); NP_038681 (мыши) и NP_112378 (крысы), 35 перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00075] Полинуклеотидные последовательности СС хемокинового лиганда 7 (CCL7), который представляет собой хемокин, вовлеченный в привлечение макрофагов во время воспаления и инвазии рака, доступны в открытых базах данных под номерами 40 доступа NM_006273 (человека); NM_013654 (мыши) и NM_001007612 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00076] Последовательности аминокислот CCL7 доступны в открытых базах данных под номерами доступа NP_006264 (человека); NP_038682 (мыши) и NP_001007613 45 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00077] Хемокиновый (СХС-мотив) лиганд 9 (CXCL9, также известный как MIG) представляет собой Т-клеточный хемоаттрактант, индуцируемый интерфероном-гамма.

Полинуклеотидные последовательности CXCL9 доступны в открытых базах данных под номерами доступа NM_002416 (человека); NM_0108599 (мыши) и NM_145672 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

5 [00078] Последовательности аминокислот CXCL9 доступны в открытых базах данных под номерами доступа NP_002407 (человека); NP_032625 (мыши) и NP_663705 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

10 [00079] Хемокиновый (С-Х-С-мотив) лиганд 10 (CXCL10) представляет собой малый цитокин, участвующий в хемоаттракции клеток иммунной системы, адгезии Т-клеток к эндотелиальным клеткам, противоопухолевой активности и ангиогенезе.

15 Полинуклеотидные последовательности CXCL10 доступны в открытых базах данных под номерами доступа X02530 (человека); NM_021274 (мыши) и BC058444 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

20 [00080] Последовательности аминокислот хемокинового (С-Х-С-мотив) лиганда 10 (CXCL10) доступны в открытых базах данных под номерами доступа САА26370 (человека); NP_067249 (мыши) и ААН58444 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

25 [00081] Хемокиновый (С-Х-С-мотив) лиганд 12 (CXCL12), также известный как фактор 1, выделенный из стромальных клеток (SDF-1), представляет собой малый цитокин, который принадлежит к семейству интеркринов, члены которого активируют лейкоциты и часто индуцируются провоспалительными стимулами, такими как LPS, TNF или IL1. Подинуклеотидные последовательности CXCL12 доступны в открытых базах данных под номерами доступа NM_000609 (человека); NM_001012477 (мыши); NM_204510 (цыпленка) и NM_001033883 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

30 [00082] Последовательности аминокислот CXCL12 доступны в открытых базах данных под номерами доступа NP_000600 (человека); NP_001012495 (мыши); NP_989841 (цыпленка) и NP_001029055 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

35 [00083] Hansson и др., *Microbes and Infection* 5:841 (2006) обсуждают, что взаимодействие между хемокиновым (С-С-мотив) рецептором 7 (CCR7) и хемокиновым (С-С-мотив) лигандом 19 (CCL19, также известным как МИР-3β) важно для выработки первичных иммунных ответов. Полинуклеотидные последовательности CCR7 доступны в открытых базах данных под номерами доступа NM_001838 (человека) и NM_007719 (мыши), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

40 [00084] Последовательности аминокислот CCR7 доступны в открытых базах данных под номерами доступа NP_001829 (человека) и NP_031745 (мыши), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

45 [00085] Полинуклеотидные последовательности CCL19 доступны в открытых базах данных под номерами доступа NM_006274 (человека) и NM_011888 (мыши), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00086] Последовательности аминокислот CCL19 доступны в открытых базах данных под номерами доступа NP_006265 (человека) и NP_036018 (мыши), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00087] Полинуклеотидные последовательности СС хемокинового лиганда 21 (CCL21), точно установленного лиганда для CCR7, который необходим для достижения определенного состояния равновесия CD4+, но не CD8+, Т-клетками, при этом нарушения экспрессии CCL21 могут изменять склонность к аутоиммунным реакциям, 5 доступны в открытых базах данных под номерами доступа AB002409 (человека); NM_011335 (CCL21a мыши); NM_011124 (CCL21b мыши) и NM_023052 (CCL21c мыши); перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00088] Последовательности аминокислот CCL21 доступны в открытых базах данных 10 под номерами доступа BAA21817 (человека); NP_035465 (CCL21a мыши); NP_035254 (CCL21b мыши) и NP_075539 (CCL21c мыши), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00089] Интерлейкин-8 (IL-8), хемокин, также называемый нейтрофил-активирующим пептидом-1 или SCYB8, представляет собой получаемый из ткани пептид, секретируемый 15 некоторыми типами клеток в ответ на воспалительные стимулы. В патентах США с номерами 6,133,426 и 6,177,980 описаны аминокислотные и Полинуклеотидные последовательности гуманизированных антител против IL-8. Полинуклеотидная последовательность IL-8 человека доступна в открытой базе данных под номером доступа NM_000584, указанная последовательность включена в настоящее описание 20 посредством ссылки.

[00090] Последовательность аминокислот IL-8 человека доступна в открытой базе данных под номером доступа NP_000575, указанная последовательность включена в настоящее описание посредством ссылки.

Факторы роста

[00091] Колониестимулирующий фактор гранулоцитов/макрофагов (GM-CSF) 25 представляет собой цитокин, который действует как фактор роста белых кровяных клеток, стимулирует стволовые клетки для получения из них гранулоцитов (нейтрофилов, эозинофилов и базофилов) и моноцитов. Полинуклеотидные последовательности GM-CSF доступны в открытых базах данных под номерами доступа M11734 (человека); 30 NM_009969 (мыши); EU520303 (цыпленка); NM_001037660 (Csf2ra крысы) и NM_133555 (Csf2rb крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00092] Последовательности, аминокислот колониестимулирующего фактора гранулоцитов/макрофагов (GM-CSF) доступны в открытых базах данных под номерами 35 доступа AAA52122 (человека); NP_034099 (мыши); ACB11534 (цыпленка); NP_001032749 (Csf2ra крысы) и NP_598239 (Csf2rb), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00093] Полинуклеотидные последовательности лиганда FMS-подобного рецептора с тирозинкиназной активностью (FLT3/FLK2 лиганда, Flt3L), который может действовать 40 как рецептор фактора роста на гематопоэтических стволовых клетках или клетках-предшественниках, или обоих, доступны в открытых базах данных под номерами доступа U04806 (человека) и NM_013520 (мыши), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00094] Последовательности аминокислот FLT3/FLK2 лиганда (Flt3L) доступны в 45 открытых базах данных под номерами доступа AAA17999 (человека) и NP_038548 (мыши), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00095] Полинуклеотидная последовательность трансформирующего фактора роста

альфа (TGF-альфа), экспрессия которого повышена при некоторых раках человека, который может обратимо придавать трансформированный фенотип культивируемым клеткам, доступна в открытых базах данных под номером доступа NM_001099691 (человека); NM_031199 (мыши); NM_001001614 (цыпленка) и NM_012671 (крысы),

5 перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00096] Последовательности аминокислот TGF-альфа доступны в открытых базах данных под номером доступа NP_001093161 (человека); NP_112476 (мыши); NP_001001614 (цыпленка) и NP_036803 (крысы), перечисленные последовательности

10 включены в настоящее описание посредством ссылки.

Адьюванты

[00097] Бета-дефензины представляют собой противомикробные пептиды, участвующие во врожденном иммунном ответе против многих грамотрицательных и грамположительных бактерий, грибков и вирусов. Полинуклеотидные

15 последовательности бета-дефензинов доступны в открытых базах данных под номерами доступа X92744 (hBD-1 человека); AJ000152 (hBD-2 человека); AF217245 (бета-дефензин-3 человека); AJ314835 (бета-дефензин-4 человека); AB089180 (hBD-5 человека); AY122466 (бета-дефензин-106 человека, DEFB106); AF540979 (бета-дефензин-107 человека, DEFB107); AF529416 (бета-дефензин-108 человека, DEFB108); DQ012014 (бета-дефензин-20 110 человека, DEFB110); DQ012015 (бета-дефензин-111 человека, DEFB111); DQ012016 (бета-дефензин-112 человека, DEFB112); DQ012017 (бета-дефензин-113 человека, DEFB113); DQ012018 (бета-дефензин-114 человека, DEFB114); DQ012019 (бета-дефензин-115 человека, DEFB115); DQ012020 (бета-дефензин-116 человека, DEFB116); DQ012021 (бета-дефензин-117 человека, DEFB117); NM_007843 (бета-дефензин-1 мыши); NM_010030 (бета-дефензин-2 мыши, Defb2); NM_013756 (бета-дефензин-3 мыши, Defb3); NM_019728 (бета-дефензин-4 мыши, Defb4); NM_030734 (бета-дефензин-5 мыши, Defb5); NM_054074 (бета-дефензин-6 мыши, Defb6); NM_139220 (бета-дефензин-7 мыши); NM_153108 (бета-дефензин-8 мыши, Defb8); NM_139219 (бета-дефензин-9 мыши, Defb9) и NM_139225 (бета-дефензин-10 мыши, Defb10); перечисленные последовательности включены в

30 настоящее описание посредством ссылки.

[00098] Последовательности аминокислот бета-дефензинов доступны в открытых базах данных под номерами доступа CAA63405 (hBD-1 человека); CAB65126 (hBD-2 человека); AAF73853 (бета-дефензин-3 человека); CAC85520 (бета-дефензин-4 человека); BAC10630 (hBD-5 человека); AAM93908 (бета-дефензин-106 человека, DEFB106);

35 AAN33115 (бета-дефензин-107 человека, DEFB107); AAQ09525 (бета-дефензин человека, DEFB108); AAY59750 (бета-дефензин-110 человека, DEFB110); AAY59751 (бета-дефензин-111 человека, DEFB111); AAY59752 (бета-дефензин-112 человека, DEFB112); AAY59753 (бета-дефензин-113 человека, DEFB113); AAY59754 (бета-дефензин-114 человека, DEFB114); AAY59755 (бета-дефензин-115 человека, DEFB115); AAY59756 (бета-дефензин-116 человека, DEFB116); AAY59757 (бета-дефензин-117 человека, DEFB117); NP_031869 (бета-дефензин-1 мыши); NP_034160 (бета-дефензин-2 мыши, Defb2); NP_038784 (бета-дефензин-3 мыши, Defb3); NP_062702 (бета-дефензин-4 мыши, Defb4); NP_109659 (бета-дефензин-5 мыши, Defb5); NP_473415 (бета-дефензин-6 мыши, Defb6); NP_631966 (бета-дефензин-7 мыши, Defb7); NP_694748 (бета-дефензин-8 мыши, Defb8); NP_631965 (бета-дефензин-9 мыши, Defb9) и NP_631971 (бета-дефензин-10 мыши, Defb10), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки. См. также патент США номер 5,242,902 для получения дополнительных последовательностей пептидов дефензинов человека и крысы.

[00099] Белки высокомобильной группы-1 (HMGB1) представляют собой негистонные хромосомные белки, которые действуют как цитокины, опосредуя местный и системный ответы на некротическую гибель клеток и рак, инвазию патогенов, травму и сепсис. Полинуклеотидные последовательности белков HMGB1 доступны в открытых базах 5 данных под номерами доступа NM_002128 (человека); NM_010439 (мыши); NM_204902 (цыпленка) и NM_012963 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[000100] Последовательности аминокислот белков высокомобильной группы-1 (HMGB1) доступны в открытых базах данных под номерами доступа NP_002119 (человека); NP_034569 (мыши); NP_990233 (цыпленка) и NP_037095 (крысы), 10 перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[000101] Фагоцитарные белки S100 опосредуют воспалительные ответы и привлекают воспалительные клетки в места повреждения ткани, и представляют собой члены 15 семейства молекул молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением (DAMP), которые важны для врожденного иммунитета. См. Foell и др., J. Leucocyte Biol. 81:1 (2006). Полинуклеотидные последовательности белков S100 доступны в открытых базах данных под номерами доступа BC014392 (S100 A1 человека); BC002829 (S100 A2 человека); BC012893 (S100 A3 человека); BC016300 (S100 A4 человека); Z18954 (S100D 20 человека); BC001431 (S100 A6 человека); BC034687 (S100 A7 человека); BC005928 (S100 A8 человека); BC047681 (S100 A9 человека); BC015973 (S100 A10 человека); D38583 (клагизарин (clagizzarin) человека); NM_011309 (S100a1 мыши); NM_009115 (S100b мыши); NM_013650 (S100a8 мыши); NM_009114 (S100a9 мыши); NM_011310 (S100a3 мыши); NM_011311 (S100a4 мыши) и NM_011312 (S100a5 мыши), перечисленные 25 последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[000102] Последовательности аминокислот белков S100 доступны в открытых базах данных под номерами доступа AAH14392 (S100 A1 человека); AAH02829 (S100 A2 человека); AAH12893 (S100 A3 человека); AAH16300 (S100 A4 человека); CAA79479 (S100D человека); AAH01431 (S100 A6 человека); AAH34687 (S100 A7 человека); 30 AAH05928 (S100 A8 человека); AAH47681 (S100 A9 человека); AAH15973 (S100 A10 человека); BAA07597 (клагизарин человека); NP_035439 (S100a1 мыши); NP_033141 (S100b мыши); NP_038678 (S100a8 мыши); NP_033140 (S100a9 мыши); NP_035440 (S100a3 мыши); NP_035441 (S100a4 мыши) и NP_035442 (S100a5 мыши), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[000103] Маннан, полисахарид растений, который представляет собой полимер сахара маннозы, используют для выработки иммунного ответа. В патенте США номер 5,807,559 описаны иммуногенные конъюгаты маннана, которые могут быть пригодны для выработки Т-клеточного иммунитета против связанных с опухолью углеводных структур или против углеводных структур, экспрессированных на инфекционных 40 агентах и/или инфицированных клетках-хозяевах. В патенте США номер 5,773,425 описано применение маннана для снятия симптомов и/или излечения от вирусных заболеваний, и для усиления иммунного ответа.

[000104] Бациллу Кальметта-Герена (BCG), живые ослабленные виды микобактерий, применяют в качестве вакцины для предупреждения тяжелого и смертельного 45 туберкулеза. В патенте США номер 7,393,541 описано получение адьювантной вакцины для индукции *in vivo* опосредованного Т-клетками иммунного ответа на микобактерию у млекопитающего субъекта. См. также Hubbard и Collins, Infect. Immun. 59 (2): 570. В патенте США номер 5,292,513 описан способ примирования макрофагов *in vivo* у

пациентов, нуждающихся в усилении бактерицидной и противовирусной активности, с помощью термоинактивированной BCG. Последовательность полного генома BCG доступна в открытых базах данных под номером доступа NC_008769 (M. bovis BCG str. Pasteur 1173P2, complete genome).

- 5 [000105] Бактериальные липополисахариды (LPS) представляют собой эндотоксины, которые вызывают сильный иммунный ответ при инфицировании грамотрицательными бактериями. В патенте США номер 4,148,877 описано фракционирование LPS из бактериальной культуры и применение фракции в качестве лекарственного средства для индукции устойчивости к бактериальной инфекции. В патенте США номер 5,292,513 10 описан способ примиривания макрофагов *in vivo* у пациентов, нуждающихся в усилении бактерицидной и противовирусной активности, с помощью LPS.

Костимулирующие молекулы (положительный эффект)

- 15 [000106] Лиганд OX40 (OX40L) принадлежит к членам 4 суперсемейства лигандов фактора некроза опухоли (Tnfsf4), экспрессируется на дендритных клетках и вызывает дифференцировку Th2-клеток. Полинуклеотидные последовательности лиганда OX40 доступны в открытых базах данных под номерами доступа X79929 (человека); U12763 (мыши) и AF037067 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

- 20 [000107] Последовательности аминокислот лиганда OX40 (OX40L) доступны в открытых базах данных под номерами доступа CAA56284 (человека); AAA21871 (мыши) и AAC67236 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

- 25 [000108] Лиганд 4-1BB (4-1BBL) принадлежит к членам 9 суперсемейства лигандов фактора некроза опухоли (Tnfsf9), он представляет собой трансмембранный гликопротеин 2 типа и экспрессируется на активированных Т лимфоцитах. Полинуклеотидные последовательности 4-1BBL доступны в открытых базах данных под номерами доступа NM_003811 (человека); NM_009404 (мыши) и AY332409 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

- 30 [000100] Последовательности аминокислот лиганда 4-1BB (4-1BBL) доступны в открытых базах данных под номерами доступа NP_003802 (человека); NP_033430 (мыши) и AAQ01228 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

- 35 [000101] Белок CD40 принадлежит к членам 5 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли, и является ключевым в опосредовании большого разнообразия иммунных и воспалительных реакций, включая зависимое от Т-клеток переключение классов иммуноглобулинов, развитие В-клеток памяти и образование зародышевого центра. Полинуклеотидные последовательности белков CD40 доступны в открытых базах данных под номерами доступа X60592 (человека); NM_170701 (мыши); NM_204665 (цыпленка) и NM_134360 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

- 40 [000102] Последовательности аминокислот белков CD40 доступны в открытых базах данных под номерами доступа CAA43045 (человека); NP_733802 (мыши); P_989996 (цыпленка) и NP_599187 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

- 45 [000103] Белок, родственный семейству индуцируемых глюкокортикоидами рецепторов фактора некроза опухоли, (GITR) может вызывать эффективный иммунитет к развитию опухоли посредством стимуляции Т-клеток. Введение моноклонального

антитела против GITR (mAb) может вызвать сильный противоопухолевый иммунитет и уничтожить развивающиеся опухоли, не вызывая явных аутоиммунных заболеваний. См. Ко и др., J. Exp. Med. 7: 885 (2005). В патенте США номер 6,503,184 B1 описано антитело против GITR.

5 [000104] Полинуклеотидные последовательности лиганда GITR (GITRL) доступны в открытых базах данных под номерами доступа AY358868 (человека) и AY359852 (мыши), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

10 [000105] Последовательности аминокислот лиганда GITR (GITRL) доступны в открытых базах данных под номерами доступа AAQ89227 (человека) и AAQ55265 (мыши), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

15 [000106] Лиганд (HSVgD), связывающий медиатор входа в клетку вируса герпеса (HVEM), также называемый p30, или LIGHT, представляет собой член семейства фактора некроза опухоли (TNF), вовлеченный в костимуляцию Т-клеток. Для LIGHT есть два рецептора, медиатор входа в клетку вируса герпеса (HVEM) и receptor лимфотоксина-β (LT-RR). Являясь лигандом для HVEM, HSVgD активирует Т-клетки, действуя как костимулирующий фактор на Т-клетки, что приводит к пролиферации Т-клеток и секреции цитокинов. См. патент США 7,118,742 для получения полинуклеотидных и 20 аминокислотных последовательностей LIGHT. В патенте США 5,654,174 описан вариант белка gD с делецией карбоксиконцевых остатков.

25 [000107] CD70 представляет собой цитокин, который связывается с CD27. Он играет роль в активации Т-клеток, индуцирует пролиферацию костимулированных Т-клеток и повышает образование цитолитических Т-клеток. Полинуклеотидные последовательности CD70 доступны в открытых базах данных под номерами доступа NM_001252 (человека); NM_011617 (мыши) и NM_001106878 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

30 [000108] Последовательности аминокислот CD70 доступны в открытых базах данных под номерами доступа NP_001243 (человека); NP_035747 (мыши) и NP_001100348 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

35 [000109] ICOS-L представляет собой лиганд для рецептора клеточной поверхности ICOS, специфичного для Т-клеток, и действует как костимулирующий сигнал для пролиферации Т-клеток и секреции цитокинов. ICOS-L также индуцирует пролиферацию В-клеток и их дифференцировку в плазматические клетки. ICOS-L может играть важную роль в опосредовании местных тканевых ответов на воспалительные состояния, а также в модулировании вторичного иммунного ответа путем костимуляции функции Т-клеток памяти. Полинуклеотидные последовательности ICOS-L доступны в открытых базах данных под номерами доступа NM_015259 (человека) и NM_015790 (мыши), 40 перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

45 [000110] Последовательности аминокислот ICOS-L доступны в открытых базах данных под номерами доступа NP_056074 (человека) и NP_056605 (мыши), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[000111] Белок PD-L1 (также известный как CD274) экспрессируется в активированных моноцитах, Т- и В-клетках. Экспрессия PD-L1 в моноцитах повышается при обработке IFN-гамма, а в дендритных клетках и кератиноцитах - при обработке IFN-гамма вместе

с другими активаторами. Полинуклеотидные последовательности белков PD-L1 доступны в открытых базах данных под номерами доступа NM_014143 (человека) и NM_021893 (мыши), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

5 [000112] Последовательности аминокислот белков PD-L1 доступны в открытых базах данных под номерами доступа NP_054862 (человека) и NP_068693 (мыши), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

Костимулирующие молекулы (отрицательный эффект)

10 [000113] Белок 4, связанный с цитотоксическими Т лимфоцитами, (CTLA4) представляет собой член суперсемейства иммуноглобулинов и является костимулирующей молекулой, экспрессируемой в активированных Т-клетках. В патентах США 7,034,121 и 6,984,720 описаны способы получения и применения антител против CTLA4. В патенте США 6,984,720 также описаны последовательности аминокислот

15 тяжелой и легкой цепи антитела против CTLA4.

[000114] Молекулы PD-1 представляют собой члены суперсемейства генов иммуноглобулинов, которые связывают лиганд PD-1 (PD-L1). Связывание PD-L1 с рецептором PD-1 на Т-клетках приводит к передаче костимулирующего сигнала в клетке, который предотвращает прохождение клетки по клеточному циклу и повышает 20 пролиферацию Т-клеток. Ингибирирование взаимодействия между PD-L1 и рецептором на Т-клетке с помощью антитела против PD-L1 приводит к снижению иммунного ответа, названного анергией иммунной клетки. В патенте США 7,029,674 описаны способы получения и последовательность антитела против PD-L1.

[000115] PD-L2 в первую очередь известен как лиганд для PD-1 (или гомолог человека - PDCD1). Тем не менее, описывали, что PD-12 участвует в передаче костимулирующего сигнала, необходимого для пролиферации Т-лимфоцитов и продукции IFN-гамма, независимо от PDCD1. Взаимодействие с PDCD1 ингибирирует пролиферацию Т-клеток путем блокирования продвижения по клеточному циклу и продукции цитокинов. У Yamazaki и др., J. of Immunol. 169: 5538 (2002) и Ansari и др., J. Exp. Med. 198: 63 (2003) 30 описано получение моноклональных антител против PD-L2.

Молекулы, направленные против иммунных супрессоров (ингибиторы толерантности)

[000116] Трансформирующий фактор роста-бета (TGF- β) представляет собой многофункциональный белок, который регулирует пролиферацию и дифференцировку клеток путем взаимодействия с одним из двух трансмембранных рецепторов с серин/35 треонинкиназной активностью I типа и II типа. См. Chen и др., Science 28: 1335 (1993). Рецептор TGF II типа (TGFR2) фосфорилирует и активирует рецепторы I типа, которые аутофосфорилируются, затем связывают и активируют регуляторы транскрипции SMAD. У Lynch MA и др., Cancer Res. 58: 4227 (1998) описаны мутации в гене рецептора трансформирующего фактора роста- β II типа (TGFR2), которые связаны с карциномами 40 яичника человека. У Brand и др., J. Biol. Chem. 265: 11500-11503 (1993) описано, что делеция предсказанного серин/ треонинкиназного цитоплазматического домена (нуклеотиды 1172-2036 кДНК TGF β R2 H2-3FF, доступна в открытых базах данных под номером доступа M85079, и последовательность аминокислот, доступная под номером доступа AAA61164) нарушает экспрессию, зависимую от всех трех генов TGF- β (1, 2 и 45 3). TGF- β продуцируется в большинстве опухолей человека и ингибирирует клеточный иммунитет, направленный на опухолевые антигены. У Foster и др., J. Immunother. 31:500 (2008) описано, что экспрессия доминантно отрицательного TGF β R2 в цитотоксических Т-лимфоцитах может приводить к устойчивости к ингибиторному действию TGF- β .

[000117] TGF- β , действуя синергично с TGF α , вызывает трансформацию клеток. Он также действует как негативный аутокринный фактор роста. Нарушенная регуляция активации и передачи сигнала TGF β может привести к апоптозу. У Ziyadeh и др., Proc. Natl. Acad. Sci. 97: 8015 (2000) описано, что введение антитела против TGF- β может

5 предотвратить почечную недостаточность и гломерулосклероз у мышей db/db, модели диабета II типа, у которых развивается явная нефропатия. Способы получения и применения моноклональных антител против TGF β описаны в патенте США номер 6,419,928. У Barcellos-Hoff и др., Am J. Pathol. 147:5 (1995) также описан способ получения антитела против TGF β . Последовательности аминокислот и нуклеотидов конструкций 10 слитого белка TGF β описаны в патенте США номер 6,756,215.

[000118] IL-10 представляет собой цитокин, продуцируемый активированными Th2-клетками, В-клетками, кератиноцитами, моноцитами и макрофагами. IL-10 ингибирует синтез множества цитокинов, включая IFN-гамма, IL-2, IL-3, TNF и GM-CSF, продуцируемых активированными макрофагами и хелперными Т-клетками. IL-10 15 используют, чтобы вызвать рост и дифференцировку активированных В-клеток человека, ингибирование Th1-ответов для предотвращения отторжения трансплантата и опосредованных Т-клетками аутоиммунных заболеваний. У O'Farrell и др., EMBO J. 17: 1006 (1998); Kanbayashi и др., Cell Immunol. 171: 153 (1996); Fukushima и др., Br. J. Ophthalmol. 90: 1535 (2006) и van Lent и др., Ann. Rheum. Dis. 66: 334 (2007) описано 20 получение антител против IL-10. В патенте США номер 7,326,567 описана полинуклеотидная последовательность антитела против IL-10. В патенте США номер 5,837,232 описан способ лечения опосредованного В-клетками аутоиммунного расстройства антителами против IL-10.

[000119] Семейство белков-супрессоров передачи сигнала цитокинов (SOCS) образует 25 часть классической системы с отрицательной обратной связью, которая регулирует передачу сигнала цитокинов. У Alexander и др. Cell 98: 597 (1999) описано, что супрессор передачи сигнала цитокинов 1 (SOCS1) представляет собой основной ингибитор передачи сигнала от интерферона-гамма и предотвращает потенциально смертельное действие 30 данного цитокина у новорожденных. У Hilton и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 114 (1999), обсуждается, что SOCS1 участвует в негативной регуляции цитокинов, которые передают сигнал через путь JAK/STAT3. У Ohya и др. J. Biol. Chem. 272: 27178 (1997) описано, что белки SOCS, похоже, представляют собой основные регуляторы передачи сигнала от интерлейкина 6 (IL-6) и фактора, ингибирующего лейкоз (LIF). В патенте 35 США номер 6,534,277 описан способ получения и применения антитела против SOCS1, в котором последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую антитело против SOCS1, вводили в клетки таким образом, что указанное антитело экспрессировалось клетками или их потомством, и рекомбинантные клетки затем вводили *in vivo* для получения терапевтического эффекта. В патентах США с номерами 6,323,317 и 7,049,418 также описаны антитела против SOCS1.

40 [000120] TGF- α представляет собой митогенный полипептид, который способен связываться с рецептором EGF и действовать синергично с TGF- β , чтобы вызвать независимую от наличия подложки пролиферацию клеток в мягком агаре. У Ellis и др., N. Engl. J. Med. 317: 158 (1987), описано, что TGF- α играет роль в некоторых 45 паранеопластических проявлениях меланомы. В патенте США номер 4,742,003 и у Xian и др., The J. of Histochem. & Cytochem. 47: 949 (1999) описаны способы получения антител против TGF- α .

[000121] Как рецептор фактора некроза опухоли (TNFR1), так и Fas содержат цитоплазматический Fas-ассоциированный белок с доменом смерти (FADD), который

необходим для индуцируемой Fas и TNF передачи сигнала программируированной гибели клетки (апоптоза) и олигомеризации рецептора. Был обнаружен белок млекопитающего, обозначенный FADD, обладающий способностью связывать цитоплазматический участок или домен рецептора Fas и ингибиривать опосредованный FAS апоптоз.

- 5 Полинуклеотидная последовательность FADD доступна в открытой базе данных под номером доступа U24231, а последовательность аминокислот доступна под номером доступа AAA86517, обе последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки. FADD-фрагмент или нуклеиновая кислота, кодирующая его, который представляет собой доминантно отрицательный ингибитор функционально 10 интактного нативного FADD, описаны в патенте США номер 6,562,797 B1.

ОПИСАНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[000122] SEQ ID NO:1 представляет собой полинуклеотидную последовательность конструкции, кодирующей mIL-12 и m-IL21.

- 15 [000123] SEQ ID NO:2 представляет собой полинуклеотидную последовательность конструкции, кодирующей hIL-12 и hIL-21.

[000124] SEQ ID NO:3 представляет собой полинуклеотидную последовательность конструкции, кодирующей mIL-21 и mIL-15.

- 20 [000125] SEQ ID NO:4 представляет собой полинуклеотидную последовательность конструкции, кодирующей mIL-12.

[000126] SEQ ID NO:5 представляет собой полинуклеотидную последовательность конструкции, кодирующей hIL-21 и hIL-15.

- 25 [000127] SEQ ID NO:6 представляет собой полинуклеотидную последовательность конструкции, кодирующей hIL-21.

- [000128] SEQ ID NO:7 представляет собой полинуклеотидную последовательность конструкции, кодирующей mIL-21.

[000129] SEQ ID NO:8 представляет собой полинуклеотидную последовательность конструкции, кодирующей hIL-21.

- 30 [000130] SEQ ID NO:9 представляет собой полинуклеотидную последовательность, кодирующую mIL-21.

[000131] SEQ ID NO:10 представляет собой последовательность аминокислот mIL-21.

[000132] SEQ ID NO:11 представляет собой полинуклеотидную последовательность, кодирующую mIL-15.

- 35 [000133] SEQ ID NO:12 представляет собой последовательность аминокислот mIL-15.

[000134] SEQ ID NO:13 представляет собой полинуклеотидную последовательность, кодирующую mp40 mIL-12.

- 40 [000135] SEQ ID NO:14 представляет собой последовательность аминокислот mp40 mIL-12.

[000136] SEQ ID NO:15 представляет собой полинуклеотидную последовательность, кодирующую mp35 mIL-12.

- 45 [000137] SEQ ID NO:16 представляет собой последовательность аминокислот mp35 mIL-12.

[000138] SEQ ID NO:17 представляет собой полинуклеотидную последовательность, кодирующую hIL-21.

[000139] SEQ ID NO:18 представляет собой последовательность аминокислот hIL-21.

[000140] SEQ ID NO:19 представляет собой полинуклеотидную последовательность, кодирующую hIL-15.

[000141] SEQ ID NO:20 представляет собой последовательность аминокислот hIL-15.

[000142] SEQ ID NO:21 представляет собой полинуклеотидную последовательность, кодирующую p40 hIL-12.

[000143] SEQ ID NO:22 представляет собой последовательность аминокислот p40

5 hIL-12.

[000144] SEQ ID NO:23 представляет собой полинуклеотидную последовательность, кодирующую p35 hIL-12.

[000145] SEQ ID NO:24 представляет собой последовательность аминокислот p35 hIL-12.

10 [000146] SEQ ID NO:25 представляет собой последовательность нуклеиновых кислот чувствительного к экдизону элемента, обнаруженного у *Drosophila*.

[000147] SEQ ID NO:26 представляет собой последовательность нуклеиновых кислот чувствительного к экдизону элемента, обнаруженного у *Drosophila melanogaster*.

15 [000148] SEQ ID NO:27 представляет собой последовательность нуклеиновых кислот чувствительного к экдизону элемента, обнаруженного у *Drosophila melanogaster*.

[000149] SEQ ID NO:28 представляет собой сайт рестрикции для фермента хоуминг-эндонуклеазы (HE) I-SceI.

20 [000150] SEQ ID NO:29 представляет собой последовательность ДНК аденоовирусного вектора, включающего последовательность, кодирующую IL-12 человека: Ad-RTS-hIL-12 (SP1-RheoIL-12).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ.

25 [000151] Если не указано иначе, предполагается, что все термины данной области, обозначения и другие научные термины или терминология, используемая в данной заявке, имеют значения, которые обычно понимают специалисты в области, к которой относится настоящее изобретение. В некоторых случаях, определения терминов с общепринятыми значениями приведены в данной заявке для ясности и/или для быстрой справки и понимания, и включение таких определений в настоящее описание не обязательно истолковываться как наличие существенного отличия значения

30 термина от обычно подразумеваемого в данной области. Общепринятые определения молекулярно-биологических терминов и/или способов, и/или протоколов можно найти в Rieger и др., *Glossary of Genetics: Classical and Molecular*, 5-ое издание. Springer-Verlag: Нью-Йорк, 1991; Lewin, *Genes V*, Oxford University Press: Нью-Йорк, 1994; Sambrook и др., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3-е изд. 2001) и Ausubel и др., *Current Protocols in Molecular Biology* (1994). В случае необходимости, процедуры, включающие применение доступных для приобретения наборов и/или реагентов, как правило, осуществляют в соответствии с рекомендациями и/или протоколами, и/или параметрами изготовителя, если не указано иначе.

35 [000152] Термин "изолированный" для целей настоящего изобретения обозначает биологический материал (клетку, нуклеиновую кислоту или белок), который был удален из его естественного окружения (окружения, в котором он находится в природе). Например, полинуклеотид, присутствующий в естественном состоянии в растении или животном, не является изолированным, тем не менее, тот же самый полинуклеотид, отделенный от соседних нуклеиновых кислот, рядом с которыми он находится в природе, считают "изолированным".

40 [000153] Термин "очищенный", применительно к биологическим материалам, не требует присутствия материала в форме, имеющей абсолютную чистоту, исключающей присутствие других соединений. Это, скорее, относительное определение.

[000154] Термины "нуклеиновая кислота", "молекула нуклеиновой кислоты", "олигонуклеотид", "нуклеотид" и "полинуклеотид" используют взаимозаменямо, и они относятся к полимерной форме соединенных фосфоэфирными связями рибонуклеозидов (аденозина, гуанозина, уридина или цитидина; "молекул РНК") или

- 5 дезоксирибонуклеозидов (дезоксиаденозина, дезоксигуанозина, дезокситимидина или дезоксицитидина; "молекул ДНК"), или любых их фосфоэфирных аналогов, таких как фосфоротиоаты и тиоэфиры, либо в одноцепочечной форме, либо в форме двухцепочечной спирали. Возможно образование двухцепочечных ДНК-ДНК, ДНК-РНК и РНК-РНК спиралей. Термин молекула нуклеиновой кислоты, и, в частности,
- 10 молекула ДНК или РНК, относится только к первичной и вторичной структуре указанной молекулы, и не ограничен какими-либо конкретными третичными формами. Таким образом, данный термин включает двухцепочечную ДНК, обнаруженную, среди прочего, в виде линейных или кольцевых молекул ДНК (например, рестрикционных фрагментов), плазмид, сверхспиральной ДНК и хромосом. При обсуждении структуры
- 15 конкретных двухцепочечных молекул ДНК, последовательности могут быть описаны в данной заявке согласно стандартной договоренности о написании последовательности только в направлении от 5' к 3' вдоль нетранскрибуемой нити ДНК (т.е., цепи, содержащей последовательность, гомологичную мРНК). "Рекомбинантная молекула ДНК" представляет собой молекулу ДНК, над которой совершили молекулярно-
- 20 биологические манипуляции. ДНК включает кДНК, геномную ДНК, плазмидную ДНК, синтетическую ДНК и полусинтетическую ДНК, но не ограничена ими.

[000155] Термин "фрагмент", применительно к полинуклеотидным последовательностям, относится к последовательности нуклеотидов, имеющей меньшую длину, чем у исходной нуклеиновой кислоты, и включающей, на протяжении общей 25 части, последовательность нуклеотидов, идентичную исходной нуклеиновой кислоте. Такой фрагмент нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению может, когда это уместно, быть включен в больший полинуклеотид, частью которого он является. Такие фрагменты включают или в качестве альтернативы состоят из олигонуклеотидов в диапазоне длин от по меньшей мере 6, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 39, 30 40, 42, 45, 48, 50, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 70, 75, 78, 80, 90, 100, 105, 120, 135, 150, 200, 300, 500, 720, 900, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000 или более последовательных нуклеотидов нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению.

[000156] В данной заявке формулировка "изолированный фрагмент нуклеиновой кислоты" относится к полимеру РНК или ДНК, который представляет собой одно- или 35 двухцепочечную молекулу, необязательно содержащую синтетические, неприродные или измененные нуклеотидные основания. Изолированный фрагмент нуклеиновой кислоты в виде полимера ДНК может состоять из одного или нескольких фрагментов кДНК, геномной ДНК или синтетической ДНК.

[000157] Термин "ген" относится к полинуклеотиду, содержащему нуклеотиды, 40 которые кодируют функциональную молекулу, включая функциональные молекулы, полученные только с помощью транскрипции (например, биологически активные виды РНК) или с помощью транскрипции и трансляции (например, полипептид). В объем термина "ген" входят нуклеиновые кислоты кДНК и геномной ДНК. "Ген" также относится к фрагментам нуклеиновой кислоты, которые экспрессируют определенную 45 РНК, белок или полипептид, включая регуляторные последовательности, предшествующие (5'-некодирующие последовательности) и следующие (3'-некодирующие последовательности) за кодирующими последовательностью. Термин "нативный ген" относится к гену в том виде, в котором он находится в природе, с его собственными

регуляторными последовательностями. "Химерный ген" относится к любому гену, который не является нативным геном, включающему регуляторные и/или кодирующие последовательности, которые не находятся вместе в природе. Соответственно, химерный ген может включать регуляторные последовательности и кодирующие

5 последовательности, которые получены из различных источников, или регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, полученные из одного источника, но расположенные по-другому относительно их расположения в природе. Химерный ген может включать кодирующие последовательности, полученные, из различных источников, и/или регуляторные последовательности, полученные из

10 различных источников. "Эндогенный ген" относится к нативному гену в его природном расположении в геноме организма. Термин "чужеродный" ген или "гетерологичный" ген относится к гену, который обычно не обнаруживается в организме хозяина, но который вводят в организм хозяина путем переноса генов. Чужеродные гены могут включать нативные гены, вставленные в неродной организм, или химерные гены.

15 "Трансген" представляет собой ген, который ввели в геном с помощью процедуры трансформации. Например, ген интерлейкина-12 (IL-12) кодирует белок IL-12. IL-12 представляет собой гетеродимер 35-кДа субъединицы (p35) и 40-кДа субъединицы (p40), связанных дисульфидной связью с получением функционального IL-12p70. Ген IL-12 кодирует как субъединицу p35, так и субъединицу p40.

20 [000158] "Гетерологичная ДНК" относится к ДНК, не присутствующей в природе в клетке или в хромосомном сайте клетки. Гетерологичная ДНК может содержать ген, чужеродный для данной клетки.

[000159] Термин "геном" включает хромосомную, а также митохондриальную, хлоропластную и вирусную ДНК или РНК.

25 [000160] Молекула нуклеиновой кислоты "способна к гибридизации" с другой молекулой нуклеиновой кислоты, такой как кДНК, геномная ДНК или РНК, если одноцепочечная форма молекулы нуклеиновой кислоты может отжигаться на другую молекулу нуклеиновой кислоты при подходящих условиях температуры и ионной силы раствора. Условия гибридизации и промывки хорошо известны и проиллюстрированы 30 у Sambrook и др. в Molecular Cloning: A Laboratory Manual, второе издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989), особенно глава 11 и таблица 11.1 в ней). Условия температуры и ионной силы определяют "жесткости" гибридизации.

[000161] Условия жесткости можно изменять для обнаружения от относительно похожих фрагментов, таких как гомологичные последовательности из состоящих в дальнем родстве организмов, до очень похожих фрагментов, таких как гены, которые повторяют функциональные ферменты из близкородственных организмов. Для предварительного скрининга гомологичных нуклеиновых кислот, можно применять условия низкой жесткости гибридизации, соответствующие T_m , равной 55°, например, в 5X SSC, 0.1% ДСН, 0.25% молоке и без формамида; или в 30% формамида, 5X SSC, 40% ДСН. Условия умеренной жесткости гибридизации соответствуют более высокой T_m , например, в 40% формамида, с 5X или 6X SSC. Условия высокой жесткости гибридизации соответствуют наиболее высокой T_m , например, в 50% формамида, 5X или 6X SSC.

45 [000162] Для гибридизации требуется, чтобы две нуклеиновые кислоты содержали комплементарные последовательности, хотя, в зависимости от жесткости гибридизации, возможны несовпадения между основаниями. Термин "комплементарный" применяют для описания взаимоотношения между нуклеотидными основаниями, которые способны

гибридизоваться друг с другом. Например, применительно к ДНК, аденоzin комплементарен тимину и цитозин комплементарен гуанину. Соответственно, настоящее изобретение также включает изолированные фрагменты нуклеиновых кислот, которые комплементарны целым последовательностям, как описано или используется в данной

5 заявке, а также по существу сходным последовательностям нуклеиновых кислот.

[000163] В одном варианте реализации настоящего изобретения, полинуклеотиды обнаруживаются путем применения условий гибридизации, включающих этап гибридизации при T_m , равной 55°C, и применения условий, указанных выше. В других вариантах реализации, T_m равна 60°C, 63°C или 65°C.

10 [000164] Последегибридизационные промывки также определяют условия жесткости. В одном наборе условий используют серию промывок, начиная с 6X SSC, 0.5% ДСН при комнатной температуре в течение 15 минут (мин), затем повторяют промывки в 2X-SSC, 0.5% ДСН при 45°C в течение 30 мин, а затем повторяют дважды промывки в 0.2X SSC, 0.5% ДСН при 50°C в течение 30 мин. Предпочтительный набор строгих

15 условий включает более высокие температуры, при которых промывки идентичны описанным выше, за исключением того, что температуру двух окончательных 30-мин промывок в 0.2X SSC, 0.5% ДСН повышают до 60°C. Другой предпочтительный набор очень жестких условий включает две окончательные промывки в 0.1X SSC, 0.1% ДСН

20 при 65°C.

[000165] Подходящая жесткость для гибридизации нуклеиновых кислот зависит от длины и степени комплементарности нуклеиновых кислот, переменных, хорошо известных в данной области. Чем большая степень подобия или гомологии между двумя последовательностями нуклеотидов, тем большее значение T_m для гибридов нуклеиновых

25 кислот, имеющих данные последовательности. Относительная стабильность (соответствующая более высокой T_m) гибридизации нуклеиновых кислот убывает в следующем порядке: РНК:РНК, ДНК:РНК, ДНК:ДНК. Для гибридов больше 100 нуклеотидов в длину были получены уравнения для вычисления T_m (см. Sambrook и др., выше, 9.50-0.51). Для гибридизации с более короткими нуклеиновыми кислотами, т.е.,

30 олигонуклеотидами, положение несовпадений становится более значимым, и длина олигонуклеотида определяет специфичность (см. Sambrook и др., выше, 11.7-11.8).

[000166] В одном варианте реализации настоящего изобретения, полинуклеотиды обнаруживаются путем использования условий гибридизации, включающих этап гибридизации в менее чем 500 мМ соли по меньшей мере при 37°C и этап промывки в 35 2X SSPE при температуре, равной по меньшей мере 63°C. В другом варианте реализации настоящего изобретения, условия гибридизации включают менее чем 200 мМ соль и по меньшей мере 37°C на этапе гибридизации. В дополнительном варианте реализации, условия гибридизации включают 2X SSPE и 63°C на обоих этапах гибридизации и промывки.

40 [000167] В другом варианте реализации настоящего изобретения, длина гибридизующейся нуклеиновой кислоты составляет по меньшей мере приблизительно 10 нуклеотидов. Предпочтительно, минимальная длина гибридизующейся нуклеиновой кислоты составляет по меньшей мере приблизительно 15 нуклеотидов; например, по меньшей мере приблизительно 20 нуклеотидов; например, по меньшей мере 30 нуклеотидов. Более того, для квалифицированного специалиста очевидно, что 45 температуру и концентрацию соли в растворе для промывки при необходимости можно изменять в соответствии с такими факторами, как длина зонда.

[000168] Термин "зонд" относится к одноцепочечной молекуле нуклеиновой кислоты,

которая может спариваться с комплементарной одноцепочечной целевой нуклеиновой кислотой с получением двухцепочечной молекулы.

[000169] В данной заявке, термин "олигонуклеотид" относится к короткой нуклеиновой кислоте, которая гибридизуется с молекулой геномной ДНК, молекулой кДНК, молекулой плазмидной ДНК или молекулой мРНК. Олигонуклеотиды могут быть меченными, например, ^{32}P -нуклеотидами или нуклеотидами, с которыми ковалентно конъюгировали метку, такую как биотин. Меченный олигонуклеотид можно применять в качестве зонда для обнаружения присутствия нуклеиновой кислоты.

Олигонуклеотиды (один или оба из которых могут содержать метки) можно применять в качестве праймеров для ПЦР, либо для клонирования полноразмерной нуклеиновой кислоты или ее фрагмента, для секвенирования ДНК или для обнаружения присутствия нуклеиновой кислоты. Олигонуклеотид также можно применять для получения тройной спирали с молекулой ДНК. Как правило, Олигонуклеотиды получают синтетическим путем, предпочтительно на синтезаторе нуклеиновых кислот. Соответственно, Олигонуклеотиды можно получить с не встречающимися в природе аналогами фосфоэфирных связей, такими как тиоэфирные связи и т.д.

[000170] "Праймер" относится к олигонуклеотиду, который гибридизуется с целевой последовательностью нуклеиновых кислот с получением двухцепочечного участка нуклеиновой кислоты, который может служить сайтом инициации синтеза ДНК при подходящих условиях. Такие праймеры можно применять в полимеразной цепной реакции или для секвенирования ДНК.

[000171] "Полимеразная цепная реакция" сокращенно называется ПЦР и относится к способу ферментативной амплификации *in vitro* определенных последовательностей нуклеиновых кислот. ПЦР включает серию повторных температурных циклов, в которой 25 каждый цикл включает три стадии: денатурацию матричной нуклеиновой кислоты для разделения цепей целевой молекулы, отжиг одноцепочечного олигонуклеотидного праймера для ПЦР на матричную нуклеиновую кислоту и удлинение гибридизовавшегося праймера(ов) с помощью ДНК-полимеразы. ПЦР обеспечивает средства для обнаружения присутствия целевой молекулы и, при количественных или 30 полуколичественных условиях, для определения относительного количества данной целевой молекулы в исходном пуле нуклеиновых кислот.

[000172] "Полимеразная цепная реакция с этапом обратной транскрипции" сокращенно называется ОТ-ПЦР и относится к способам ферментативного получения 35 *in vitro* целевой молекулы или молекул кДНК из молекулы или молекул РНК, а затем ферментативной амплификации конкретной последовательности или последовательностей нуклеиновых кислот из целевой молекулы или молекул кДНК, описанных выше. ОТ-ПЦР также обеспечивает средства обнаружения присутствия целевой молекулы и, при количественных или полуколичественных условиях, определения относительного количества данной целевой молекулы в исходном пуле 40 нуклеиновых кислот.

[000173] "Кодирующая последовательность", ДНК относится к двухцепочечной последовательности ДНК, которая кодирует полипептид и может транскрибироваться и транслироваться в полипептид в клетке *in vitro* или *in vivo*, когда она помещена под 45 контроль подходящих регуляторных последовательностей. Формулировка "подходящие регуляторные последовательности" относится к последовательностям нуклеотидов, расположенным перед кодирующей последовательностью (5'-некодирующие последовательности), внутри нее или за ней (3'-некодирующие последовательности), которые влияют на транскрипцию, процесинг или стабильность РНК или трансляцию

соответствующей кодирующей последовательности. Регуляторные последовательности могут включать промоторы, трансляционные лидерные последовательности, интроны, последовательности сигналов полиаденилирования, сайты процессинга РНК, сайты связывания эффектора и структуры стебель-петля. Границы кодирующей

- 5 последовательности определяют по инициирующему кодону на 5'(амино)-конце и трансляционному стоп-кодону на 3'(карбоксильном)-конце. Кодирующая последовательность может содержать прокариотические последовательности, кДНК, полученную из мРНК, геномные последовательности ДНК и даже синтетические последовательности ДНК, но не ограничена ими. Если предполагается, что экспрессия 10 кодирующей последовательности будет осуществляться в эукариотической клетке, сигнал полиаденилирования и последовательность терминации транскрипции будет, как правило, располагаться с 3'-конца кодирующей последовательности.

- [000174] "Открытая рамка считывания", сокращенно называемая ОРС, относится к участку последовательности нукleinовых кислот, любой из ДНК, кДНК или РНК, 15 который содержит сигнал инициации трансляции или инициирующий кодон, такой как ATG или AUG, и термирующий кодон и потенциально может транслироваться в полипептидную последовательность.

- [000175] Термин "голова к голове" используется в данной заявке для описания ориентации двух полинуклеотидных последовательностей по отношению друг к другу. 20 Два полинуклеотида расположены в ориентации голова к голове, когда 5'-конец кодирующей нити одного полинуклеотида расположен рядом с 5'-концом кодирующей нити другого полинуклеотида, в результате чего направление транскрипции каждого полинуклеотида продолжается в противоположную сторону от 5'-конца другого полинуклеотида. Термин "голова к голове" можно сокращенно называть (5') к (5') и 25 можно также обозначать символами ($\leftarrow \rightarrow$) или (3' \leftarrow 5' 5' \rightarrow 3').

- [000176] Термин "хвост к хвосту" используется в данной заявке для описания ориентации двух полинуклеотидных последовательностей по отношению друг к другу. 30 Два полинуклеотида расположены в ориентации хвост к хвосту, когда 3'-конец кодирующей нити одного полинуклеотида расположен рядом с 3'-концом кодирующей нити другого полинуклеотида, в результате чего направление транскрипции каждого полинуклеотида продолжается по направлению к другому полинуклеотиду. Термин "хвост к хвосту" можно сокращенно называть (3') к (3') и можно также обозначать символами ($\rightarrow \leftarrow$) или (5' \rightarrow 3' 3' \leftarrow 5').

- [000177] Термин "голова к хвосту" используется в данной заявке для описания 35 ориентации двух полинуклеотидных последовательностей по отношению друг к другу. Два полинуклеотида расположены в ориентации голова к хвосту, когда 5'-конец кодирующей нити одного полинуклеотида расположен рядом с 3'-концом кодирующей нити другого полинуклеотида, в результате чего направление транскрипции каждого полинуклеотида продолжается в том же направлении, что и для другого полинуклеотида. 40 Термин "голова к хвосту" можно сокращенно называть (5') к (3') и можно также обозначать символами ($\rightarrow \rightarrow$) или (5' \rightarrow 3' 5' \rightarrow 3').

- [000178] Термин "по ходу транскрипции" относится к последовательности 45 нуклеотидов, которая расположена со стороны 3'-конца исходной последовательности нуклеотидов. В частности, последовательности нуклеотидов, расположенные по ходу транскрипции, как правило, относятся к последовательностям, которые следуют за точкой инициации транскрипции. Например, инициирующий кодон трансляции гена расположен по ходу транскрипции от точки инициации транскрипции.

- [000179] Термин "против хода транскрипции" относится к последовательности

нуклеотидов, которая расположена со стороны 5'-конца исходной последовательности нуклеотидов. В частности, последовательности нуклеотидов, расположенные против хода транскрипции, как правило, относятся к последовательностям, которые расположены на 5'-стороне от кодирующей последовательности или точки инициации транскрипции. Например, большинство промоторов расположено против хода транскрипции от точки инициации транскрипции.

[000180] Термины "эндонуклеаза рестрикции" и "рестрикционный фермент" используют взаимозаменяемо, и они относятся к ферменту, который связывается и расщепляет в сайте внутри конкретной последовательности нуклеотидов в двухцепочечной ДНК.

[000181] Термин "гомологичная рекомбинация" относится к вставке чужеродной последовательности ДНК в другую молекулу ДНК, например, к вставке вектора в хромосому. Предпочтительно, вектор нацелен на конкретный сайт в хромосоме для гомологичной рекомбинации. Для специфичной гомологичной рекомбинации, вектор должен включать достаточно длинные участки, гомологичные последовательностям хромосомы, чтобы позволить комплементарное связывание и включение вектора в хромосому. Более длинные участки гомологии и большие степени подобия последовательностей могут повысить эффективность гомологичной рекомбинации.

[000182] Для увеличения количества полинуклеотида согласно настоящему

изобретению можно применять несколько способов, известных в данной области. Как только будут созданы подходящая система хозяина и условия роста, количество рекомбинантных векторов экспрессии можно увеличить и получить их в большом количестве. Как описано в данной заявке, векторы экспрессии, которые можно применять, включают следующие векторы или их производные: вирусы человека или животного, такие как вирус коровьей оспы или аденоовирус; вирусы насекомых, такие как бакуловирус; дрожжевые векторы; бактериофаговые векторы (например, лямбда) и плазмидные и космидные ДНК-векторы, как пример из многих подобных, но не ограничиваются ими.

[000183] Термин "вектор" относится к любому носителю для клонирования и/или переноса нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Вектор может представлять собой репликон, к которому может быть присоединен другой фрагмент ДНК таким образом, чтобы осуществить репликацию присоединенного фрагмента. Термин "репликон" относится к любому генетическому элементу (например, плазмиде, фагу, космиде, хромосоме, вирусу), который действует как автономная единица репликации ДНК *in vivo*, т.е., способен к репликации под своим собственным контролем. Термин "вектор" содержит как вирусные, так и невирусные носители для введения нуклеиновой кислоты в клетку *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. Большое количество векторов, известных в данной области, можно применять для осуществления манипуляций над нуклеиновыми кислотами, введения в гены чувствительных элементов и промоторов и т.д. Возможные векторы включают, например, плазмиды или модифицированные вирусы, включая, например, бактериофаги, такие как производные бактериофага лямбда, или плазмиды, такие как производные плазмид pBR322 или pUC, или вектор Bluescript. Другой пример векторов, которые полезны для настоящего изобретения, представляет собой UltraVector™ Production System (Intrexon Corp., Блэксбург, Вирджиния), описанный в WO 2007/038276. Например, вставку фрагментов ДНК, соответствующих чувствительным элементам и промоторам, в подходящий вектор можно осуществить путем лигирования подходящих фрагментов ДНК в выбранный вектор, в котором есть комплементарные липкие концы. В качестве альтернативы, концы молекул ДНК можно ферментативно

5 модифицировать, или можно получить любой сайт путем лигирования последовательностей нуклеотидов (линкеров) с концами ДНК. Такие векторы можно сконструировать таким образом, чтобы они содержали гены селектируемого маркера, который обеспечивает селекцию клеток, в клеточный геном которых включен указанный маркер. Такие маркеры позволяют идентификацию и/или селекцию клеток-хозяев, которые включили и экспрессируют белки, кодируемые маркером.

[000184] Вирусные векторы, и особенно ретровирусные векторы, использовались для множества различных применений, связанных с доставкой генов в клетки, а также в живых субъектов-животных. Вирусные векторы, которые можно применять, включают, 10 но не ограничены перечисленными, ретровирусные, векторы на базе аденоассоциированного вируса, поксвирусные, бакуловирусные, векторы на базе вируса коровьей оспы, вируса простого герпеса, вируса Эпштейна-Барра, аденоизирусные, геминивирусные и колимовирусные векторы. Невирусные векторы включают плазмины, липосомы, электрически заряженные липиды (цитофектины), комплексы ДНК-белок 15 и биополимеры. В добавок к нуклеиновым кислотам, вектор также может включать один или более регуляторных участков и/или селектируемых маркеров, полезных для селекции, измерения и контролирования результатов переноса нуклеиновой кислоты (в какие ткани был осуществлен перенос, продолжительность экспрессии и т.д.).

[000185] Термин "плазмида" относится к внекромосомному элементу, часто несущему 20 ген, который не является частью основного метаболизма клетки и обычно находится в виде кольцевых молекул двухцепочечной ДНК. Такие элементы могут представлять собой автономно реплицирующиеся последовательности, встраивающиеся в геном последовательности, фаговые или нуклеотидные последовательности, линейную, кольцевую или сверхспиральную одно- или двухцепочечную ДНК или РНК, полученные 25 из любого источника, в которых множество последовательностей нуклеотидов соединено или вновь объединено в уникальную конструкцию, которая способна вводить в клетку фрагмент промотора и последовательность ДНК выбранного продукта гена вместе с подходящей 3'-нетранслируемой последовательностью.

[000186] Термин "клонирующий вектор" относится к "репликону", который 30 представляет собой единичный участок нуклеиновой кислоты, предпочтительно ДНК, который последовательно повторяется и который содержит точку начала репликации, такому как плазмида, фаг или космида, к которому может быть присоединен другой фрагмент нуклеиновой кислоты для осуществления репликации присоединенного фрагмента. Клонирующие векторы могут быть способны к репликации в одном типе 35 клеток и экспрессии в другом ("членочный вектор"). Клонирующие векторы могут содержать одну или более последовательностей, которые можно использовать для селекции клеток, содержащих указанный вектор, и/или один или более сайтов множественного клонирования для вставки интересующих последовательностей.

[000187] Термин "вектор экспрессии" относится к вектору, плазмиде или носителю, 40 разработанному, чтобы позволить экспрессию вставленной последовательности нуклеиновых кислот после трансформирования ею хозяина. Клонированный ген, т.е., вставленную последовательность нуклеиновых кислот, обычно помещают под контроль регуляторных элементов, таких как промотор, минимальный промотор, энхансер или тому подобные. Существует огромное множество регулирующих инициацию участков 45 или промоторов, которые полезны для запуска экспрессии нуклеиновой кислоты в желательной клетке-хозяине, и они известны специалистам в данной области. В векторе экспрессии можно использовать практически любой промотор, который способен запускать экспрессию данных генов, включая вирусные промоторы, бактериальные

промоторы, промоторы животных, промоторы млекопитающих, синтетические промоторы, конститутивные промоторы, тканеспецифичные промоторы, промоторы, связанные с патогенезом или заболеванием, промоторы, специфичные для определенной стадии развития, индуцируемые промоторы, регулируемые светом промоторы; CYC1, 5 HIS3, GAL1, GAL4, GAL10, ADH1, PGK, PH05, GAPDH, ADC1, TRP1, URA3, LEW, ENO, TPI, промоторы щелочной фосфатазы (полезные для экспрессии в *Saccharomyces*); промотор AOX1 (полезный для экспрессии в *Pichia*); р-лактамазный промотор, промоторы lac, ara, tet, trp, λ P_L, λ P_R, T7, tac и trc (полезные для экспрессии в *Escherichia coli*); регулируемые светом, специфичные для семян, специфичные для пыльцы, 10 специфичные для яичника промоторы, промотор 35S вируса мозаики цветной капусты, минимальный 35S CMV, промотор вируса мозаики прожилок листа кассавы (CsVMV), промотор белка, связывающего хлорофилл a/b, рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы, специфичный для ростков, специфичный для корней промотор, хитиназный промотор, индуцируемый стрессом промотор, промотор палочковидного тунгро-вируса риса, 15 суперпромотор растений, промотор картофельной лейцинаминопептидазы, нитратредуктазы, маннопинсинтазы, нопалинсинтазы, убиквитина, белка зеина и антоцианина (полезные для экспрессии в клетках растений); промоторы животных и млекопитающих, известные в данной области, включая ранний промоторный участок SV40 (SV40e), промотор, содержащийся в длинном 3'-концевом повторе (LTR) вируса 20 саркомы Райса (RSV), промоторы E1A или гены основных поздних промоторов (MLP) адено-вирусов (Ad), ранний промотор цитомегаловируса (CMV), тимидинкиназный (TK) промотор вируса простого герпеса (HSV), промотор бакуловируса IE1, промотор фактора элонгации 1-альфа (EF1), промотор фосфоглицераткиназы (PGK), промотор убиквитина (Ubc), промотор альбумина, регуляторные последовательности промотора 25 металлотионеина-L мыши и участки, регулирующие транскрипцию, вездесущие промоторы (HPRT, виментина, α -актина, тубулина и тому подобных), промоторы промежуточных филаментов (десмина, нейрофиламентов, кератина, GFAP и тому подобных), промоторы терапевтических генов (MDR, CFTR или фактора VIII и тому подобных), промоторы, связанные с патогенезом или заболеванием, и промоторы, 30 которые проявляют тканеспецифичность и использовались в трансгенных животных, такие как регуляторная область гена эластазы I, которая активна в ацинарных клетках поджелудочной железы; регуляторная область гена инсулина, активная в бета-клетках поджелудочной железы, регуляторная область гена иммуноглобулина, активная в лимфоидных клетках, регуляторная область вируса опухоли молочной железы мыши, 35 активная в тестикулярных клетках, клетках груди, лимфоидных и тучных клетках; промотор гена альбумина, регуляторные области Apo AI и Apo AII, активные в печени, регуляторная область гена альфа-фетопротеина, активная в печени, регуляторная область гена альфа-1-антитрипсина, активная в печени, регуляторная область гена бета-глобина, активная в миелоидных клетках, регуляторная область гена основного 40 белка миелина, активная в клетках олигодендроцитов в мозге, регуляторная область гена легкой цепи миозина-2, активная в скелетных мышцах, и регуляторная область гена гонадотропин-рилизинг-гормона, активная в гиппокампе, промотор пируваткиназы, промотор виллина, промотор жирной кислоты, связывающей кишечный белок, промотор α -актина клеток гладкой мускулатуры и тому подобные, но не ограничиваются ими. 45 Вдобавок, данные экспрессионные последовательности можно модифицировать путем добавления энхансера или регуляторных последовательностей, и тому подобных.

[000188] Векторы можно вводить в желательные клетки-хозяева с помощью способов, известных в данной области, например, трансфекции, электропорации, микроинъекции,

трансдукции, слияния клеток, декстрана DEAE, преципитации фосфатом кальция, липофекции (слияния лизосом), применения генной пушки или переносчика векторной ДНК (см., например, Wu и др., *J. Biol. Chem.* 267: 963 (1992); Wu и др., *J. Biol. Chem.* 267: 14621 (1988) и Hartmut и др., заявка на патент Канады номер 2,012,311).

- 5 [000189] Полинуклеотид согласно настоящему изобретению также можно ввести *in vivo* с помощью липофекции. В течение последнего десятилетия, возросло применение липосом для инкапсулирования и трансфекции нуклеиновых кислот *in vitro*. Синтетические катионные липиды, разработанные для устранения трудностей и опасений, встречающихся при опосредованной липосомами трансфекции, можно 10 применять для получения липосом для трансфекции *in vivo* гена, кодирующего маркер (Felgner и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413 (1987); Mackey и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 55: 8027 (1988) и Ulmer и др., *Science* 259: 1745 (1993)). Применение катионных липидов может вызывать инкапсулирование отрицательно заряженных нуклеиновых кислот, а также вызывать слияние с отрицательно заряженными клеточными 15 мембранами (Felgner и др., *Science* 337: 387 (1989)). Особенно полезные соединения и композиции липидов для переноса нуклеиновых кислот описаны в WO 95/18863, WO 96/17823 и в патенте США номер 5,459,127. Применение липофекции для введения экзогенных генов в определенные органы *in vivo* имеет некоторые практические преимущества. Молекулярное нацеливание липосом на определенные клетки 20 представляет собой одну полезную область. Очевидно, что направление трансфекции на конкретные типы клеток будет особенно предпочтительным для ткани с клеточной гетерогенностью, такой как поджелудочная железа, печень, почка и головной мозг. Липиды можно химически присоединить к другим молекулам для нацеливания (Mackey и др. 1988, выше). Нацеливающие пептиды, например, гормоны или нейромедиаторы, 25 и белки, такие как антитела, или непептидные молекулы можно химически присоединить к липосомам.

[000190] Для облегчения трансфекции нуклеиновой кислоты *in vivo* также полезны другие молекулы, такие как катионный олигопептид (например, WO 95/21931), пептиды, полученные из белков, связывающих ДНК (например, WO 96/25508), или катионный полимер (например, WO 95/21931).

[000191] Также можно ввести вектор *in vivo* в виде очищенной ДНК-плазиды (см. патенты США с номерами 5,693,622, 5,589,466 и 5,580,859). Также можно использовать подходы рецептор-опосредованной доставки ДНК (Curiel и др., *Hum. Gene Ther.* 3: 147 (1992) и Wu и др., *J. Biol. Chem.* 262: 4429 (1987)).

35 [000192] Термин "трансфекция" относится к поглощению клеткой экзогенной или гетерологичной РНК или ДНК. Говорят, что клетка была "трансфицирована" экзогенной или гетерологичной РНК или ДНК, когда такая РНК или ДНК была введена внутрь клетки. Говорят, что клетка была "трансформирована" экзогенной или гетерологичной РНК или ДНК, когда трансфицированная РНК или ДНК влияет на фенотипические 40 изменения. Трансформирующая РНК или ДНК может быть интегрирована (ковалентно связана) в хромосомную ДНК, составляющую геном клетки.

[000193] "Трансформация" относится к переносу фрагмента нуклеиновой кислоты в геном организма хозяина, что приводит к генетически стабильному наследованию. Организмы хозяев, содержащие трансформированные фрагменты нуклеиновых кислот, 45 называют "трансгенными", или "рекомбинантными", или "трансформированными" организмами.

[000194] Вдобавок, рекомбинантный вектор, включающий полинуклеотид согласно настоящему изобретению, может включать одну или более точек начала репликации

в клетках-хозяевах, в которых необходима их амплификация или экспрессия, маркеры или маркеры селекции.

[000195] Термин "маркер селекции" относится к фактору идентификации, обычно к антибиотику или гену химической устойчивости, по которому можно проводить

5 селекцию на основании эффекта маркерного гена, т.е., устойчивость к антибиотику, устойчивость к гербициду, колориметрический маркер, ферменты, флуоресцентные маркеры и тому подобные, при этом указанный эффект используют для отслеживания наследования интересующей нуклеиновой кислоты и/или для идентификации клетки или организма, который унаследовал интересующую нуклеиновую кислоту. Примеры

10 генов маркеров селекции, известных и используемых в данной области, включают: гены, обеспечивающие устойчивость к ампициллину, стрептомицину, гентамицину, канамицину, гигромицину, гербициду биалафосу, сульфонамиду и тому подобным; и гены, которые используются как фенотипические маркеры, т.е., регуляторные гены антоцианина, ген изопентенил-трансферазы и тому подобные.

15 [000196] Термин "репортерный ген" относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей фактор идентификации, который можно идентифицировать на основании действия репортерного гена, при этом указанное действие используют для отслеживания наследования интересующей нуклеиновой кислоты, для идентификации клетки или организма, который унаследовал интересующую нуклеиновую кислоту, и/или для

20 измерения индукции экспрессии гена или транскрипции. Примеры репортерных генов, известных и используемых в данной области, включают люциферазу (Luc), зеленый флуоресцентный белок (GFP), хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), β -галактозидазу (LacZ), β -глюкуронидазу (Gus) и тому подобные. Гены маркеров селекции также можно считать репортерными генами.

25 [000197] Термины "промотор" и "промоторная последовательность" используют взаимозаменяемо, и они относятся к последовательности ДНК, способной контролировать экспрессию кодирующей последовательности или функциональной РНК. Обычно, кодирующая последовательность расположена с 3'-стороны от промоторной последовательности. Промоторы можно получить целиком из нативного

30 гена, или они могут состоять из различных элементов, полученных из различных промоторов, обнаруженных в природе, или даже включать синтетические фрагменты ДНК. Для специалиста в данной области должно быть очевидно, что различные промоторы могут управлять экспрессией гена в различных типах тканей или клеток, или на различных стадиях развития, или в ответ на различное окружение или

35 физиологические условия. Промоторы, которые вызывают экспрессию гена в большинстве типов клеток, в большинстве случаев называют "конститутивными промоторами". Промоторы, которые вызывают экспрессию гена в определенном типе клеток, обычно называют "клеточноспецифичными промоторами" или "тканеспецифичными промоторами". Промоторы, которые вызывают экспрессию гена

40 на определенной стадии развития или дифференцировки клеток, обычно называют "специфичными для стадии развития промоторами" или "специфичными для дифференцировки клеток промоторами". Промоторы, которые индуцируют и вызывают экспрессию гена после воздействия или обработки клетки некоторым агентом, биологической молекулой, химическим соединением, лигандом, светом или тому

45 подобным, что приводит к индуцированию промотора, обычно называют "индуцируемыми промоторами" или "регулируемыми промоторами". Также должно быть очевидно, что поскольку в большинстве случаев точные границы регуляторных последовательностей полностью не определены, фрагменты ДНК с различными длинами

могут проявлять идентичную промоторную активность.

[000198] В любом векторе согласно настоящему изобретению, указанный вектор возможно содержит промотор, описанный в данной заявке. В одном варианте реализации настоящего изобретения, указанный промотор представляет собой промотор,

5 выбранный из перечисленных в Таблице 1 в данной заявке.

[000199] В любом векторе согласно настоящему изобретению, указанный вектор возможно содержит тканеспецифичный промотор. В одном варианте реализации, указанный тканеспецифичный промотор представляет собой тканеспецифичный промотор, описанный в данной заявке. В другом варианте реализации,

10 тканеспецифичный промотор представляет собой тканеспецифичный промотор, выбранный из перечисленных в Таблице 2 в данной заявке.

[000200] Промоторная последовательность обычно ограничена на 3'-конце сайтом инициации транскрипции и продолжается против хода транскрипции (в 5'-направлении) таким образом, что она содержит минимальное количество оснований или элементов,

15 необходимых для инициации транскрипции на уровнях, детектируемых выше фоновых значений. Внутри промоторной последовательности находится сайт инициации транскрипции (удобно определяемый, например, путем картирования с помощью нуклеазы S1), а также домены связывания белка (консенсусные последовательности), ответственные за связывание РНК-полимеразы.

20 [000201] "Промотор терапевтического переключателя" ("TSP") относится к промотору, который контролирует экспрессию компонента генного переключателя. Генные переключатели и различные их компоненты подробно описаны в других местах настоящего описания. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения, TSP является конститутивным, т.е., непрерывно активным. Конститутивный TSP может

25 быть либо повсеместно конститутивным (т.е., в основном функционирующим без необходимости наличия дополнительных факторов или регуляторов, в любой ткани или клетке) или конститутивным ткане- или клеточноспецифичным (т.е., в основном функционирующим без необходимости наличия дополнительных факторов или регуляторов, в определенном типе ткани или типе клеток). В некоторых вариантах

30 реализации, TSP согласно настоящему изобретению активируется при условиях, связанных с заболеванием, расстройством или патологическим состоянием. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения, когда вовлечено два или более TSP, указанные промоторы могут представлять собой комбинацию конститутивного и активируемого промоторов. В данной заявке термин "промотор, активируемый при

35 условиях, связанных с заболеванием, расстройством или патологическим состоянием", включает, без каких-либо ограничений, специфичные для заболевания промоторы, промоторы, отвечающие на конкретные физиологические условия, стадию развития, дифференцировки или патологические состояния, промоторы, отвечающие на определенные биологические молекулы, и промоторы, специфичные для конкретного

40 типа ткани или клеток, связанных с заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, например, для опухолевой ткани или злокачественных клеток. TSP могут содержать последовательности встречающихся в природе промоторов, модифицированные последовательности, полученные из встречающихся в природе промоторов, или синтетические последовательности (полученные, например, путем

45 вставки чувствительного элемента в последовательность минимального промотора для изменения отвечаемости указанного промотора).

[000202] Кодирующая последовательность находится "под контролем"

контролирующих транскрипцию и трансляцию последовательностей в клетке, когда

РНК-полимераза транскрибирует указанную кодирующую последовательность в мРНК, которая затем подвергается транс-сплайсингу РНК (если кодирующая последовательность содержит интроны) и транслируется в белок, кодируемый кодирующей последовательностью.

5 [000203] "Контролирующие транскрипцию и трансляцию последовательности" относятся к регуляторным последовательностям ДНК, таким как промоторы, энхансеры, терминаторы и тому подобные, которые обеспечивают экспрессию кодирующей последовательности в клетке-хозяине. В эукариотических клетках сигналы полиаденилирования представляют собой контролирующие последовательности.

10 [000204] Термин "чувствительный элемент" относится к одному или нескольким существующим элементам ДНК, которые наделяют промотор способностью к ответу, опосредованному взаимодействием со связывающими ДНК доменами фактора транскрипции. Такой элемент ДНК может быть либо палиндромным (идеально или неидеально) по последовательности, либо может состоять из мотивов или полусайтов 15 последовательности, разделенных различным числом нуклеотидов. Полусайты могут быть сходными или идентичными и могут располагаться либо в виде прямых или инвертированных повторов, либо в виде отдельного полусайта или мультимеров расположенных последовательно примыкающих полусайтов. Чувствительный элемент может включать минимальный промотор, выделенный из организмов, отличных от 20 природы клетки или организма, в который включили чувствительный элемент. Связывающий ДНК домен фактора транскрипции связывается, в присутствии или отсутствии лиганда, с последовательностью ДНК чувствительного элемента, чтобы инициировать или подавить транскрипцию гена(ов), расположенного по ходу транскрипции, находящегося под регуляцией данного чувствительного элемента.

25 Примеры последовательностей ДНК чувствительных элементов природного рецептора экдизона включают: RRGG/TTCANTGAC/ACYY (SEQ ID NO:25) (см. Cherbas и др., Genes Dev. 5: 120 (1991)); AGGTCA_(n)AGGTCA, где N_(n) может представлять собой один или более спайсерных нуклеотидов (SEQ ID NO:26) (см. D'Avino и др., Mol. Cell. Endocrinol. 113:1 (1995)), и GGGTTGAATGAATT (SEQ ID NO:27) (см. Antoniewski и др., Mol. Cell 30 Biol. 74: 4465 (1994)).

[000205] Термин "функционально связанный" относится к такой связи последовательностей нуклеиновых кислот на одном участке нуклеиновой кислоты, что на функцию одной из них влияет другая. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, когда он способен влиять на экспрессию данной 35 кодирующей последовательности (т.е., данная кодирующая последовательность находится под транскрипционным контролем указанного промотора). Кодирующие последовательности могут быть функционально связаны с регуляторными последовательностями в смысловой или антисмысловой ориентации.

40 [000206] Термин "экспрессия" в данной заявке относится к транскрипции и стабильному накоплению смысловой (мРНК) или антисмысловой РНК, полученной из нуклеиновой кислоты или полинуклеотида. Экспрессия также может относиться к трансляции мРНК в белок или полипептид.

45 [000207] Термины "кассета", "касseta экспрессии" и "касseta экспрессии генов" относятся к фрагменту ДНК, который можно вставить в нуклеиновую кислоту или полинуклеотид в определенных рестрикционных сайтах или путем гомологичной рекомбинации. Указанный фрагмент ДНК содержит полинуклеотид, который кодирует интересующий полипептид, а кассета и сайты рестрикции разработаны таким образом, чтобы они гарантировали вставку кассеты в правильную рамку считывания для

транскрипции и трансляции. "Кассета для трансформации" относится к определенному вектору, содержащему полинуклеотид, который кодирует интересующий полипептид, и в добавок к указанному полинуклеотиду содержит элементы, которые способствуют трансформации определенной клетки-хозяина. Кассеты, кассеты экспрессии, кассеты

- 5 экспрессии генов и кассеты для трансформации согласно настоящему изобретению также могут включать элементы, которые вызывают усиленную экспрессию полинуклеотида, кодирующего интересующий полипептид, в клетке-хозяине. Данные элементы могут включать последовательность промотора, минимального промотора, энхансера, чувствительного элемента, терминатора, последовательность
- 10 полиаденилирования и тому подобные последовательности, но не ограничиваются ими.

- [000208] Для целей настоящего изобретения, термин "генный переключатель" относится к комбинации чувствительного элемента, связанного с промотором, и системы, основанной на лиганд-зависимом факторе транскрипции, которая, в присутствии одного 15 или нескольких лигандов, модулирует экспрессию гена, в который включены чувствительный элемент и промотор. Термин "полинуклеотид, кодирующий генный переключатель", относится к комбинации чувствительного элемента, связанного с промотором, и полинуклеотида, кодирующего систему, основанную на лиганд-зависимом факторе транскрипции, которая, в присутствии одного или нескольких 20 лигандов, модулирует экспрессию гена, в который включены чувствительный элемент и промотор.

- [000209] Промоторы терапевтических переключателей согласно настоящему изобретению могут представлять собой любой промотор, который пригоден для лечения, облегчения или предотвращения определенного заболевания, расстройства или 25 патологического состояния. Примеры включают, без каких-либо ограничений, промоторы генов, которые проявляют повышенную экспрессию только во время определенного заболевания, расстройства или патологического состояния, и промоторы генов, которые проявляют повышенную экспрессию при определенных состояниях клетки (например, пролиферация, апоптоз, изменение pH, состояния окисления, уровня 30 кислорода). В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения, когда генный переключатель содержит более чем одну последовательность фактора транскрипции, специфичность терапевтических способов можно повысить путем комбинирования специфичного для заболевания или патологического состояния промотора с промотором, специфичным для типа ткани или клеток, чтобы ограничить ткани, в 35 которых будет экспрессироваться терапевтический продукт. Таким образом, промоторы, специфичные для типа ткани или клеток, входят в объем определения промотора терапевтического переключателя.

- [000210] В качестве примера специфичных для заболевания промоторов, к пригодным промоторам для лечения рака относятся промоторы онкогенов. Примеры классов 40 онкогенов включают факторы роста, рецепторы факторов роста, протеинкиназы, регуляторы программирующей гибели клетки и факторы транскрипции, но не ограничиваются ими. Конкретные примеры онкогенов включают sis, erb B, erb B-2, ras, abl, myc и bcl-2 и TERT, но не ограничиваются ими. Примеры других связанных с раком генов включают гены опухолеспецифического антигена и другие гены, экспрессия 45 которых повышена в неопластических клетках (например, MAGE-1, раково-эмбриональный антиген, тирозиназа, специфический антиген предстательной железы, специфический мембранный антиген предстательной железы, p53, MUC-1, MUC-2, MUC-4, HER-2/neu, T/Tn, MART-1, gp100, GM2, Tn, sTn и антиген Томпсена-Фриденрайха

(TF)).

[000211] Примеры промоторных последовательностей и других регуляторных элементов (например, энхансеров), которые известны в данной области и пригодны в качестве промоторов терапевтического переключателя в настоящем изобретении, 5 описаны в ссылках, перечислены в Таблицах 1 и 2, наряду с заболеванием/расстройством (Таблица 1) или тканеспецифичностью (Таблица 2), связанной с каждым промотором. Промоторные последовательности, описанные в данных ссылках, полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

10 Таблица 1

Промоторная последовательность	Заболевание/расстройство	Номер патента/опубликованной заявки
Her-2/neu (ERBB2/c-erbB-2)	рак	5,518,885
остеокальцин	кальцифицированные опухоли	5,772,993
стромелизин-1	рак	5,824,794
специфический антиген предстательной железы	рак предстательной железы	5,919,652
натрий-йодный симпортер человека	рак щитовидной железы	6,015,376
H19, IF-1, IGF-2	рак	6,306,833
тимозин p15	рак груди, поджелудочной железы, предстательной железы	6,489,463
фактор Т-клеток	рак	6,608,037
хрящевой белок, чувствительный к ретиноевой кислоте	хондросаркома, опухоль молочной железы	6,610,509
инсулин	рак поджелудочной железы	6,716,824
PEG-3	рак	6,737,523
обратная транскриптаза теломеразы	рак	6,777,203
ген-7, ассоциированный с дифференцировкой меланомы	рак	6,841,362
простазин	рак	6,864,093
катализитическая субъединица теломеразы; циклин-А	рак	6,936,595
мидкин; c-erbB-2	рак	7,030,099
специфичный мембранный антиген предстательной железы	рак предстательной железы	7,037,647
p51	рак	7,038,028
РНК теломеразы	рак	7,084,267
простатическая кислая фосфатаза	рак предстательной железы	7,094,533
PCA3 _{dd3}	рак предстательной железы	7,138,235
DF3/MUC1	рак	7,247,297
hex II	рак	2001/0011128
циклооксигеназа-2	рак	2002/0107219
супер ПСА	рак предстательной железы	2003/0078224
skp2	рак	2003/0109481
PRL-3	метастатический рак толстой кишки	2004/0126785
CA125/M17S2	рак яичников	2004/0126824
IAI.3B	рак яичников	2005/0031591

CRG-L2	рак печени	2005/0124068
TRPM4	рак предстательной железы	2006/0188990
RTVP	gliома	2006/0216731
TARP	рак предстательной железы, рак молочной железы	2007/0032439
обратная транскриптаза теломеры	рак	2007/0059287
амилоидный белок A4	болезнь Альцгеймера	5,151,508

5	белок-предшественник β -амилоида	болезнь Альцгеймера	5,643,726
	предшественник амилоидного белка A4 болезни Альцгеймера	болезнь Альцгеймера	5,853,985
	нейропептид FF	расстройства ЦНС	6,320,038
	стрессовые элементы эндоплазматического ретикулума	стресс	7,049,132
	урокортил II	психопатологии	7,087,385
	тирозингидроксилаза	неврологические расстройства	7,195,910
10	фактор комплемента 3; сывороточный амилоид A3	воспаление	5,851,822
	тканевый ингибитор металлопротеиназы-3 (TIMP-3)	ревматизм, рак, аутоиммунное заболевание, воспаление	5,854,019
	рецептор фактора некроза опухоли p75	аутоиммунное заболевание	5,959,094
	фактор некроза опухоли-а	воспаление	6,537,784
15	рецептор, активируемый пролифераторами перокси-ком/ПА-1 внепанкреатическая секретируемая фосфолипаза A2	воспаление	6,870,044
	SOCS-3	расстройства роста, аутоиммунное заболевание, воспаление	2002/0174448
	SR-BI	липидные расстройства	5,965,790
	Ob	ожирение	5,698,389
20	сайт-1 протеаза	ожирение, диабет	7,045,294
	TIGR	глаукома	7,138,511
	VL30	аноксия	5,681,706
	моторный аминокислотный транспортер-2	ишемия нервной системы	2004/0171108
	MDTS9	почечная недостаточность	2006/0014931
25	LIM, пирролин-5-карбоксилат-редуктаза, SIM2	расстройства предстательной железы	2006/0134688
	Bax	апоптоз	5,744,310
	fas	апоптоз	5,888,764

bbc3	апоптоз	7,202,024
PINK-1	расстройства сигнального пути PI-3 киназы/Akt	2006/0228776

30

Таблица 2		
Промоторная последовательность	Тканеспецифичность	Номер патента/опубликованной заявки
тропонин T	скелетные мышцы	5,266,488
myoD	мышцы	5,352,595
актин	мышцы	5,374,544
22 α гладкой мышцы	гладкая мышца артерии	5,837,534
утрофин	мышцы	5,972,609
миотатин	мышцы	6,284,882
тяжелая цепь миозина гладкой мышцы	гладкая мышца	6,780,610
сердечный белок с анкириновыми повторами	сердечные мышцы	7,193,075
MLP	мышцы	2002/0042057
смузелин	гладкая мышца	2003/0157494
MYBPC3	кардиомиоциты	2004/0175699
Ta1 α -тубулин	нейроны	5,661,032
молекула межклеточной адгезии-4 (ICAM-4)	нейроны	5,753,502
субъединица β 1 рецептора типа А γ -аминомасляной кислоты	гипоталамус	6,066,726
β 2-субъединица нейронального никотинового ацетилхолинового рецептора	нейроны	6,177,242

пресенилин-1	нейроны	6,255,473
кальций-кальмодулин-зависимая киназа II _α	передний мозг	6,509,190
рецептор CRF _{2α}	головной мозг	7,071,323
фактор роста нервов	нейроны	2003/159159
рецептор GLP-2	кишечник, головной мозг	2002/0045173
трансглутаминаза I типа	кератиноциты	5,643,746
K14	кератиноциты	6,596,515
стеароил-СоА-десатураза	кожа	2002/0151018
мегзин	клетки почечного эпителия	6,790,617
пролактин	гипофиз	5,082,779
GDF-9	яичник, яички, гиппокамп, гипофиз, плацента	7,227,013
PSP94	предстательная железа	2003/0110522
NRL; NGAL	молочная железа	5,773,290

длинный промотор кислого сывороточного белка	молочная железа	5,831,141
амилоид А, ассоциированный с молочной железой	эпителиальные клетки протоков молочной железы	2005/0107315
эндотелин-1	эндотелиальные клетки	5,288,846
серглицин	гематопоэтические клетки	5,340,739
молекула 1 адгезии тромбоцитов и эндотелиальных клеток (РЕ-CAM-1)	тромбоциты, лейкоциты, эндотелиальные клетки	5,668,012
рецептор с тирозинкиназной активностью Tie	эндотелиальные клетки, костный мозг	5,877,020
KDR/flk-1	эндотелиальные клетки	5,888,765
эндоглин	эндотелиальные клетки	6,103,527
CCR5	миелоидные и лимфоидные клетки	6,383,746
CD11d	миелоидные клетки	6,881,834
тромбоцитарный гликопротеин IIb	гематопоэтические клетки	6,884,616
препроэндотелин-1	эндотелиальные клетки	7,067,649
белок, связывающий интерлейкин-18	мононуклеары	2006/0239984
CD34	гематопоэтические стволовые клетки	5,556,954
тирозинкиназа Tec	гематопоэтические стволовые клетки, печень	6,225,459

30 [000212] Другие гены, которые демонстрируют изменения в уровнях экспрессии во время определенных заболеваний или расстройств и, следовательно, могут обеспечивать промоторы, которые пригодны для настоящего изобретения, включают гены (наряду со связанным с ними заболеванием/расстройством), перечисленные в Таблице 3, но не ограничиваются ими.

35

Таблица 3		
Ген	Заболевание/расстройство	Номер патента/опубликованной заявки
MLH1, MSH2, MSH6, PMS1, APC	Колоректальный рак	7,148,016
LEF-1	Рак толстой кишки	2002/0169300
рецептор F2	Рак толстой кишки	2002/0187502

40

рецептор TGF-β II типа	Рак толстой кишки	2004/0038284
EYA4	Рак толстой кишки	2005/0003463
PCA3	Рак предстательной железы	7,138,235
K2	Рак предстательной железы	6,303,361
PROST 03	Метастазирование рака предстательной железы	2002/0009455
PCAM-1	Рак предстательной железы	2002/0042062
PCADM-1	Рак предстательной железы	2003/0100033
PCA3 _{dd3}	Рак предстательной железы	2003/0165850
PCAV	Рак предстательной железы	2006/0275747

	PAcP	Нечувствительный к андрогену рак предстательной железы	2006/0294615
5	SEQ ID NO:1 из патента 5,866,329, включена в настоящее описание посредством ссылки	Рак печени	5,866,329
	SEQ ID NOS:1, 3 из публикации заявки на патент США 2002/0115094, включены в настоящее описание посредством ссылки	Печеночно-клеточный рак	2002/0115094
	SEQ ID NO:1 из публикации заявки на патент США 2005/0037372, включена в настоящее описание посредством ссылки	Печеночно-клеточная карцинома	2005/0037372
10	ATB ₀	Печеночно-клеточная карцинома	2006/0280725
	SEQ ID NOS:1, 3 из публикации заявки на патент США 2007/0042420	Рак печени	2007/0042420
	CSA-1	Хондросаркома	2001/0016649
15	SEQ ID NOS:1-15 из публикации заявки на патент США 2001/0016651, включены в настоящее описание посредством ссылки	Рак поджелудочной железы	2001/0016651
	SEQ ID NOS:1-15 из публикации заявки на патент США 2003/0212264, включены в настоящее описание посредством ссылки	Рак поджелудочной железы	2003/0212264
	SYG972	Рак молочной железы	2002/0055107
20	Urb-ctf	Рак молочной железы	2003/0143546
	BCU399	Рак молочной железы	2003/0180728
	TBX2	Рак молочной железы	2004/0029185
	Cyr61	Рак молочной железы	2004/0086504

	DIAPH3	Рак молочной железы	2005/0054826
25	SEQ ID NOS:1-24 из публикации заявки на патент США 2007/0134669, включены в настоящее описание посредством ссылки	Рак молочной железы	2007/0134669
	Аспартил-(аспарагинил)-бета-гидроксилаза человека	Рак ЦНС	2002/0102263
	ВЕНАВ	Рак ЦНС	2003/0068661
	IL-8	Саркома Капоши	2003/0096781
30	SEQ ID NO:1-278 из публикации заявки на патент США 2002/0198362, включены в настоящее описание посредством ссылки	Гематологические раки	2002/0198362
	BLSA	В-клеточный рак	2003/0147887
	BP1	Лейкемия	2003/0171273
	DAP-киназа, HOXA9	Немелкоклеточная карцинома легкого	2003/0224509
35	ARP	Светлоклеточная карцинома почки, воспалительные расстройства	2004/0010119
	Nbk	Рак почки	2005/0053931
	CD43	Рак яичников	2006/0216231
40	SEQ ID NOS:1-84 из публикации заявки на патент США 2007/0054268, включены в настоящее описание посредством ссылки	Рак яичников	2007/0054268
	β7-hcG, β6-hCG, β6e-hCG, β5-hCG, β8-hcG, β3-hCG	Опухоли матки	2006/0292567
	MTA1s	Нечувствительный к гормонам рак	2006/0204957
	Old-35, Old-64	Пролиферация опухоли	2003/0099660
	LAGE-1	Рак	6,794,131
45	CIF150/hTAF _{II} 150	Рак	6,174,679
	Онкоэмбриональный белок P65	Рак	5,773,215
	Теломераза	Рак	2002/0025518
	CYP1B1	Рак	2002/0052013
	14-3-3σ	Рак	2002/0102245
	NES1	Рак	2002/0106367

CAR-1	Pak	2002/0119541
HMGI, MAG	Pak	2002/0120120
ELL2	Pak	2002/0132329
Эфрин B2	Pak	2002/0136726
WAF1	Pak	2002/0142442

5

CIF130	Pak	2002/0143154
C35	Pak	2002/0155447
BMP2	Pak	2002/0159986
BUB3	Pak	2002/0160403
Полимераза каппа	Pak	2003/0017573

10

EAG1, EAG2	Pak	2003/0040476
SEQ ID NOS:18,20,22 из публикации заявки на патент США 2003/0044813, включены в настоящее описание посредством ссылки	Pak	2003/0044813
HMG I	Pak	2003/0051260
HLTF	Pak	2003/0082526
Barx2	Pak	2003/0087243

15

SEQ ID NOS:18, 20, 22, 32, 34, 36 из публикации заявки на патент США 2003/0108920, включены в настоящее описание посредством ссылки	Pak	2003/0108920
Cables	Pak	2003/0109443
Pp 32r1	Pak	2003/0129631
BMP4	Pak	2003/0134790
TS10q23.3	Pak	2003/0139324

20

Ядерный белок сборки веретена деления	Pak	2003/0157072
PFTAIRE	Pak	2003/0166217
SEMA3B	Pak	2003/0166557
МОСр	Pak, множественный склероз, воспалительное заболевание	2003/0166898
Фортилин	Pak	2003/0172388

25

SEQ ID NO:1 из публикации заявки на патент США 2003/0215833, включена в настоящее описание посредством ссылки	Pak	2003/0215833
IGFBP-3	Pak	2004/0005294
Полигомеозисный 2	Pak	2004/0006210
PNQALRE	Pak	2004/0077009

30

SEQ ID NOS:1, 3 из публикации заявки на патент США 2004/0086916, включены в настоящее описание посредством ссылки	Pak	2004/0086916
SCN5A	Pak	2004/0146877
miR15, miR16	Pak	2004/0152112
Хэдпин	Pak	2004/0180371

35

PAOh1/SMO	Pak	2004/0229241
Hippo, Mst2	Pak	2005/0053592
PSMA-подобный	Pak, неврологические расстройства	2005/0064504
JAB1	Pak	2005/0069918
NF-AT	Pak	2005/0079496

40

P28ING5	Pak	2005/0097626
MTG16	Pak	2005/0107313
ErbB-2	Pak	2005/0123538
HDAC9	Pak	2005/0130146
GPBP	Pak	2005/0130227

45

MG20	Pak	2005/0153352
KLF6	Pak	2005/0181374
ARTS1	Pak	2005/0266443

	Dock 3	Рак	2006/0041111
	Аннексии 8	Рак	2006/0052320
	MH15	Рак	2006/0068411
	DELTA-N p73	Рак	2006/0088825
5	RapR6	Рак	2006/099676
	StarD10	Рак	2006/0148032
	Ciz1	Рак	2006/0155113
	HLJ1	Рак	2006/0194235
	RapR7	Рак	2006/0240021
	A34	Рак	2006/0292154
10	Sef	Рак	2006/0293240
	Киллин	Рак	2007/0072218
	SGA-1M	Рак	2007/0128593
	Рецептор TGF β II типа	Рак	2002/0064786
	GCA-ассоциированные гены	Гигантоклеточный артериит	6,743,903
	PRV-1	Истинная полицитемия	6,686,153
15	SEQ ID NOS:2, 4 из патента США 5,948,637, включены в настоящее описание посредством ссылки	Ишемия	5,948,637
	Vezf1	Сосудистые расстройства	2002/0023277
	MLP	Дилатационная кардиомиопатия	2002/0042057
	VEGI	Патологический ангиогенез	2002/0111325
	PR0256	Сердечно-сосудистые расстройства	2002/0123091
20	AOP2	Атеросклероз	2002/0142417
	Ремоделин	Артериальный рестеноз, фиброз	2002/0161211
	Фосфодиэстераза 4D	Инсульт	2003/0054531
	Рецептор простагландинов подтипа EP3	Заболевание окклюзии периферических артерий	2003/0157599

	CARP	Сердечные расстройства	2004/0014706
25	HOP	Врожденный порок сердца	2004/0029158
	SEQ ID SEQ ID NOS:1-4 из публикации заявки на патент США 2004/0087784, включены в настоящее описание посредством ссылки	Апоплексия	2004/0087784
	PLTP	Атеросклероз, заболевание сосудов, гиперхолестеринемия, танжерская болезнь, семейное заболевание недостаточности ЛПВП	2006/0252787
30	SEQ ID NOS:1, 3-8, 15, 16 из публикации заявки на патент США 2007/0160996, включены в настоящее описание посредством ссылки	Тромбоз	2007/0160996
	UCP-2	Инсульт	2002/0172958
35	FLJ11011	Анемия Фанкони	2006/0070134
	Коданин-1	Анемия	2006/0154331
	SEQ ID NOS:1, 6, 8 из патента США 5,763,591, включены в настоящее описание посредством ссылки	Инсулин-зависимый сахарный диабет	5,763,591
	Резистин	Диабет II типа	2002/0161210
40	Архипелин	Диабет	2003/0202976
	SEQ ID NOS: 2,7,16,27 из публикации заявки на патент США 2004/0053397, включены в настоящее описание посредством ссылки	Диабет, гиперлипидемия	2004/0053397
	Нейронатин	Метаболические расстройства	2004/0259777
	Ncb5or	Диабет	2005/0031605
45	7B2	Эндокринные расстройства	2005/0086709
	PTHrP, PEX	Метаболические заболевания костей	2005/0113303
	KChIP1	Диабет II типа	2005/0196784
	SLIT-3	Диабет II типа	2006/0141462
	CX3CR1	Диабет II типа	2006/0160076

5	SMAP-2	Диабет	2006/0210974
	SEQ ID NOS:2, 8, 12, 16, 22, 26, 28, 32 из публикации заявки на патент США 2006/0228706, включены в настоящее описание посредством ссылки	Диабет II типа	2006/0228706
	IC-RFX	Диабет	2006/0264611
10	E2IG4	Диабет, устойчивость к инсулину, ожирение	2007/0036787
	SEQ ID NOS:2, 8, 10, 14, 18, 24, 26, 30, 34, 38, 44, 50, 54, 60, 62, 68, 74, 80, 86, 92, 98, 104, 110 из публикации заявки на патент США 2007/0122802, включены в настоящее описание посредством ссылки	Диабет	2007/0122802
15	UCP2	Нарушение массы тела	2002/0127600
	Рецептор Ob	Нарушение массы тела	2002/0182676
	Ob	Нарушение массы тела	2004/0214214
	Dp1	Нейродегенеративные расстройства	2001/0021771
20	NRG-1	Шизофрения	2002/0045577
	Синапсин III	Шизофрения	2002/0064811
	NRG1AG1	Шизофрения	2002/0094954
	AL-2	Нервные расстройства	2002/0142444
	Пролиндегидрогеназа	Биполярное расстройство, большое депрессивное расстройство, шизофрения, обсессивно-компульсивное расстройство	2002/0193581
25	MNR2	Хроническое нейродегенеративное заболевание	2002/0197678
	ATM	Атаксия-телеангиэктазия	2004/0029198
	Ho-1	Дементные заболевания	2004/0033563
	CON202	Шизофрения	2004/0091928
	Атаксин-1	Нейродегенеративные расстройства	2004/0177388
30	NR3B	Заболевания мотонейронов	2005/0153287
	NIPA-1	Наследственная спастическая параплегия	2005/0164228
	DEPP, адреномедуллин, csdA	Шизофрения	2005/0227233
	Inf-20	Нейродегенеративные заболевания	2006/0079675
	EOPA	Расстройства развития головного мозга и дегенеративные расстройства	2007/0031830
35	SERT	Аутизм	2007/0037194
	FRP-1	Глаукома	2002/0049177
	Сывороточный амилоид А	Глаукома	2005/0153927
	BMP2	Остеопороз	2002/0072066
	BMPR1A	Юношеский полипоз	2003/0072758
	ACLP	Гастрошизис	2003/0084464
40	Резистин-подобная молекула β	Семейный аденоатозный полипоз, диабет, устойчивость к инсулину, рак толстой кишки, воспалительное заболевание кишечника	2003/0138826
	Dlg5	Воспалительное заболевание кишечника	2006/0100132
	SEQ ID NOS:1-82 из публикации заявки на патент США 2002/0119452, включены в настоящее описание посредством ссылки	Остеоартрит	2002/0119452
45	TRANCE	Расстройства иммунной системы	2003/0185820
	Матрилин-3	Остеоартрит	2003/0203380
	Синовиолин	Ревматоидный артрит	2004/0152871
	SEQ ID NOS:9, 35 из публикации заявки на патент США 2007/0028314, включены в настоящее описание посредством ссылки	Остеоартрит	2007/0028314
	HIV LTR	ВИЧ-инфекция	5,627,023
	SHIVA	ВИЧ-инфекция	2004/0197770
	EBI 1, EBI 2, EBI 3	Инфекция вирусом Эпштейна-Барр	2002/0040133
	Семейство NM23	Кожные/кишечные расстройства	2002/0034741
	SEQ ID NO:1 из публикации заявки на патент США 2002/0169127,	Псориаз	2002/0169127

	включена в настоящее описание посредством ссылки		
5	Eps8	Кожные расстройства, заживление ран	2003/0180302
	Бета-10	Патология щитовидной железы	2002/0015981
	SEQ ID NO:2 из публикации заявки на патент США 2003/0207403, включена в настоящее описание посредством ссылки	Патологические состояния щитовидной железы	2003/0207403
	SEQ ID NO:3 из публикации заявки на патент США 2007/0020275, включена в настоящее описание посредством ссылки	Расстройства щитовидной железы	2007/0020275
10	Фактор роста волоссяной	Алопеция	2003/0036174
	фолликулы		
	Корнеодесмозин	Алопеция	2003/0211065
	GCR9	Астма, лимфома, лейкемия	2003/0166150
15	SEQ ID NO:1-71 из публикации заявки на патент США 2004/0002084, включены в настоящее описание посредством ссылки	Астма	2004/0002084
	Bg	Синдром Чедиака-Хигаси	2002/0115144
	SEQ ID NOS:1-16 из публикации заявки на патент США 2002/0127555, включены в настоящее описание посредством ссылки	Эндометриоз	2002/0127555
20	FGF23	Гипофосфатемические расстройства	2005/0156014
	BBSR	Синдром Барде-Бидля	2003/0152963
	MIC-1	Аномалии плода, рак, воспалительные расстройства, невынашивание, преждевременные роды	2004/0053325
	MIA-2	Повреждение печени	2004/0076965
	IL-17B	Расстройства дегенерации хряща	2004/0171109
25	Формилглицин-образующий фермент	Множественная недостаточность сульфатаз	2004/0229250
	LPLA2	Легочно-альвеолярный протеиноз	2006/0008455
	CXCL10	Респираторные расстройства	2006/0040329
	SEQ ID NOS:1, 2 из публикации заявки на патент США 2006/0140945, включены в настоящее описание посредством ссылки	Нефропатия	2006/0140945
30	HFE2A	Нарушения метаболизма железы	2007/0166711

[000213] Как только определен ген, паттерн экспрессии которого модулируется во время заболевания, расстройства или патологического состояния, промотор данного гена можно использовать в генном переключателе согласно настоящему изобретению. Последовательности многих генов, включая промоторные участки, известны в данной области и доступны в открытых базах данных, например, в GenBank. Таким образом, как только идентифицирован подходящий ген, можно легко идентифицировать и получить его промоторную последовательность. Другой аспект настоящего изобретения направлен на идентификацию подходящих генов, промотор которых можно выделить и поместить в генный переключатель. Сущность указанного гена, следовательно, может быть не важна для конкретных вариантов реализации настоящего изобретения, при условии, что промотор можно выделить и использовать впоследствии в другой обстановке или окружении. Настоящее изобретение, таким образом, включает применение промоторов из генов, которые еще предстоит идентифицировать. Как только подходящие гены идентифицированы, определение генетических последовательностей, необходимых для промоторной функции, становится вопросом обычных профессиональных навыков или экспериментирования. Действительно, существует несколько коммерческих протоколов, помогающих определить промоторный участок интересующих генов. В качестве примера. Ding и др. недавно выявили

промоторную последовательность нового гена Sprouty4 (Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 287: L52 (2004), которая включена посредством ссылки) путем постепенного удаления 5'-фланкирующей последовательности гена Sprouty4 человека. Вкратце, как только определили сайт инициации транскрипции, получили ПЦР-фрагменты, применяя общие ПЦР-праймеры, чтобы клонировать фрагменты 5'-фланкирующего фрагмента в одном направлении. Полученные фрагменты клонировали в люциферазный репортерный вектор и измеряли активность люциферазы, чтобы определить промоторную область гена Sprouty4 человека.

[000214] Другой пример протокола для получения и подтверждения промоторов

- 10 генов содержит следующие этапы: (1) получение образцов пораженной болезнью и не пораженной болезнью клетки/ткани сходного/того же типа ткани; (2) выделение общей РНК или мРНК из образцов; (3) осуществление дифференциального анализа на микрочипе РНК из пораженного болезнью и не пораженного болезнью материала; (4) идентификацию кандидатов специфичных для заболевания транскриптов; (5)
- 15 идентификацию геномных последовательностей, связанных со специфичными для заболевания транскриптами; (6) получение или синтез последовательности ДНК против хода транскрипции и по ходу транскрипции от предсказанного сайта инициации транскрипции специфичного для заболевания транскрипта; (7) разработка и получение промоторных репортерных векторов, используя участки ДНК различной длины из
- 20 этапа 6; и (8) тестирование промоторных репортерных векторов в пораженных болезнью и не пораженных болезнью клетках/тканях, а также в неродственных клетках/тканях.

[000215] Источник, из которого получают промотор, который вставляют в генный переключатель, может быть природным или синтетическим, и источник промотора не должен ограничивать объем настоящего изобретения, описанного в данной заявке.

- 25 Другими словами, промотор можно непосредственно клонировать из клеток, или промотор может быть клонирован ранее из отличного источника, или промотор может быть синтезирован ранее.

Системы генных переключателей

[000216] Генный переключатель может представлять собой любой генный

- 30 переключатель, который регулирует экспрессию гена при добавлении или удалении определенного лиганда. В одном варианте реализации настоящего изобретения, генный переключатель представляет собой такой генный переключатель, в котором уровень экспрессии гена зависит от уровня присутствующего лиганда. Примеры комплексов лиганд-зависимых факторов транскрипции, которые можно применять в генных
- 35 переключателях согласно настоящему изобретению, включают члены суперсемейства ядерных рецепторов, активируемых подходящими лигандами (например, глюкокортикоидом, эстрогеном, прогестином, ретиноидом, экдизоном и их аналогами и миметиками), и гРТА, активируемый тетрациклином, но не ограничиваются ими. В одном аспекте настоящего изобретения, генный переключатель представляет собой
- 40 основанный на EcR генный переключатель. Примеры таких систем включают системы, описанные в патентах США с номерами 6,258,603, 7,045,315, опубликованных патентных заявках США с номерами 2006/0014711, 2007/0161086 и в опубликованной заявке на международный патент с номером WO 01/70816, но не ограничиваются ими. Примеры систем химерного рецептора экдизона описаны в патенте США номер 7,091,038,
- 45 опубликованных патентных заявках США с номерами 2002/0110861, 2004/0033600, 2004/0096942, 2005/0266457 и 2006/0100416 и опубликованных международных заявках с номерами WO 01/70816, WO 02/066612, WO 02/066613, WO 02/066614, WO 02/066615, WO 02/29075, WO 2005/108617, каждая из которых полностью включена посредством

ссылки. Пример системы, регулируемой нестериоидным агонистом экдизона, представляет собой индуцируемую систему экспрессии у млекопитающего RheoSwitch® (New England Biolabs, Ипсвич, Массачусетс). В другом аспекте настоящего изобретения, генный переключатель основан на гетеродимеризации белка, связывающего FK506 (FKBP), с FKBP-рапамицин-связанным белком (FRAP) и регулируется с помощью рапамицина или его неиммуносупрессорных аналогов. Примеры таких систем включают транскрипционную технологию ARGENT™ (ARIAD Pharmaceuticals, Кембридж, Массачусетс) и системы, описанные в патентах США с номерами 6,015,709, 6,117,680, 6,479,653, 6,187,757 и 6,649,595, но не ограничиваются ими.

[000217] В одном варианте реализации настоящего изобретения, указанный генный переключатель содержит одну последовательность фактора транскрипции, кодирующую комплекс лиганд-зависимого фактора транскрипции под контролем промотора терапевтического переключателя. Последовательность фактора транскрипции может кодировать комплекс лиганд-зависимого фактора транскрипции, который представляет собой встречающийся в природе или искусственный комплекс лиганд-зависимого фактора транскрипции. Искусственный фактор транскрипции представляет собой такой фактор транскрипции, в котором природная последовательность фактора транскрипции была изменена, например, путем введения мутации в последовательность или путем объединения доменов из различных факторов транскрипции. В одном варианте реализации, фактор транскрипции содержит лигандсвязывающий домен ядерного рецептора группы Н. В одном варианте реализации настоящего изобретения, лигандсвязывающий домен ядерного рецептора группы Н получают из рецептора экдизона, вездесущего рецептора (UR), сиротского рецептора 1 (OR-1), ядерного рецептора стероидных гормонов 1 (NER-1), белка, взаимодействующего с рецептором ретиноида X-15 (RIP-15), X-рецептора-бета печени (LXR β), белка, подобного рецептору стероидных гормонов (RLD-1), X-рецептора печени (LXR), X-рецептора-альфа печени (LXR α), фарнезоид-X-рецептора (FXR), взаимодействующего с рецептором белка 14 (RIP-14) или рецептора фарнезола (HRR-1). В другом варианте реализации настоящего изобретения, лигандсвязывающий домен ядерного рецептора группы Н получают из рецептора экдизона.

А. Основанный на экдизоне генный переключатель

[000218] EcR и другие ядерные рецепторы группы Н представляют собой члены суперсемейства ядерных рецепторов, все члены которого, как правило, отличаются присутствием аминоконцевого домена трансактивации (AD, также называемого взаимозаменяемо "ТА" или "TD"), возможно слитого с партнером по гетеродимеризации (HP) с получением коактиваторного белка (CAP), связывающего ДНК домена (DBD) и лигандсвязывающего домена, соединенного с DBD с помощью шарнирного участка с получением лиганд-зависимого фактора транскрипции (LTF). В данной заявке, термин "связывающий ДНК домен" включает минимальную полипептидную последовательность связывающего ДНК белка, вплоть до полной длины связывающего ДНК белка, при условии, что функция связывающего ДНК домена состоит в связывании с конкретным чувствительным элементом. Члены суперсемейства ядерных рецепторов также отличаются присутствием четырех или пяти доменов: A/B, C, D, E и, в некоторых членах семейства, F (см. US 4,981,784 и Evans, Science 240: 889 (1988)). Домен "A/B" соответствует домену трансактивации, "C" соответствует связывающему ДНК домену, "D" соответствует шарнирному участку и "E" соответствует лигандсвязывающему домену. Некоторые члены указанного семейства также могут содержать другой домен трансактивации на карбоксильном конце лигандсвязывающего домена, соответствующий

"F".

[000219] Следующая полипептидная последовательность была описана как полипептидная последовательность рецептора экдизона (экдистероидного рецептора) (рецептора 20-гидроксиэкдизона) (20E-рецептора) (EcRH) (член 1 группы Н подсемейства 5 1 ядерных рецепторов) и имеет номер доступа в Genbank P34021.

[000220] Рецептор экдизона (878 АК) из *Drosophila melanogaster* (плодовой мушки) (SEQ ID NO:5)

```

1  mkrwsnnqg fmrlpeesss evtssnnglv lpsgvnmsps sldshdycdq dlwlcgnesq
61  sfggnsnghgl sqqqqsvitl amhgcsstlp aqttiiping nangnggstdn gqyvpgatnl
121  galangmlng gfngmqqqiq nghglinstt pstpttplhl qqnlggaggg gigggmgilhh
181  angtpnglig vvgggggvgl gvggggvggl gmqhtprsdv vnsissgrdd lpssssingy
241  sanescdakk skkgpaprvq eelclvcgdr asgyhynalt cegckgffrr svtksavucc
301  kfgracemdm ymrrkcqecr lkkclavgmr pecvvpengc amkrrekkaq kekdkmttsp
361  ssqhggngsl asggggdfvk keildlmtce ppqhatipll pdeilakcqa rnipsltyng
-421  laviyklwy qdgyeqpsee dlrrimsqpd enesqtdvsf_rhiteitilt_vqlivefakg
481  lpaftkipqe dqitllkacs sevmmmlrmar rydhssdsif fannrsytrd sykmagmadn
15
541  iedllhfcrq mfsmkvdnve yalltaivif sdrpglekaq lveaiqsyyi dtlriyilnr
601  hcgdsmslvf yakllsilte lrtlgnqnae mcfslklnr klpkfleeiw dvhaippsvq
661  shlqitqeen erleraermr asvggaitag idcdsastsa aaaaqhqppq pcpqcpqssl
721  tqndsqhqtq pqlqpqlppq lqgqlqpqlq pqlqtqlqpq iqpcqqlpv sapvpasvta
781  pgslsavsts seymggssaaai gpitpattss itaavtasst tsavpmgngv gvgvgvgnv
841  smyanaqtam almgvalhsh qeqlliggvav ksehstta
20

```

[000221] DBD характеризуется присутствием двух цистeinовых цинковых пальцев, между которыми расположены два аминокислотных мотива, Р-бокс и D-бокс, которые придают специфичность чувствительным элементам. Данные домены могут быть нативными, модифицированными или химерами различных доменов гетерологичных 25 рецепторных белков. EcR, как подгруппа семейства ядерных рецепторов, также содержит менее четко определенные участки, ответственные за свойства гетеродимеризации. Так как домены ядерных рецепторов блочные по своей природе, LBD, DBD и AD можно взаимозаменять.

[000222] В другом варианте реализации настоящего изобретения, фактор

30 транскрипции содержит AD, DBD, который узнает чувствительный элемент, связанный с терапевтическим белком или терапевтическим полинуклеотидом, экспрессию которого нужно модулировать; и LBD ядерного рецептора группы Н. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения, LBD ядерного рецептора группы Н содержит мутацию с заменой.

35 [000223] В другом варианте реализации настоящего изобретения, генный переключатель содержит первую последовательность фактора транскрипции, например, CAP, под контролем первого промотора терапевтического переключателя (TSP-1), и вторую последовательность фактора транскрипции, например, LTF, под контролем второго промотора терапевтического переключателя (TSP-2), при этом указанные 40 белки, кодируемые указанной первой последовательностью фактора транскрипции и указанной второй последовательностью фактора транскрипции, взаимодействуют с образованием белкового комплекса (LDTFC), т.е., представляет собой генный переключатель, основанный на "двойном переключателе" или на "двуихибридной" системе. Первый и второй TSP могут быть одинаковыми или различными. В данном 45 варианте реализации, присутствие в генном переключателе двух различных TSP, которые необходимы для экспрессии терапевтической молекулы, повышает специфичность указанного способа терапии (см. Фигуру 2). На Фигуре 2 также продемонстрирована возможность модификации терапевтического генного переключателя для лечения

любого заболевания, расстройства или патологического состояния путем всего лишь вставки подходящих TSP.

[000224] В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения, как первая, так и вторая последовательность фактора транскрипции, например, CAP или LTF,

5 находятся под контролем одного промотора терапевтического переключателя (например, TSP-1 на Фигуре 1). Активация данного промотора приведет к получению обоих CAP и LTF в одной открытой рамке считывания. Этого можно достигнуть, применяя транскрипционный линкер, такой как IRES (участок внутренней посадки рибосомы). В данном варианте реализации настоящего изобретения, обе части комплекса 10 лиганд-зависимого фактора транскрипции синтезируются при активации TSP-1. TSP-1 может представлять собой конститутивный промотор или может активироваться лишь при условиях, связанных с заболеванием, расстройством или патологическим состоянием.

[000225] В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения, одна последовательность фактора транскрипции, например, LTF, находится под контролем

15 промотора терапевтического переключателя, активируемого лишь при условиях, связанных с заболеванием, расстройством или патологическим состоянием (например, TSP-2 или TSP-3 на Фигуре 4), и другая последовательность фактора транскрипции, например, CAP, находится под контролем конститутивного промотора терапевтического переключателя (например, TSP-1 на Фигуре 4). В данном варианте реализации 20 настоящего изобретения, одна часть комплекса лиганд-зависимого фактора транскрипции присутствует конститутивно, тогда как вторая часть будет синтезироваться лишь при условиях, связанных с заболеванием, расстройством или патологическим состоянием.

[000226] В другом варианте реализации настоящего изобретения, одна

25 последовательность фактора транскрипции, например, CAP, находится под контролем первого TSP (например, TSP-1 на Фигуре 3) и две или более отличных вторых последовательностей фактора транскрипции, например, LTF-1 и LTF-2, находятся под контролем различных TSP (например, TSP-2 и TSP-3 на Фигуре 3). В данном варианте реализации настоящего изобретения, каждый из LTF может содержать отличные DBD, 30 которые узнают промоторную последовательность, регулируемую отличным фактором (например, DBD-A связывается с чувствительным элементом, связанным с регулируемым фактором промотором-1 (FRP-1), и DBD-B связывается с чувствительным элементом, связанным с регулируемым фактором промотором-2 (FRP-2). Каждый из регулируемых фактором промоторов может быть функционально связан с различными 35 терапевтическими генами. Таким образом, можно обеспечить множество лекарственных средств одновременно.

[000227] В одном варианте реализации настоящего изобретения, первая последовательность фактора транскрипции кодирует полипептид, включающий AD, DBD, который узнает чувствительный элемент, связанный с последовательностью

40 терапевтического продукта, экспрессию которого нужно модулировать; и лигандсвязывающий домен ядерного рецептора группы Н, и вторая последовательность фактора транскрипции кодирует фактор транскрипции, включающий лигандсвязывающий домен ядерного рецептора, выбранного из ретиноид-Х-рецептора (RXR) позвоночного, RXR беспозвоночного, белка ultraspiracle (USP), или химерного 45 ядерного рецептора, включающего по меньшей мере два различных полипептидных фрагмента лигандсвязывающего домена ядерного рецептора, выбранных из RXR позвоночного, RXR беспозвоночного и USP (см. WO 01/70816 A2 и US 2004/0096942 A1). "Партнерский" лигандсвязывающий домен ядерного рецептора может

дополнительно включать мутацию укорачивания, делеционную мутацию, мутацию с заменой или другие модификации.

[000228] В другом варианте реализации настоящего изобретения, генный переключатель содержит первую последовательность фактора транскрипции,

- 5 кодирующую первый полипептид, содержащий лигандсвязывающий домен и DBD ядерного рецептора, который узнает чувствительный элемент, связанный с последовательностью терапевтического продукта, экспрессию которого нужно модулировать, и вторую последовательность фактора транскрипции, кодирующую второй полипептид, содержащий AD и лигандсвязывающий домен ядерного рецептора,
- 10 при этом один из лигандсвязывающих доменов ядерного рецептора представляет собой лигандсвязывающий домен ядерного рецептора группы Н. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, первый полипептид по существу свободен от AD и второй полипептид по существу свободен от DBD. Для целей настоящего изобретения, "по существу свободный" означает, что белок, о котором идет речь, не содержит достаточную последовательность домена, о котором идет речь, чтобы обеспечить активирующую или связывающую активность.

[000229] В другом аспекте настоящего изобретения, первая последовательность фактора транскрипции кодирует белок, содержащий партнера по гетеродимеризации и AD ("CAP"), и вторая последовательность фактора транскрипции кодирует белок,

- 20 содержащий DBD и лигандсвязывающий домен ("LTF").

[000230] Если один лигандсвязывающий домен (LBD) ядерного рецептора представляет собой LBD группы Н, другой лигандсвязывающий домен ядерного рецептора может быть получен из любого другого ядерного рецептора, который образует димер с LBD группы Н. Например, когда LBD ядерного рецептора группы Н

- 25 представляет собой LBD EcR, другой "партнер" LBD ядерного рецептора может быть из EcR, RXR позвоночного, RXR беспозвоночного, белка ultraspiracle (USP) или химерного ядерного рецептора, содержащего по меньшей мере два различных полипептидных фрагмента LBD ядерного рецептора, выбранных из RXR позвоночного, RXR беспозвоночного или USP (см. WO 01/70816 A2, международную патентную заявку
- 30 номер PCT/US02/05235 и US 2004/0096942 A1, полностью включенные в настоящее описание посредством ссылки). "Партнер" LBD ядерного рецептора может дополнительно содержать мутацию укорачивания, делеционную мутацию, мутацию с заменой или другую модификацию.

[000231] В одном варианте реализации настоящего изобретения, LBD RXR

- 35 позвоночного получают из RXR человека *Homo sapiens*, мыши *Mus musculus*, крысы *Rattus norvegicus*, цыпленка *Gallus gallus*, свиньи *Sus scrofa domestica*, лягушки *Xenopus laevis*, данио *Danio rerio*, оболочника *Polyandrocarpa misakiensis* или медузы *Tripedalia cysophora*.

[000232] В одном варианте реализации настоящего изобретения, LBD RXR

- 40 беспозвоночного получают из полипептида ultraspiracle саранчи *Locusta migratoria* ("LmUSP"), гомолога 1 RXR иксодового клеща *Amblyomma americanum* ("AmaRXR1"), гомолога 2 RXR иксодового клеща *Amblyomma americanum* ("AmaRXR2"), гомолога RXR манящего краба *Celuca pugilator* ("CpRXR"), гомолога RXR мучного жука *Tenebrio Molitor* ("TmRXR"), гомолога RXR медоносной пчелы *Apis mellifera* ("AmRXR"), гомолога RXR тли *Myzus persicae* ("MpRXR") или гомолога RXR недвукрылых/нечешуекрылых.

[000233] В одном варианте реализации настоящего изобретения, химерный LBD RXR содержит по меньшей мере два полипептидных фрагмента, выбранных из полипептидного фрагмента RXR позвоночных видов, полипептидного фрагмента RXR

беспозвоночных видов или полипептидного фрагмента гомолога RXR беспозвоночных видов недвукрылых/нечешуекрылых. Химерный LBD RXR для применения в настоящем изобретении может содержать по меньшей мере два полипептидных фрагмента RXR различных видов, или, когда виды одинаковые, два или более полипептидных фрагмента RXR могут быть получены из двух или более различных изоформ полипептидного фрагмента RXR указанного вида.

[000234] В одном варианте реализации настоящего изобретения, химерный LBD RXR содержит по меньшей мере один полипептидный фрагмент RXR позвоночных видов и один полипептидный фрагмент RXR беспозвоночных видов.

[000235] В другом варианте реализации настоящего изобретения, химерный LBD RXR содержит по меньшей мере один полипептидный фрагмент RXR позвоночных видов и один полипептидный фрагмент гомолога RXR беспозвоночных видов недвукрылых/нечешуекрылых.

[000236] Лиганд, когда он объединен с LBD ядерного рецептора(ов), который, в свою очередь, связан с чувствительным элементом FRP, связанного с последовательностью терапевтического продукта, обеспечивает внешнюю временную регуляцию экспрессии последовательности терапевтического продукта. Механизм связывания или порядок, в котором различные компоненты настоящего изобретения связываются друг с другом, то есть, например, лиганд с LBD, DBD с чувствительным элементом, AD с промотором и т.д., не важен.

[000237] В конкретном примере, связывание лиганда с лигандсвязывающим доменом (LBD) ядерного рецептора группы Н и с партнером LBD ядерного рецептора приводит к экспрессии последовательности терапевтического продукта. Этот механизм не исключает возможность связывания лиганда с ядерным рецептором группы Н (GHNР) или его партнером, и образование в результате этого активных гомодимерных комплексов (например, GHNР + GHNР или партнер + партнер). Предпочтительно, один или более доменов рецептора изменяют, чтобы получить гибридный генный переключатель. Обычно, один или более из трех доменов, DBD, LBD и AD, можно выбрать из источника, отличного от источника других доменов, для того, чтобы оптимизировать гибридные гены и полученные в результате этого гибридные белки в выбранной клетке-хозяине или организме по трансактивирующему активности, комплементарному связыванию лиганда и узнаванию определенного чувствительного элемента. Вдобавок, сам чувствительный элемент можно модифицировать или заменить на чувствительные элементы к доменам других связывающих ДНК белков, таких как белок GAL-4 из дрожжей (см. Sadowski и др., Nature 335: 563 (1988)) или белок LexA из Escherichia coli (см. Brent и др., Cell 43: 729 (1985)), или на синтетические чувствительные элементы, специфичные для направленных взаимодействий с белками, разработанные, модифицированные и отобранные по таким определенным взаимодействиям (см., например, Kim и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 3616 (1997)), чтобы привести чувствительный элемент в соответствие с гибридными рецепторами. Другое преимущество двухгибридных систем состоит в том, что они позволяют выбрать промотор, используемый для запуска экспрессии гена, в соответствии с желательным конечным результатом. Такой двойной контроль может быть особенно важен в области генной терапии, особенно когда продуцируются цитотоксические белки, так как можно контролировать как временной интервал экспрессии, так и вид клеток, в которых будет происходить экспрессия. Когда гены, функционально связанные с подходящим промотором, вводят в клетки субъекта, экспрессию экзогенных генов контролируют с помощью системы согласно настоящему изобретению. Промоторы могут быть

конститутивно или индуцибельно регулируемыми, или могут быть тканеспецифичными (то есть, экспрессироваться только в определенном типе клеток), или специфичными для некоторых стадий развития организма.

[000238] Связывающий ДНК домен первого гибридного белка связывается, в

5 присутствии или отсутствии лиганда, с последовательностью ДНК чувствительного элемента, чтобы инициировать или подавить транскрипцию гена (генов), расположенного по ходу транскрипции, находящегося под регуляцией этого чувствительного элемента.

[000239] Функциональный LDTFC, например, комплекс EcR, также может включать

10 дополнительный белок (белки), такой, как иммунофилин. Дополнительные члены семейства белков ядерных рецепторов, известные как транскрипционные факторы (такие как DHR38 или betaFTZ-1), также могут быть лигандзависимыми или независимыми партнерами для EcR, USP и/или RXR. Дополнительно, могут быть необходимы другие кофакторы, такие как белки, широко известные как коактиваторы 15 (также называемые адаптерами или медиаторами). Данные белки не связываются специфично с последовательностью ДНК и не участвуют в основной транскрипции. Они могут оказывать влияние на активацию транскрипции посредством различных механизмов, включая стимуляцию связывания активаторов с ДНК, влияние на структуру хроматина или опосредованно взаимодействий активатора с инициирующим комплексом.

20 Примеры таких коактиваторов включают RIP140, TIF1, RAP46/Bag-1, ARA70, SRC-1/ NCoA-1, TIF2/GRIP/NCoA-2, ACTR/AIB1/RACS/pCIP, а также случайный коактиваторный белок, связывающий белок, связывающий цАМФ-чувствительный элемент, CBP/p300 (для обзора см. Glass и др., Curr. Opt. Cell Biol. 9: 222 (1997)). Также, кофакторы белков, широко известные как корепрессоры (также известные как репрессоры, сайленсеры

25 или медиаторы сайленсинга), могут быть необходимы для эффективного ингибиования активации транскрипции в отсутствии лиганда. Данные корепрессоры могут взаимодействовать с не связанным с лигандом EcR, чтобы , подавлять активность на чувствительном элементе. В настоящее время имеются доказательства, которые позволяют предположить, что связывание лиганда изменяет конформацию рецептора,

30 что приводит к высвобождению корепрессора и привлечению описанных выше коактиваторов, тем самым нарушая подавляющую активность. Примеры корепрессоров включают N-CoR и SMRT (для обзора см. Horwitz и др., Mol Endocrinol. 70: 1167 (1996)). Данные кофакторы могут быть либо эндогенными в клетке или организме, либо их можно добавить экзогенно как трансгены, которые будут экспрессироваться либо

35 регулируемым, либо нерегулируемым образом.

В. Основанный на рапамицине генный переключатель

[000240] Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает систему генного переключателя, в которой используется FK506-связывающий белок в качестве комплекса лиганд-зависимого фактора транскрипции и рапамицин в качестве лиганда. В одном 40 варианте реализации настоящего изобретения, конструкция, кодирующая генный переключатель, содержит

(а) первый полинуклеотид, кодирующий первый химерный белок, который связывается с рапамицином или его аналогом, и который содержит по меньшей мере один домен FK506-связывающего белка (FKBP) и по меньшей мере один белковый 45 домен, гетерологичный ему, при этом домен FKBP содержит пептидную последовательность, выбранную из:

(1) встречающегося в природе FKBP

(2) варианта встречающегося в природе FKBP, в котором до 10 остатков аминокислот

были удалены, вставлены или заменены на заменяющие аминокислоты, и

(3) FKBР, кодируемого последовательностью ДНК, которая избирательно гибридизуется с последовательностью ДНК, кодирующей FKBР по п. (1) или (2);

5 (b) второй полинуклеотид, кодирующий второй химерный белок, который образует комплекс как с (a) рапамицином или аналогом рапамицина, так и с (b) первым химерным белком, и который содержит по меньшей мере один FKBР: рапамицин-связывающий (FRB) домен и по меньшей мере один белковый домен, гетерологичный ему, при этом домен FRB содержит пептидную последовательность, выбранную из:

(4) встречающегося в природе домена FRB,

10 (5) варианта встречающегося в природе домена FRB, в котором до 10 остатков аминокислот были удалены, вставлены или заменены на заменяющие аминокислоты, и

(6) домен FRB, кодируемый последовательностью ДНК, которая избирательно гибридизуется с последовательностью ДНК, кодирующей FRB по п. (4) или (5).

15 [000241] В данной системе генного переключателя, каждый из первого полинуклеотида и второго полинуклеотида находится под контролем одного или нескольких промоторов терапевтических переключателей, как описано в других местах настоящего описания. Более того, в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения, по меньшей мере один белковый домен, гетерологичный доменам FKBР 20 и/или FRB в первом и втором химерном белке, может представлять собой один или более доменов "действия" или "эффекторных" доменов. Эффекторные домены можно выбрать из большого разнообразия белковых доменов, включая связывающие ДНК домены, домены активации транскрипции, домены клеточной локализации и домены передачи сигнала (т.е., домены, которые способны при кластеризации или 25 мультимеризации вызывать рост, пролиферацию, дифференцировку, апоптоз клеток, транскрипцию генов и т.д.).

[000242] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения, один слитый белок содержит по меньшей мере один связывающий ДНК домен (например, связывающий ДНК домен GAL4 или ZFHD1) и другой слитый белок содержит по 30 меньшей мере один домен активации транскрипции (например, домен активации транскрипции VP16 или p65). Лиганд-опосредованная ассоциация слитых белков представляет собой образование комплекса факторов транскрипции и приводит к инициации транскрипции целевого гена, связанного с последовательностью ДНК, которая узнается (т.е., способна связываться) связывающим ДНК доменом на одном 35 из слитых белков. Сведения относительно системы экспрессии генов, а также лиганда, приведены в патентах США с номерами 6,187,757 B1, 6,649,595 B1, 6,509,152 B1, 6,479,653 B1 и 6,117,680 B1.

[000243] В других вариантах реализации, настоящее изобретение обеспечивает систему генного переключателя, который содержит полинуклеотиды, кодирующие два слитых 40 белка, которые подвергаются спонтанной агрегации в отсутствии лиганда, в которой (а) первый слитый белок содержит домен агрегации при определенных условиях, который связывается с выбранным лигандом, и домен активации транскрипции, и (б) второй слитый белок содержит домен агрегации при определенных условиях, который 45 связывается с выбранным лигандом и связывающим ДНК доменом, и (с) в отсутствии лиганда, клетки экспрессируют ген, функционально связанный с регуляторной ДНК, с которой связывается указанный связывающий ДНК домен. Модифицированные клетки, содержащие систему генного переключателя, выращиваются в присутствии лиганда в количестве, достаточном для репрессирования указанного гена. Удаление

лиганды индуцирует экспрессию кодируемого белка, который вызывает гибель клеток. Нуклеиновые кислоты, кодирующие два указанных слитых белка, находятся под контролем по меньшей мере одного промотора, функционирующего в определенных условиях. Система экспрессии генов с применением доменов агрегации при определенных условиях описана в публикации патентной заявки США номер 2002/0048792.

5 С. Система генного переключателя, основанная на прокариотическом репрессоре/ операторе

[000244] В одном варианте реализации, настоящее изобретение обеспечивает систему генного переключателя, содержащую (a) первый полинуклеотид, кодирующий

10 трансактиваторный слитый белок, содержащий прокариотический репрессор тетрациклина ("tet") и домен белка эукариотического транскрипционного активатора; и (b) второй полинуклеотид, кодирующий терапевтический белок или терапевтический полипептид; в которой указанный второй полинуклеотид функционально связан с минимальным промотором и по меньшей мере одной последовательностью оператора

15 tet. Первый полинуклеотид, кодирующий трансактиваторный слитый белок, может содержать промотор терапевтического переключателя, как описано в других местах настоящего описания. Экспрессия летального белка повышена в отсутствии тетрациклина (см., например, Gossen и др. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 5547-5551; Gossen и др. (1993) TIBS 18: 471-475; Furth и др. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 9302-9306;

20 и Shockett и др. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 6522-6526). Система экспрессии TetO описана в патенте США номер 5,464,758 B1.

[000245] В другом варианте реализации настоящего изобретения, система генного переключателя содержит системы репрессора-оператора лактозы ("Lac") из бактерии *Escherichia coli*. Система генного переключателя согласно настоящему изобретению также может содержать (a) первый полинуклеотид, кодирующий трансактиваторный слитый белок, содержащий прокариотический репрессор lac I и домен белка эукариотического транскрипционного активатора; и (b) второй полинуклеотид, кодирующий терапевтический белок или терапевтический полипептид, в которой указанный второй полинуклеотид функционально связан с промотором

30 терапевтического переключателя. В системе Lac, lac-оперон инактивирован в отсутствии лактозы или ее синтетических аналогов, таких как изопропил-β-D-тиогалактозид.

[000246] Дополнительные системы генных переключателей включают системы, описанные в следующих патентах: US 7,091,038; WO 2004078924; EP 1266015; US 20010044151; US 20020110861; US 20020119521; US 20040033600; US 20040197861; US 20040235097; US 20060020146; US 20040049437; US 20040096942; US 20050228016; US 35 20050266457; US 20060100416; WO 2001/70816; WO 2002/29075; WO 2002/066612; WO 2002/066613; WO 2002/066614; WO 2002/066615; WO 2005/108617; US 6,258,603; US 20050209283; US 20050228016; US 20060020146; EP 0965644; US 7,304,162; US 7,304,161; MX 234742; KR 10-0563143; AU 765306; AU 2002-248500 и AU 2002-306550.

40 Д. Комбинация систем генных переключателей

[000247] Настоящее изобретение обеспечивает композиции нуклеиновых кислот, модифицированные клетки и биореакторы, содержащие две или более систем генных переключателей, содержащие различные комплексы лиганд-зависимых факторов транскрипции, которые активируются эффективным количеством одного или нескольких лигандов, при этом указанные две или более систем генных переключателей содержат первый генный переключатель и второй генный переключатель, оба из которых избирательно индуцируют экспрессию одного или нескольких терапевтических полипептидов или терапевтических полинуклеотидов, при связывании с одним или

несколькими лигандами. В объем настоящего изобретения включены любое количество и/или любые комбинации систем генных переключателей.

[000248] В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает композицию нуклеиновых кислот, содержащую:

- 5 а. первую систему генного переключателя, который содержит:
 - i первую кассету экспрессии генов, содержащую полинуклеотид, кодирующий первый гибридный полипептид, который содержит:
 - 1. домен трансактивации, который активирует регулируемый фактором промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим терапевтический полипептид или терапевтический полинуклеотид; и
 - 2. домен партнера по гетеродимеризации,
 - ii. вторую кассету экспрессии генов, содержащую полинуклеотид, кодирующий второй гибридный полипептид, который содержит:
 - 1. связывающий ДНК домен, который узнает регулируемый фактором промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим терапевтический полипептид или терапевтический полинуклеотид; и
 - 2. лигандсвязывающий домен; и
 - iii. третью кассету экспрессии генов, содержащую полинуклеотид, кодирующий терапевтический полипептид или терапевтический полинуклеотид, содержащий:
 - 1. регулируемый фактором промотор, который активируется доменом трансактивации второго гибридного полипептида; и,
 - 2. полинуклеотид, кодирующий терапевтический полипептид или терапевтический полинуклеотид, и
 - b. вторую систему экспрессии генов, которая содержит:
 - i. первую кассету экспрессии генов, содержащую полинуклеотид, кодирующий первый гибридный полипептид, который содержит:
 - 1. домен трансактивации, который активирует регулируемый фактором промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим терапевтический полипептид или терапевтический полинуклеотид; и
 - ii. вторую кассету экспрессии генов, содержащую полинуклеотид, кодирующий второй гибридный полипептид, который содержит:
 - 1. связывающий ДНК домен, который узнает регулируемый фактором промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим терапевтический полипептид или терапевтический полинуклеотид, и
 - 2. лигандсвязывающий домен; и
 - iii. третью кассету экспрессии генов, содержащую полинуклеотид, кодирующий терапевтический полипептид или терапевтический полинуклеотид, содержащий:
 - 1. регулируемый фактором промотор, который активируется доменом трансактивации второго гибридного полипептида; и,
 - 2. полинуклеотид, кодирующий терапевтический полипептид или терапевтический полинуклеотид.

[000249] Множество индуцируемых систем экспрессии генов обеспечивают экспрессию данного терапевтического полинуклеотида или терапевтического полипептида в условиях, связанных с различными заболеваниями, расстройствами или патологическими состояниями, или экспрессию множества терапевтических полипептидов или терапевтических полинуклеотидов либо в тех же условиях, связанных с тем же заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, или в отличных условиях,

отличных от условий, связанных с отличными заболеваниями, расстройствами или патологическими состояниями.

[000250] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения, комбинация двух или более систем генных переключателей может представлять собой (1) систему 5 экспрессии генов, основанную на двойном переключателе рецептора экдизона, и (2) генный переключатель, основанный на одинарном переключателе рецептора экдизона. В других вариантах реализации настоящего изобретения, указанная комбинация может представлять собой (1) генный переключатель, основанный на одинарном или двойном 10 переключателе рецептора экдизона, и (2) генный переключатель, основанный на рапамицине. В качестве альтернативы, комбинация систем генных переключателей может представлять собой две идентичные системы генных переключателей, основанные на рапамицине, как описано выше. Любые возможные комбинации систем генных переключателей входят в объем настоящего изобретения.

Лиганды

[000251] В данной заявке термин "лиганд", применительно к основанным на LDTFC 15 генным переключателям, например, основанным на EcD-комплексе генным переключателям, описывает малые и растворимые молекулы, обладающие способностью активировать генный переключатель, чтобы стимулировать экспрессию полипептида. Лиганд для комплекса лиганд-зависимого фактора транскрипции согласно настоящему 20 изобретению связывается с белковым комплексом, содержащим один или более лигандсвязывающих доменов, домен партнера по гетеродимеризации, связывающий ДНК домен и домен трансактивации. Выбор лиганда для активации комплекса лиганд-зависимого фактора транскрипции зависит от типа используемого генного переключателя.

[000252] Примеры лигандов включают экдистероид, такой как экдизон, 20-гидроксиэкдизон, понастерон А, муристерон А и тому подобные, 9-цис-ретиноевую кислоту, синтетические аналоги ретиноевой кислоты, N,N'-диацилгидразины, такие как описанные в патентах США с номерами 6,013,836; 5,117,057; 5,530,028 и 5,378,726 и публикациях патентных заявок США с номерами 2005/0209283 и 2006/0020146;

оксациазолины, описанные в опубликованной патентной заявке США номер 2004/ 30 0171651; дифензоилалкилциангидразины, такие как описанные в европейской заявке номер 461,809; N-алкил-N,N'-диароилгидразины, такие как описанные в патенте США номер 5,225,443; N-ацил-N-алкилкарбонилгидразины, такие как описанные в европейской заявке номер 234,994; N-ароил-N-алкил-N'-ароилгидразины, такие как описанные в

патенте США номер 4,985,461; амидокетоны, такие как описанные в опубликованной заявке на патент США номер 2004/0049037; каждая из которых включена в настоящее описание посредством ссылки, и в других аналогичных материалах, включая 3,5-дитрет-бутил-4-гидрокси-N-изобутилбензамид, 8-O-ацетилгарпагид, оксистерины, 22(R)-гидроксихолестерин, 24(S)-гидроксихолестерин, 25-эпоксихолестерин, T0901317, 5-

альфа-6-альфа-эпоксихолестерин-3-сульфат (ECHS), 7-кетохолестерин-3-сульфат, фамезол, желчные кислоты, 1,1-бифосфонатные эфиры, ювенильный гормон III и тому подобные, но не ограничиваются ими. Примеры диацилгидразиновых лигандов, пригодных в настоящем изобретении, включают RG-115819 (3,5-диметилбензойной кислоты N-(1-этил-2,2-диметилпропил)-N'-(2-метил-3-метоксибензоил)гидразид), RG-

115932 ((R)-3,5-диметилбензойной кислоты N-(1-трет-бутилбутил)-N'-(2-этил-3-метоксибензоил)гидразид) и RG-115830 (3,5-диметилбензойной кислоты N-(1-трет-бутилбутил)-N'-(2-этил-3-метоксибензоил)гидразид). См., например, заявку на патент США, серийный номер 12/155,111, и заявку PCT номер PCT/US2008/006757, обе из

которых полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

[000253] Например, лиганд для основанного на рецепторе эcdизона генного переключателя можно выбрать из любых подходящих лигандов. в качестве лиганда для генного переключателя согласно настоящему изобретению можно применять как

5 встречающийся в природе эcdизон или аналоги эcdизона (например, 20-гидроксиэcdизон, муристерон А, понастерон А, понастерон В, понастерон С, 26-иодонастерон А, инокостерон или 26-мезилинокостерон), так и нестериоидные индукторы. В патенте США номер 6,379,945 B1 описан стероидный рецептор насекомого, выделенный из *Heliothis virescens* ("HEcR"), который способен действовать как генный переключатель,

10 отвечающий как на стероидные, так и на некоторые нестериоидные индукторы.

Нестериоидные индукторы имеют особое преимущество над стероидными, в этой и множестве других систем, которые отвечают как на стероидные, так и на нестериоидные индукторы, по многим причинам, включая, например: более низкую стоимость

изготовления, метаболическую стабильность, отсутствие у насекомых, растений или

15 млекопитающих и приемлемость для окружающей среды. В патенте США номер 6,379,945 B1 описано применение двух дibenзоилгидразинов, 1,2-дibenзоил-1-трет-бутилгидразина и тебуфенозида (N-(4-этилбензоил)-N'-(3,5-диметилбензоил)-N'-трет-бутилгидразина), в качестве лигандов для основанного на эcdизоне генного

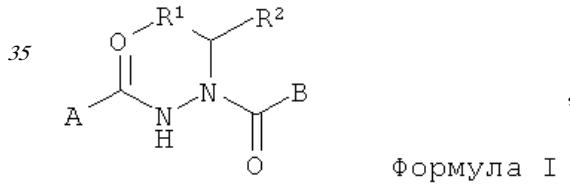
20 переключателя. Также включены в настоящее изобретение в качестве лигандов другие

дibenзоилгидразины, такие как описанные в патенте США номер 5,117,057 B1. Применение тебуфенозида в качестве химического лиганда для рецептора эcdизона из *Drosophila melanogaster* также описано в патенте США номер 6,147,282. Дополнительные

неограничивающие примеры эcdизоновых лигандов представляют собой 3,5-ди-трет-

бутил-4-гидрокси-N-изобутилбензамид, 8-O-ацетилгарпагид, 1,2-диацилгидразин, N'-
25 замещенный-N,N'-двузамещенный гидразин, дibenзоилалкилциангидразин, N-
замещенный-N-алкил-N,N-диароилгидразин, N-замещенный-N-ацил-N-
алкилкарбонилгидразин или N-ароил-N'-алкил-N'-ароилгидразин (см. патент США
номер 6,723,531).

[000254] В одном варианте реализации настоящего изобретения, лиганд для системы генного переключателя, основанной на эcdизоне, представляет собой диацилгидразиновый лиганд или хиральный диацилгидразиновый лиганд. Лицанд, используемый в системе генного переключателя, может представлять собой соединения формулы I



где

40 А представляет собой алcoxил, арилалкилоксил или арилоксил;

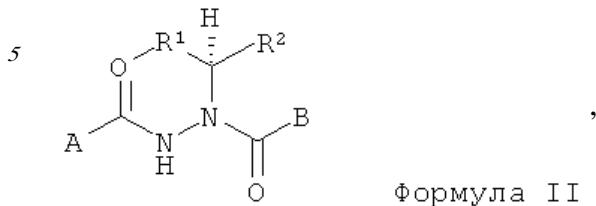
В представляет собой возможно содержащий заместители арил или возможно содержащий заместители гетероарил; и

45 R¹ и R² независимо представляют собой возможно содержащий заместители алкил, арилалкил, гидроксиалкил, галоалкил, возможно содержащий заместители циклоалкил, возможно содержащий заместители алкенил, возможно содержащий заместители алкинил, возможно содержащий заместители гетероцикл, возможно содержащий заместители арил или возможно содержащий заместители гетероарил;

или фармацевтически приемлемые соли, гидраты, кристаллические формы или

аморфные формы указанных соединений.

[000255] В другом варианте реализации настоящего изобретения, лиганд может представлять собой энантиомерно обогащенные соединения формулы II



10 где

А представляет собой алcoxил, арилалкилоксил, арилоксил, арилалкил, возможно содержащий заместители арил или возможно содержащий заместители гетероарил;

В представляет собой возможно содержащий заместители арил или возможно содержащий заместители гетероарил; и

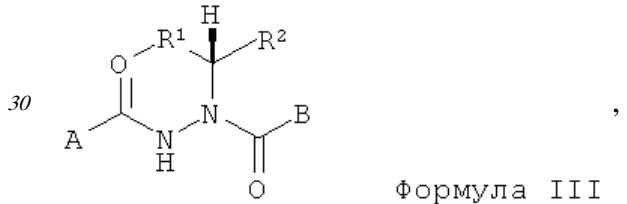
15 R^1 и R^2 независимо представляют собой возможно содержащий заместители алкил, арилалкил, гидроксиалкил, галоалкил, возможно содержащий заместители циклоалкил, возможно содержащий заместители алкенил, возможно содержащий заместители алкинил, возможно содержащий заместители гетероцикл, возможно содержащий заместители арил или возможно содержащий заместители гетероарил;

20 при условии, что R^1 не идентичен R^2 ;

при этом абсолютная конфигурация при асимметрическом атоме углерода, несущем R^1 и R^2 ; представляет собой преимущественно S;

или фармацевтически приемлемые соли, гидраты, кристаллические формы или аморфные формы указанных соединений.

25 [000256] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения, лиганд может представлять собой энантиомерно обогащенные соединения формулы III



где

35 А представляет собой алcoxил, арилалкилоксил, арилоксил, арилалкил, возможно содержащий заместители арил или возможно содержащий заместители гетероарил;

В представляет собой возможно содержащий заместители арил или возможно содержащий заместители гетероарил; и

40 R^1 и R^2 независимо представляют собой возможно содержащий заместители алкил, арилалкил, гидроксиалкил, галоалкил, возможно содержащий заместители циклоалкил, возможно содержащий заместители алкенил, возможно содержащий заместители алкинил, возможно содержащий заместители гетероцикл, возможно содержащий заместители арил или возможно содержащий заместители гетероарил;

при условии, что R^1 не идентичен R^2 ;

45 при этом абсолютная конфигурация при асимметрическом атоме углерода, несущем R^1 и R^2 , представляет собой преимущественно R;

или фармацевтически приемлемые соли, гидраты, кристаллические формы или аморфные формы указанных соединений.

[000257] В одном варианте реализации настоящего изобретения, лиганд может представлять собой (R)-3,5-диметилбензойной кислоты N-(1-трет-бутилбутил)-N'-(2-этил-3-метоксибензоил)-гидразид, с энантиомерным избыtkом, равным по меньшей мере 95%, или фармацевтически приемлемую соль, гидрат, кристаллическую форму или аморфную форму указанного соединения.

[000258] Диацилгидразиновые лиганды формулы I и хиральные диацилгидразиновые лиганды формулы II или III, когда они используются в основанной на эндоизоне системе генного переключателя, обеспечивают средства для временной регуляции извне экспрессии терапевтического полипептида или терапевтического полинуклеотида согласно настоящему изобретению. См. заявку на патент США номер 12/155,111, поданную 29 мая, 2008 г., которая полностью включена в настоящее описание посредством ссылки.

[000259] Лиганды, используемые в настоящем изобретении, могут образовывать соли. Термин "соль(и)" в данной заявке обозначает кислые и/или основные соли, образованные с неорганическими и/или органическими кислотами и основаниями. Вдобавок, когда соединение формулы I, II или III содержит как основную молекулу, так и кислую молекулу, могут образоваться цвиттерионы ("внутренние соли"), и они также включены в объем термина "соль(и)" в настоящем описании. Используются фармацевтически приемлемые (т.е., нетоксичные, физиологически приемлемые) соли, хотя другие соли также могут быть пригодны, например, на этапах выделения или очистки при получении соединений. Соли соединений формулы I, II или III можно получить, например, путем приведения во взаимодействие соединения с некоторым количеством кислоты или основания, таким как эквивалентное количество, в среде, такой как среда, в которой соль выпадает в осадок, или в водной среде, а затем лиофилизации.

[000260] Лиганды, которые содержат основную молекулу, могут образовывать соли с целым рядом органических и неорганических кислот. Типичные соли присоединения кислоты включают ацетаты (такие как образованные с уксусной кислотой или триглюкокусной кислотой, например, трифтруккусной кислотой), адипаты, альгинаты, аскорбаты, аспартаты, бензоаты, бензосульфонаты, бисульфаты, бораты, бутираты, цитраты, камфораты, камфорсульфонаты, циклопентанпропионаты, диглюконаты, додецилсульфаты, этансульфонаты, фумараты, глюкогентаноаты, глицерофосфаты, гемисульфаты, гептаноаты, гексаноаты, гидрохлориды (образованные с соляной кислотой), гидробромиды (образованные с бромистым водородом), гидройодиды, 2-гидроксизетансульфонаты, лактаты, малеаты (образованные с малеиновой кислотой), метансульфонаты (образованные с метансульфоновой кислотой), 2-нафтилинсульфонаты, никотинаты, нитраты, оксалаты, пектинаты, персульфаты, 3-фенилпропионаты, фосфаты, пикраты, пивалаты, пропионаты, салицилаты, сукцинаты, сульфаты (такие как образованные с серной кислотой), сульфонаты (такие как упомянутые в настоящем описании), тартраты, тиоцианаты, толуолсульфонаты, такие как тозилаты, ундеканоаты и тому подобные.

[000261] Лиганды, которые содержат кислую молекулу, могут образовывать соли с целым рядом органических и неорганических оснований. Типичные основные соли включают соли аммония, соли щелочных металлов, такие как соли натрия, лития и калия, соли щелочно-земельных металлов, такие как соли кальция и магния, соли с органическими основаниями (например, органическими аминами), такие как бензатины, дициклогексиламины, гидрабамины (образованные с N,N-бис(дегидроабиетил) этилендиамином), N-метил-D-глюкаминами, N-метил-D-глюкомидами, трет-

бутиламинами, и соли с аминокислотами, такими как аргинин, лизин и тому подобные.

[000262] Неограничивающие примеры лигандов для индуцируемой системы экспрессии генов, в которой используется связывающий FK506 домен, представляют собой FK506, циклоспорин А или рапамицин. FK506, рапамицин и их аналоги описаны в патентах 5 США с номерами 6,649,595 B2 и 6,187,757. См. также патенты США с номерами 7,276,498 и 7,273,874.

[000263] Лиганды, описанные в данной заявке, можно вводить отдельно или в составе фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель. В одном варианте реализации настоящего изобретения, фармацевтическая композиция 10 находится в виде растворов, суспензий, таблеток, капсул, мазей, эликсиров или инъецируемых композиций.

[000264] Термин "основанный на рецепторе экдизона", применительно к генному переключателю, относится к генному переключателю, содержащему по меньшей мере функциональную часть встречающегося в природе или синтетического

15 лигандсвязывающего домена рецептора экдизона, который регулирует экспрессию гена в ответ на лиганд, который связывается с лигандсвязывающим доменом рецептора экдизона. Примеры чувствительных к экдизону систем описаны в патентах США с номерами 7,091,038 и 6,258,603. В одном варианте реализации настоящего изобретения, указанная система представляет собой терапевтическую систему RheoSwitch® (RTS), 20 которая содержит два сплитых белка, домены DEF мутагенизированного рецептора экдизона (EcR), сплитые со связывающим ДНК доменом Gal4, и домены EF химерного RXR, сплитые с доменом активации транскрипции VP16, экспрессируемых под контролем конститутивного промотора, показанного на ФИГ.1.

[000265] Термины "модулируют" и "модулирует" означают индуцирование, 25 уменьшение или ингибирование экспрессии нуклеиновой кислоты или гена, что приводит к соответствующей индукции, уменьшению или ингибированию продукции белка или полипептида.

[000266] Полинуклеотиды или векторы согласно настоящему изобретению могут дополнительно содержать по меньшей мере один промотор, подходящий для запуска 30 экспрессии гена в клетке-хозяине.

[000267] Энхансеры, которые можно применять в вариантах реализации настоящего изобретения, включают энхансер SV40, энхансер цитомегаловируса (CMV), энхансер фактора элонгации 1 (EF1), дрожжевые энхансеры, энхансеры вирусных генов и тому подобные, но не ограничиваются ими.

35 [000268] Регуляторные области терминации, т.е., терминатор или последовательности полиаденилирования, также можно получить из различных генов, нативных для предпочтительных хозяев. Возможно, сайт терминации может не быть необходимым, тем не менее, наиболее предпочтительно, если он включен. В одном варианте реализации настоящего изобретения, регуляторная область терминации может состоять или быть 40 получена из синтетической последовательности, синтетического сигнала полиаденилирования, сигнала полиаденилирования позднего SV40, сигнала полиаденилирования SV40, бычьего гормона роста (BGH) сигнала полиаденилирования, последовательностей вирусных терминаторов или тому подобных.

[000269] Термины "3'-некодирующие последовательности" или "3'-нетранслируемая 45 область (НТО)" относятся к последовательностям ДНК, расположенным по ходу транскрипции (3') от кодирующей последовательности, и могут содержать последовательности узнавания полиаденилирования [поли(A)] и другие последовательности, кодирующие регуляторные сигналы, способные влиять на

процессинг мРНК или экспрессию гена. Сигнал полиаденилирования обычно характеризуется влиянием на добавление участков полиадениловых кислот к 3'-концу предшественника мРНК.

[000270] "Регуляторная область" относится к последовательности нуклеиновых кислот, которая регулирует экспрессию второй последовательности нуклеиновых кислот. Регуляторная область может включать последовательности, которые в природе отвечают за экспрессию определенной нуклеиновой кислоты (гомологичная область), или может включать последовательности различного происхождения, которые отвечают за экспрессию различных белков или даже синтетических белков (гетерологичная область). В частности, указанные последовательности могут представлять собой последовательности прокариотических, эукариотических или вирусных генов, или производные последовательности, которые стимулируют или подавляют транскрипцию гена специфичным или неспецифичным образом и индуцируемым или неиндуцируемым образом. Регуляторные области включают точки начала репликации, сайты сплайсинга РНК, промоторы, энхансеры, последовательности терминации транскрипции и сигнальные последовательности, которые направляют полипептид в секреторные пути целевой клетки.

[000271] Регуляторная область из "гетерологичного источника" относится к регуляторной области, которая в природе не связана с экспрессируемой нуклеиновой кислотой. Среди всех гетерологичных регуляторных областей включены регуляторные области из различных видов, регуляторные области из различных генов, гибридные регуляторные последовательности и регуляторные последовательности, которые не встречаются в природе, но которые разработаны средним специалистом в данной области.

[000272] "РНК-транскрипт" относится к продукту, возникшему в результате катализируемой РНК-полимеразой транскрипции последовательности ДНК. Когда РНК-транскрипт представляет собой идеально комплементарную копию последовательности ДНК, его называют первичным транскриптом, или он может представлять собой последовательность РНК, полученную в результате посттранскриptionного процессинга первичного транскрипта, и называется зреющей РНК. "Информационная РНК (мРНК)" относится к РНК, которая не содержит инtronов и которая может транслироваться в белок в клетке. "кДНК" относится к двунитевой ДНК, которую получают из мРНК и которая комплементарна ей. "Смысловая" РНК относится к РНК-транскрипту, который содержит мРНК и, таким образом, может транслироваться в белок в клетке. "Антисмыловая РНК" относится к РНК-транскрипту, который комплементарен всему или части целевого первичного транскрипта или мРНК, и который блокирует экспрессию целевого гена. Комплементарность антисмысловой РНК может быть на любом участке определенного транскрипта гена, т.е., на 5'-некодирующей последовательности, 3'-некодирующей последовательности или кодирующей последовательности. "Функциональная РНК" относится к антисмысловой РНК, РНК рибозима или другой РНК, которая не транслируется, но все же оказывает влияние на клеточные процессы.

[000273] Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используют взаимозаменяемо, и они относятся к полимерному соединению, состоящему из ковалентно связанных остатков аминокислот.

[000274] Термины "изолированный полипептид", "изолированный пептид" или "изолированный белок" относятся к полипептиду или белку, который по существу свободен таких соединений, которые обычно с ним связаны в естественном состоянии

(например, других белков или полипептидов, нуклеиновых кислот, углеводов, липидов). Термин "изолированный" не подразумевают исключающим искусственные или синтетические смеси с другими соединениями или присутствие примесей, которые не препятствуют его биологической активности и которые могут присутствовать, например, вследствие неполной очистки, добавления стабилизаторов или включения в состав фармацевтически приемлемого состава.

[000275] Термины "мутантный полипептид с заменой" или "мутант с заменой" должны пониматься означающими мутантный полипептид, содержащий замену по меньшей мере одной аминокислоты полипептида дикого типа или встречающегося в природе полипептида на аминокислоту, отличную от аминокислоты полипептида дикого типа или встречающегося в природе полипептида. Мутантный полипептид с заменой может содержать только одну замену аминокислоты полипептида дикого типа или встречающегося в природе полипептида и может называться "точечным мутантным" или "одноточечным мутантным" полипептидом. В качестве альтернативы, мутантный полипептид с заменой может включать замену двух или более аминокислот полипептида дикого типа или встречающегося в природе полипептида на две или более аминокислоты, отличные от аминокислот полипептида дикого типа или встречающегося в природе полипептида. Согласно настоящему изобретению, полипептид лигандсвязывающего домена ядерного рецептора группы Н, содержащий мутацию с заменой, содержит замену по меньшей мере одной аминокислоты полипептида дикого типа или встречающегося в природе полипептида на аминокислоту, отличную от аминокислоты полипептида дикого типа или встречающегося в природе полипептида лигандсвязывающего домена ядерного рецептора группы Н.

[000276] Когда мутантный полипептид с заменой содержит замену двух или более аминокислот полипептида дикого типа или встречающегося в природе полипептида, такая замена может включать либо удаление эквивалентного количества аминокислот полипептида дикого типа или встречающегося в природе полипептида, т.е., 2 аминокислоты полипептида дикого типа или встречающегося в природе полипептида замещают на 2 аминокислоты полипептида не дикого типа или не встречающегося в природе полипептида, либо удаление неэквивалентного количества аминокислот полипептида дикого типа, т.е., 2 аминокислоты полипептида дикого типа замещают на аминокислоту 1 полипептида не дикого типа (мутация замены + делеции), или 2 аминокислоты полипептида дикого типа замещают на 3 аминокислоты полипептида не дикого типа (мутация замены + вставки).

[000277] Мутанты с заменой могут быть описаны с применением системы сокращенной номенклатуры, чтобы указать аминокислотный остаток и количество аминокислот, замещенных в исходной полипептидной последовательности, и новый остаток аминокислоты, на который произвели замену. Например, мутант с заменой, в котором двадцатый (20^{ый}) остаток аминокислоты полипептида замещен, можно сокращенно называть "x20z", где "x" представляет собой аминокислоту, которую замещают, "20" представляет собой положение остатка аминокислоты или ее номер в полипептиде и "z" представляет собой новую аминокислоту, на которую замещают. Следовательно, сокращенное взаимозаменяемое название мутанта с заменой "E20A" или "Glu20Ala" указывает на то, что данный мутант содержит остаток аланина (обычно сокращенно называемый в данной области "A" или "Ala") на месте глютаминовой кислоты (обычно сокращенно называемой в данной области "E" или "Glu") в положении 20 полипептида.

[000278] Мутацию с заменой можно осуществить с помощью любого способа

мутагенеза, известного в данной области, включая, но не ограничиваясь перечисленными, сайт-направленный мутагенез *in vitro* (Hutchinson и др., *J. Biol. Chem.* 253: 6551 (1978); Zoller и др., *DNA* 3-A79 (1984); Oliphant и др., *Gene* 44: 177 (1986);

⁵ Hutchinson и др., *Proc. Natl. Acad. Set. USA* 83: 710 (1986)), применение линкеров TAB[®] (Pharmacia), расщепление эндонуклеазами рестрикции/удаление и замену фрагмента, опосредованный ПЦР/олигонуклеотид-направленный мутагенез и тому подобные. Основанные на ПЦР методики являются предпочтительными для сайт-направленного мутагенеза (см. Higuchi, 1989, "Using PCR to Engineer DNA", в *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, H.Erich, ред., Stockton Press, глава 6, стр.61-70).

¹⁰ [000279] Термин "фрагмент", применительно к полипептиду, относится к полипептиду, последовательность аминокислот которого короче, чем таковая у исходного полипептида, и который имеет идентичную данному исходному полипептиду последовательность аминокислот на всем протяжении фрагмента. Такие фрагменты, когда это уместно, могут быть включены в больший полипептид, частью которого они являются. Такие фрагменты полипептида согласно настоящему изобретению могут иметь длину, равную по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 25, 26, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 200, 240 или 300 или более аминокислот.

²⁰ [000280] "Вариант" полипептида или белка относится к любому аналогу, фрагменту, производному или мутанту, который получают из полипептида или белка и который сохраняет по меньшей мере одно биологическое свойство указанного полипептида или белка. В природе могут существовать различные варианты полипептида или белка. Данные варианты могут представлять собой аллельные варианты, характеризуемые различиями в последовательностях нуклеотидов структурного гена, кодирующего белок, или могут включать альтернативный сплайсинг или посттрансляционные ²⁵ модификации. Квалифицированный специалист может получить варианты, содержащие одну или множество замен, делеций, вставок или перестановок аминокислот. Данные варианты могут включать, среди прочего: (а) варианты, в которых один или более остатков аминокислот замещены на консервативные или неконсервативные аминокислоты, (б) варианты, в которых одна или более аминокислот добавлены в ³⁰ полипептид или белок, (с) варианты, в которых одна или более аминокислот содержит замещающую группу, и (д) варианты, в которых полипептид или белок слит с другим полипептидом, таким как сывороточный альбумин. Методики получения данных вариантов, включая генетические (супрессии, делеции, мутации и т.д.), химические и ферментативные методики, известны среднему специалисту в данной области. В одном варианте реализации настоящего изобретения, вариантный полипептид содержит по ³⁵ меньшей мере приблизительно 14 аминокислот.

[000281] Термин "гомология" относится к проценту идентичности между двумя молекулами полинуклеотида или двумя молекулами полипептида. Сходство между последовательностью одной молекулы и другой можно определить с помощью способов, известных в данной области. Например, гомологию можно определить путем непосредственного сравнения информации о последовательности между двумя полипептидными молекулами путем выравнивания информации о последовательности и применения легко доступных компьютерных программ. В качестве альтернативы, гомологию можно определить путем гибридизации полинуклеотидов при условиях, в которых образуются стабильные дуплексы между гомологичными участками, а затем расщепления нуклеазой(ами), специфичной для одной нити, и определения размеров расщепленных фрагментов.

[000282] В данной заявке термин "гомологичный" во всех его грамматических формах

и орфографических разновидностях относится к родству между белками, которые имеют "общее эволюционное происхождение", включая белки из суперсемейств (например, суперсемейства иммуноглобулинов) и гомологичные белки из различных видов (например, легкая цепь миозина и т.д.) (Reeck и др., Cell 50: 667 (1987)). Такие 5 белки (и кодирующие их гены) имеют гомологичные последовательности, что отражает высокая степень подобия их последовательностей. Тем не менее, при обычном применении и в настоящей заявке, термин "гомологичный", когда к нему добавлено наречие, такое как "высоко", может относиться к подобию последовательностей, а не к общему эволюционному происхождению.

10 [000283] Соответственно, термин "подобие последовательностей" во всех его грамматических формах относится к степени идентичности или сходства между последовательностями нуклеиновых кислот или аминокислотными последовательностями белков, которые могут иметь или не иметь общее эволюционное 15 происхождение (см. Reeck и др., Cell 50: 667 (1987)). В одном варианте реализации, две последовательности ДНК являются "по существу гомологичными" или "по существу подобными", когда по меньшей мере приблизительно 50% (например, по меньшей мере приблизительно 75%, 90% или 95%) нуклеотидов совпадают на определенном участке 20 последовательностей ДНК. Последовательности, которые являются по существу гомологичными, можно идентифицировать путем сравнения последовательностей, применяя стандартное программное обеспечение, доступное в базах данных 25 последовательностей, или с помощью эксперимента по гибридизации по Саузерну, например, в жестких условиях, определенных для данной конкретной системы. Определение подходящих условий гибридизации находится в рамках компетенции в данной области (см., например, Sambrook и др., 1989, выше).

25 [000284] В данной заявке термин "по существу подобные" относится к фрагментам нуклеиновых кислот, в которых изменение одного или нескольких нуклеотидных оснований приводит к замене одной или нескольких аминокислот, но не влияет на функциональные свойства белка, кодируемого последовательностью ДНК. "По существу подобные" также относится к фрагментам нуклеиновых кислот, в которых изменения 30 одного или нескольких нуклеотидных оснований не влияет на способность фрагмента нуклеиновой кислоты опосредовать изменение экспрессии гена с помощью антисмыслового или косупрессорного способа. "По существу подобные" также относится к модификациям фрагментов нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению, таким как делеция или вставка одного или нескольких нуклеотидных 35 оснований, которые по существу не влияют на функциональные свойства полученного транскрипта. Следовательно, должно быть очевидно, что в объем настоящего изобретения входит больше последовательностей, чем определенные последовательности, указанные в примерах. Каждая из предложенных модификаций входит в рамки обычных навыков в данной области, также как и определение сохранения 40 биологической активности кодируемых продуктов.

45 [000285] Более того, для квалифицированного специалиста должно быть очевидно, что по существу подобные последовательности, входящие в объем настоящего изобретения, также определяют по их способности гибридизоваться в жестких условиях (0.1X SSC, 0.1% ДСН, 65°C и промывке 2X SSC, 0.1% ДСН, а затем 0.1X SSC, 0.1% ДСН) с последовательностями, приведенными в качестве примера в данной заявке. По существу подобные фрагменты нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению представляют собой такие фрагменты нуклеиновых кислот, последовательности ДНК которых по меньшей мере приблизительно на 70%, 80%, 90% или 95% идентичны

последовательности ДНК фрагментов нуклеиновых кислот, описанных в данной заявке.

[000286] Две последовательности аминокислот являются "по существу гомологичными" или "по существу подобными", когда более чем приблизительно 40% аминокислот идентичны, или более чем 60% аминокислот подобны (функционально

5 идентичны). Предпочтительно, подобные или гомологичные последовательности идентифицируют путем выравнивания, применяя, например, пакет программ GCG (Genetics Computer Group, руководство по работе с программой пакета GCG, версия 7, Мэдисон, Висконсин).

[000287] Термин "соответствующий" в данной заявке относится к подобным или 10 гомологичным последовательностям, в которых точное положение идентично или отлично от молекулы, подобие или гомологию с которой измеряют. При выравнивании последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислот могут быть промежутки. Таким образом, термин "соответствующий" относится к подобию последовательностей, но не к нумерации остатков аминокислот или нуклеотидных оснований.

15 [000288]. Термин "существенная часть" последовательности аминокислот или нуклеотидов содержит достаточный участок последовательности аминокислот полипептида или последовательности нуклеотидов гена, чтобы предположительно идентифицировать этот полипептид или ген, либо путем оценки последовательности вручную специалистом в данной области, либо путем автоматизированного

20 компьютерного сравнения последовательностей и идентификации с применением алгоритмов, таких как BLAST (основное средство поиска, основанное на локальных выравниваниях; Altschul и др., J. Mol. Biol. 275: 403 (1993)); доступное по ссылке ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Обычно, необходима последовательность из десяти или более непрерывных аминокислот или из тридцати или более нуклеотидов, чтобы

25 предположительно идентифицировать полипептид или последовательность нуклеиновых кислот как гомологичную известному белку или гену. Более того, применительно к последовательностям нуклеотидов, можно использовать специфичные для гена олигонуклеотидные зонды, содержащие 20-30 непрерывных нуклеотидов, в зависимых от последовательности способах идентификации (например, гибридизации по Саузерну)

30 и выделения генов (например, гибридизации *in situ* бактериальных колоний или бактериофаговых бляшек). Вдобавок, короткие олигонуклеотиды, состоящие из 12-15 оснований, можно применять в качестве праймеров для амплификации с помощью ПЦР, чтобы получить определенный фрагмент нуклеиновой кислоты, содержащий праймеры. Соответственно, "существенная часть" последовательности нуклеотидов

35 содержит достаточный участок последовательности, чтобы специфично идентифицировать и/или выделить фрагмент нуклеиновой кислоты, включающий указанную последовательность.

[000289] Термин "процент идентичности", известный в данной области, обозначает родство между двумя или более полипептидными последовательностями или двумя 40 или более полинуклеотидными последовательностями, что определяют путем сравнения последовательностей. В данной области термин "идентичность" также означает степень родства последовательностей между полипептидными или полинуклеотидными последовательностями, в зависимости от конкретного случая, что определяют по совпадению между цепочками таких последовательностей. "Идентичность" и "подобие" 45 можно легко рассчитать с помощью известных способов, включая способы, описанные в: Computational Molecular Biology (Lesk, A.M., изд.) Oxford University Press, Нью-Йорк (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Smith, D.W., ред.) Academic Press, Нью-Йорк (1993); Computer Analysis of Sequence Data, часть I (Griffin, A.M., и Griffin,

Н.Г., ред.) Human Press, Нью-Джерси (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology (von Heinje, G., ред.) Academic Press (1987) и Sequence Analysis Primer (Gribskov, M. и Devereux, J., ред.) Stockton Press, Нью-Йорк (1991), но не ограничиваясь ими. Предпочтительные способы определения идентичности разработаны таким образом, чтобы можно было

5 получить наилучшее совпадение между тестируемыми последовательностями. Способы определения идентичности и подобия запрограммированы в общедоступных компьютерных программах. Выравнивания последовательностей и вычисление процента идентичности можно осуществить, применяя программное обеспечение для анализа последовательностей, такое как программа Megalign биоинформатического

10 вычислительного комплекса LASERGENE (DNASTAR Inc., Мэдисон, Висконсин).

Выравнивание множества последовательностей можно осуществить, применяя способ выравнивания Clustal (Higgins и др., CABIOS. 5: 151 (1989)) с параметрами по умолчанию (штраф за открытие гэпа = 10, штраф за продление гэпа = 10). Можно выбрать следующие параметры по умолчанию для попарного выравнивания с помощью способа

15 Clustal: размер идентичного участка (KTUPLE) 1, штраф за открытие гэпа = 3, за окно = 5 и за сохраненные диагонали = 5.

[000290] Термин "программное обеспечение для анализа последовательностей" относится к любому компьютерному алгоритму или программному обеспечению, которое полезно для анализа последовательностей нуклеотидов или

20 аминокислот. "Программное обеспечение для анализа последовательностей" может быть доступно для приобретения или разработано независимо. Обычное программное обеспечение для анализа последовательностей включает, но не ограничено, пакет программ GCG (Wisconsin Package, версия 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Мэдисон, Висконсин), BLASTP, BLASTN, BLASTX (Altschul и др., J. Mol. Biol. 215: 403 (1990)) и

25 DNASTAR (DNASTAR, Inc. 1228 S. Park St., Мэдисон, Висконсин 53715, США). В контексте настоящей заявки должно быть очевидно, что когда для анализа применяется программное обеспечение для анализа последовательностей, результаты анализа будут основаны на "значениях по умолчанию" упомянутой программы, если не указано иначе. В данной заявке "значения по умолчанию" будут означать любой набор значений или

30 параметров, который исходно загружается с программным обеспечением, когда оно впервые устанавливается.

[000291] "Химически синтезированный", по отношению к последовательности ДНК, означает, что составляющие ее нуклеотиды были собраны *in vitro*. Можно осуществить химический синтез ДНК вручную, применяя надежные процедуры, или можно

35 осуществить автоматизированный химический синтез, применяя одно из множества доступных для приобретения устройств. Соответственно, гены можно приспособить для оптимальной экспрессии исходя из оптимизации последовательности нуклеотидов, чтобы она отражала предпочтение кодонов клеткой-хозяином. Для квалифицированного специалиста очевидно, что экспрессия гена будет более успешной, если использование

40 кодонов ориентировано на те кодоны, которые предпочитает хозяин. Определение предпочтительных кодонов может быть основано на исследовании генов, полученных из клетки-хозяина, о последовательности которых есть сведения.

[000292] В данной заявке, две или более отдельно функционирующие системы регуляции генов называют "независимыми", когда: а) модуляция каждой из данных

45 систем соответствующим лигандом, при выбранной концентрации, приводит к измеримому изменению интенсивности экспрессии гена с этой системы, и б) указанное изменение статистически значимо отличается от изменения экспрессии всех других систем, одновременно функционирующих в клетке, ткани или организме, независимо

от одновременности или последовательности фактической модуляции. Предпочтительно, модуляция каждой отдельно функционирующей системы регуляции гена влияет на изменение экспрессии этого гена по меньшей мере в 2 раза больше, чем на другие функционирующие системы в клетке, ткани или организме, например, по меньшей мере

- 5 в 5 раз, в 10 раз, в 100 раз или в 500 раз больше. В идеальной ситуации, модуляция каждой из данных систем соответствующим лигандом при выбранной концентрации приводит к измеримому изменению интенсивности экспрессии гена с данной системы, при этом не происходит измеримого изменения экспрессии всех других систем, функционирующих в клетке, ткани или организме. В таких случаях, множество
- 10 индуцируемых систем регуляции генов называют "полностью независимыми". Полезные независимые лиганды и независимые основанные на рецепторах системы экспрессии генов описаны в US 2002/0110861 A1.

[000293] Термин "экзогенный ген" означает ген, чужеродный для субъекта, то есть ген, который вводили в субъект с помощью процесса трансформирования,

- 15 немутированную версию эндогенного мутированного гена или мутированную версию эндогенного немутированного гена. Способ трансформирования не важен для настоящего изобретения и может представлять собой любой способ, известный специалистам в данной области, подходящий для субъекта. Экзогенные гены могут представлять собой либо природные, либо синтетические гены, которые вводят субъекту
- 20 в виде ДНК или РНК, которая может функционировать через ДНК-посредник, полученный, например, с помощью обратной транскриптазы. Такие гены можно вводить в целевые клетки, непосредственно вводить субъекта или вводить опосредованно путем переноса трансформированных клеток в субъекта.

[000294] Термин "терапевтический продукт" относится к терапевтическому

- 25 полипептиду или терапевтическому полинуклеотиду, который наделяет полезной функцией клетку-хозяина, в которой такой продукт экспрессируется. Терапевтические полипептиды могут включать, без ограничения, настолько малые пептиды, как имеющие длину три аминокислоты, одно- или многоцепочечные белки и слитые белки. Терапевтические полинуклеотиды могут включать, без ограничения, антисмысловые
- 30 олигонуклеотиды, малые интерферирующие РНК, рибозимы и внешние вспомогательные последовательности РНК. Терапевтический продукт может включать встречающуюся в природе последовательность, синтетическую последовательность или комбинацию природных и синтетических последовательностей.

[000295] Термин "комплекс лиганд-зависимого фактора транскрипции" или "LDTFC"

- 35 относится к фактору транскрипции, включающему одну или более белковых субединиц, комплекс которых может регулировать экспрессию гена, запускаемую с "регулируемого фактором промотора", что определено в настоящем описании. Модель LDTFC представляет собой "рецепторный комплекс экдизона", который, в общем смысле, относится к гетеродимерному белковому комплексу, содержащему по меньшей мере
- 40 два члена семейства ядерных рецепторов: рецептор экдизона ("EcR") и белок *ultraspiracle* ("USP") (см. Yao и др., *Nature* 3 66: 476 (1993)); Yao и др., *Cell* 71: 63 (1992)).

Функциональный LDTFC, такой как комплекс EcR, также может включать дополнительный белок (белки), такой как иммунофилин. Дополнительные члены семейства белков ядерных рецепторов, известные как транскрипционные факторы

45 (такие как DHR38, betaFTZ-1 или другие гомологи у насекомых), также могут быть лиганд зависимыми или независимыми партнерами для EcR и/или USP. LDTFC, такой как комплекс EcR, также может представлять собой гетеродимер белка EcR и гомолога у позвоночных белка *ultraspiracle*, белка X-рецептора ретиноевой кислоты ("RXR") или

химеры USP и RXR. Также в объем терминов "LDTFC" и "комплекс EcR" входят гомодимерные комплексы белка EcR или USP, а также отдельные полипептиды или тримеры, тетramerы и другие мультимеры, обладающие такой же функцией.

[000296] LDTFC, такой как комплекс EcR, можно активировать активным

- 5 экдистероидным или нестериоидным лигандом, который связывается с одним из белков комплекса, включая EcR, но не исключая другие белки комплекса. LDTFC, такой как комплекс EcR, содержит белки, которые представляют собой члены суперсемейства ядерных рецепторов, в котором все члены характеризуются присутствием одной или нескольких полипептидных субъединиц, включающих аминоконцевой домен
- 10 трансактивации ("AD", "TD" или "TA", используемые взаимозаменяемо в данной заявке), связывающий ДНК домен ("DBD") и лигандсвязывающий домен ("LBD"). AD может присутствовать в виде гибридного белка с "партнером по гетеродимеризации" или "HP". Гибридный белок, включающий AD и HP согласно настоящему изобретению, называется в данной заявке "коактиваторным белком" или "CAP". DBD и лигандсвязывающий
- 15 домен могут экспрессироваться в виде слитого белка, называемого в данной заявке "лиганд-индуцируемым фактором транскрипции" ("LTF"). Партнеры слияния можно разделить с помощью линкера, например, шарнирного участка. Некоторые члены семейства LTF также могут включать другой домен трансактивации на карбоксильном конце LBD. DBD характеризуется присутствием двух цистeinовых цинковых пальцев,
- 20 между которыми расположены два аминокислотных мотива, Р-бокс и D-бокс, которые придают специфичность к чувствительным к экдизону элементам. Данные домены могут быть нативными, модифицированными или химерами различных доменов гетерологичных рецепторных белков.

[000297] Последовательности ДНК, составляющие экзогенный ген, чувствительный

- 25 элемент и LDTFC, например, комплекс EcR, можно включить в архебактерии, прокариотические клетки, такие как *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* или другие энтеробактерии, или эукариотические клетки, такие как клетки растений или животных. Тем не менее, так как многие белки, экспрессируемые геном, подвергаются некорректному процессингу в бактериях, эукариотические клетки являются
- 30 предпочтительными. Клетки могут быть в виде отдельных клеток или в виде многоклеточных организмов. Последовательности нуклеотидов для экзогенного гена, чувствительного элемента и рецепторного комплекса также можно ввести в виде молекул РНК, предпочтительно в виде функциональных вирусных РНК, таких как вирус табачной мозаики. Из эукариотических клеток, клетки позвоночных являются
- 35 предпочтительными, так как в них обычно отсутствуют молекулы, которые придают EcR способность отвечать на лиганды согласно настоящему изобретению. В результате, они "по существу нечувствительны" к лигандам согласно настоящему изобретению. Таким образом, лиганды, полезные для настоящего изобретения, будут оказывать незначительное физиологическое или другое влияние на трансформированные клетки
- 40 или на весь организм. Следовательно, клетки могут расти и экспрессировать желательный продукт, при этом на них по существу не влияет присутствие самого лиганда.

[000298] Термин "рецепторный комплекс экдизона" в общем смысле относится к гетеродимерному белковому комплексу, содержащему по меньшей мере два элемента

- 45 из семейства ядерных рецепторов, рецептора экдизона ("EcR") и белков *ultraspiracle* ("USP") (см. Yao и др., *Nature* 366: 476 (1993)); Yao и др., *Cell* 71: 63 (1992)).
- Функциональный комплекс EcR также может содержать дополнительный белок (белки), такой как иммунофилин. Дополнительные члены семейства белков ядерных рецепторов,

известные как транскрипционные факторы (такие как DHR38, betaFTZ-1 или другие гомологи насекомых), также могут быть лиганд зависимыми или независимыми партнерами для EcR и/или USP. Комплекс EcR также может представлять собой гетеродимер белка EcR и гомолога у позвоночных белка ultraspiracle, белка X-рецептора 5 ретиноевой кислоты ("RXR") или химеры USP и RXR. Также в объем термина комплекс EcR входят гомодимерные комплексы белка EcR или USP.

[000299] Комплекс, EcR можно активировать активным эндистероидным или нестериоидным лигандом, который связывается с одним из белков комплекса, включая EcR, но не исключая другие белки комплекса. В данной заявке термин "лиганд",

10 применительно к основанным на EcR генным переключателям, описывает малые и растворимые молекулы, обладающие способностью активировать генный переключатель, чтобы стимулировать экспрессию полипептида, кодируемого им.

Примеры лигандов включают, без ограничения, эндистероид, такой как эндизон, 20-гидроксийендизон, понастерон А, муристерон А и тому подобные, 9-цис-ретиноевую

15 кислоту, синтетические аналоги ретиноевой кислоты, N,N'-диацилгидразины, такие как описанные в патентах США с номерами 6,013,836; 5,117,057; 5,530,028 и 5,378,726 и публикациях патентных заявок США с номерами 2005/0209283 и 2006/0020146; оксациазолины, описанные в опубликованной заявке на патент США номер 2004/0171651; дибензоилалкилциангидразины, такие как описанные в европейской заявке

20 номер 461,809; N-алкил-N,N'-диароилгидразины, такие как описанные в патенте США номер 5,225,443; N-ацил-N-алкилкарбонилгидразины, такие как описанные в европейской заявке патент номер 234,994; N-ароил-N-алкил-N'-ароилгидразины, такие как описанные в патенте США номер 4,985,461; амидокетоны, такие как описанные в опубликованной заявке на патент США номер 2004/0049037; и другие подобные материалы, включая

25 3,5-ди-трет-бутил-4-гидрокси-N-изобутилбензамид, 8-O-ацетилгарпагид, оксистерины, 22(R) гидроксихолестерин, 24(S)-гидроксихолестерин, 25-эпоксихолестерин, T0901317, 5-альфа-6-альфа-эпоксихолестерин-3-сульфат (ECHS), 7-кетохолестерин-3-сульфат, фамезол, желчные кислоты, 1,1-бифосфонатные эфиры, ювенильный гормон III и тому подобные. Примеры диацилгидразиновых лигандов, полезных для настоящего

30 изобретения, включают RG-115819 (3,5-диметилбензойной кислоты N-(1-этил-2,2-диметилпропил)-N'-(2-метил-3-метоксибензоил)-гидразид), RG-115932 ((R)-3,5-диметилбензойной кислоты N-(1-трет-бутилбутил)-N'-(2-этил-3-метоксибензоил)-гидразид) и RG-115 83 0 (3,5-диметилбензойной кислоты N-(1-трет-бутилбутил)-N'-(2-этил-3-метоксибензоил)-гидразид). См. заявку на патент США номер 12/155,111,

35 поданную 29 мая, 2008 г., и PCT/US2008/006757, поданную 29 мая, 2008 г., чтобы найти дополнительные диацилгидразины, которые полезны для осуществления настоящего изобретения.

[000300] Комплекс EcR содержит белки, которые представляют собой члены суперсемейства ядерных рецепторов, в котором все члены характеризуются присутствием

40 аминоконцевого домена трансактивации ("ТА"), связывающего ДНК домена ("DBD") и лигандсвязывающего домена ("LBD"), разделенных шарнирным участком. Некоторые члены указанного семейства также могут включать другой домен трансактивации на карбоксиконцевой стороне LBD. DBD характеризуется присутствием двух цистеиновых цинковых пальцев, между которыми расположены два аминокислотных мотива, Р-бокс 45 и D-бокс, которые придают специфичность к чувствительным к эндизону элементам. Данные домены могут быть нативными, модифицированными или химерами различных доменов гетерологичных рецепторных белков.

[000301] Последовательности ДНК, составляющие экзогенный ген, чувствительный

элемент и комплекс EcR, можно включить в архебактерии, прокариотические клетки, такие как *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* или другие энтеробактерии, или эукариотические клетки, такие как клетки растений или животных. Тем не менее, так как многие белки, экспрессируемые геном, подвергаются некорректному процессингу в бактериях,

5 эукариотические клетки являются предпочтительными. Клетки могут быть в виде отдельных клеток или в виде многоклеточных организмов. Последовательности нуклеотидов для экзогенного гена, чувствительного элемента и рецепторного комплекса также можно ввести в виде молекул РНК, предпочтительно в виде функциональных вирусных РНК, таких как вирус табачной мозаики. Из эукариотических клеток, клетки

10 позвоночных являются предпочтительными, так как в них обычно отсутствуют молекулы, которые придают EcR отвечаемость на лиганды согласно настоящему изобретению. В результате, они "по существу нечувствительны" к лигандам согласно настоящему изобретению. Таким образом, лиганды, полезные для настоящего изобретения, будут оказывать незначительное физиологическое или другое влияние на

15 трансформированные клетки или на весь организм. Следовательно, клетки могут расти и экспрессировать желательный продукт, при этом на них по существу не влияет присутствие самого лиганда.

[000302] Лиганды EcR, когда их используют совместно с комплексом EcR, который, в свою очередь, связан с чувствительным элементом, связанным с экзогенным геном 20 (например, IL-12), обеспечивают средства для внешней временной регуляции экспрессии экзогенного гена. Порядок, в котором различные компоненты связываются друг с другом, то есть, лиганд с рецепторным комплексом и рецепторный комплекс с чувствительным элементом, не важен. Обычно, модуляция экспрессии экзогенного гена происходит в ответ на связывание комплекса EcR со специфичным контролирующим, 25 или регуляторным, элементом ДНК. Белок EcR, как и другие члены семейства ядерных рецепторов, содержит по меньшей мере три домена: домен трансактивации, связывающий ДНК домен и лигандсвязывающий домен. Этот рецептор, как и подгруппа семейства ядерных рецепторов, также имеет менее четко определенные участки, ответственные за гетеродимеризационные свойства. Связывание лиганда с лигандсвязывающим 30 доменом белка EcR, после гетеродимеризации с белком USP или RXR, позволяет ДНК-связывающим доменам гетеродимерных белков связаться с чувствительным элементом в активированной форме, что, таким образом, приводит к экспрессии или супрессии экзогенного гена. Данный механизм не исключает потенциальное связывание лиганда с любым из EcR или USP и образование в результате этого активных гомодимерных 35 комплексов (например, EcR+EcR или USP+USP). В одном варианте реализации настоящего изобретения, один или более доменов рецептора можно изменить, чтобы получить химерный генный переключатель. Обычно, один или более из трех доменов можно выбрать из источника, отличного от источника других доменов, чтобы оптимизировать химерный рецептор в выбранной клетке-хозяине или организме по 40 трансактивирующей активности, комплементарному связыванию лиганда и узнаванию определенного чувствительного элемента. Вдобавок, сам чувствительный элемент можно модифицировать или заменить на чувствительные элементы к доменам других связывающих ДНК белков, таких как белок GAL-4 из дрожжей (см. Sadowski и др., *Nature* 335: 563 (1988)) или белок LexA из *E. coli* (см. Brent и др., *Cell* 43: 729 (1985)), в 45 химерных комплексах EcR. Другое преимущество химерных систем состоит в том, что они позволяют выбирать промотор, используемый для запуска экспрессии экзогенного гена, в соответствии с желательным конечным результатом. Такой двойной контроль может быть особенно важным в областях генной терапии, особенно когда

продуцируются цитотоксические белки, так как в этом случае можно контролировать как время осуществления экспрессии, так и тип клеток, в которых происходит экспрессия. Когда экзогенные гены, функционально связанные с поддающим промотором, вводят в клетки субъекта, экспрессия экзогенных генов контролируется присутствием лиганда согласно настоящему изобретению. Промоторы могут быть конститтивными или индуцибельно регулируемыми или могут быть тканеспецифичными (то есть, экспрессироваться лишь в конкретном типе клеток), или специфичными к некоторым стадиям развития организма.

[000303] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения, промотор

терапевтического переключателя, описанный в способах, является конститтивным. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения, промотор терапевтического переключателя активируется при условиях, связанных с заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, например, указанный промотор активируется в ответ на заболевание, в ответ на конкретное физиологическое состояние, стадию развития, дифференцировку или патологическое состояние, и/или в ответ на одну или более определенных биологических молекул; и/или указанный промотор активируется в определенных типах ткани или клеток. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения, указанное заболевание, расстройство или патологическое состояние реагирует на действие терапевтического полипептида или полинуклеотида. Например, в некоторых неограничивающих вариантах реализации настоящего изобретения, терапевтический полинуклеотид или полипептид полезен для лечения, предупреждения, снижения выраженности, уменьшения симптомов, предотвращения прогрессирования или излечения от заболевания, расстройства или патологического состояния, но не обязательно осуществляет любое или все из перечисленных действий. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения, первый и второй полинуклеотиды вводят, чтобы осуществить экспрессию комплекса лиганд-зависимого фактора транскрипции при условиях, связанных с заболеванием, расстройством или патологическим состоянием. В одном варианте реализации, терапевтические способы осуществляют таким образом, чтобы терапевтический полипептид или терапевтический полинуклеотид экспрессировался и распространялся у субъекта на уровне, достаточном для лечения, снижения выраженности или предупреждения указанного заболевания, расстройства или патологического состояния. В данной заявке термин "распространяется" означает, что указанный полипептид экспрессируется и высвобождается из модифицированной клетки в достаточном количестве, чтобы оказывать влияние или проявлять активность у субъекта. Распространение может быть системным, местным или промежуточным вариантом распространения. Например, терапевтический полипептид или терапевтический полинуклеотид может системно распространяться через кровоток или лимфатическую систему. В качестве альтернативы, терапевтический полипептид или терапевтический полинуклеотид может распространяться местно в ткани или органе, который лечат.

[000304] Множество геномных и кДНК-последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих множество полипептидов, таких как факторы транскрипции и репортерные белки, хорошо известны в данной области. Специалисты в данной области имеют доступ к сведениям о последовательностях нуклеиновых кислот практически всех известных генов и могут получить молекулу нуклеиновой кислоты непосредственно из общедоступного депозитария, учреждения, которое опубликовало последовательность, либо использовать обычные способы для получения указанной молекулы. См., например, описание номеров доступа последовательностей, ниже.

[000305] Генный переключатель может представлять собой любую систему генного переключателя, которая регулирует экспрессию гена при добавлении или удалении определенного лиганда. В одном варианте реализации настоящего изобретения, указанный генный переключатель представляет собой такой генный переключатель, 5 уровень экспрессии гена с которого зависит от уровня присутствующего лиганда. Примеры лиганд-зависимых факторов транскрипции, которые можно применять в генных переключателях согласно настоящему изобретению, включают члены суперсемейства ядерных рецепторов, активируемых соответствующими лигандами (например, глюокортикоидом, эстрогеном, прогестином, ретиноидом, экдизоном и 10 их аналогами и миметиками), и гTTA, активируемый тетрациклином, но не ограничиваются ими. В одном аспекте настоящего изобретения, указанный генный переключатель представляет собой основанный на EcR генный переключатель. Примеры таких систем включают системы, описанные в патентах США с номерами 6,258,603, 7,045,315, опубликованных заявках на патент США с номерами 2006/0014711, 2007/ 15 0161086 и опубликованной международной заявке WO 01/70816, но не ограничиваются ими. Примеры систем с химерным рецептором экдизона описаны в патенте США номер 7,091,038, опубликованных заявках на патент США с номерами 2002/0110861, 2004/ 0033600, 2004/0096942, 2005/0266457 и 2006/0100416 и опубликованных международных 20 заявках WO 01/70816, WO 02/066612, WO 02/066613, WO 02/066614, WO 02/066615, WO 02/29075 и WO 2005/108617. Пример системы, регулируемой нестероидным агонистом экдизона, представляет собой индуцируемую систему экспрессии у млекопитающего RheoSwitch® (New England Biolabs, Ипсвич, Массачусетс).

[000306] В одном варианте реализации настоящего изобретения, полинуклеотид, 25 кодирующий генный переключатель, содержит одну последовательность фактора транскрипции, кодирующую лиганд-зависимый фактор транскрипции, под контролем промотора. Последовательность фактора транскрипции может кодировать лиганд- зависимый фактор транскрипции, который представляет собой встречающийся в природе или искусственный фактор транскрипции. Искусственный фактор транскрипции 30 представляет собой такой фактор транскрипции, в котором природная последовательность указанного фактора транскрипции была изменена, например, путем мутирования последовательности или путем объединения доменов из различных факторов транскрипции. В одном варианте реализации настоящего изобретения, указанный фактор транскрипции содержит лигандсвязывающий домен ядерного рецептора группы Н (LBD). В одном варианте реализации настоящего изобретения, 35 LBD ядерного рецептора группы Н получают из EcR, вездесущего рецептора, сиротского рецептора 1, NER-1, ядерного рецептора стероидных гормонов 1, белка, взаимодействующего с рецептором ретиноида X-15, X-рецептора-бета печени, белка, подобного рецептору стероидных гормонов, X-рецептора печени, X-рецептора-альфа 40 печени, фарнезоид-X-рецептора, взаимодействующего с рецептором белка 14 или рецептора фарнезола. В другом варианте реализации настоящего изобретения, LBD ядерного рецептора группы Н получают из рецептора экдизона.

[000307] EcR и другие ядерные рецепторы группы Н представляют собой члены 45 суперсемейства ядерных рецепторов, все члены которого как правило характеризуются присутствием аминоконцевого домена трансактивации (TD), связывающего ДНК домена (DBD) и лигандсвязывающего домена, отделенного от DBD шарнирным участком. В данной заявке термин "связывающий ДНК домен" содержит минимальную полипептидную последовательность связывающего ДНК белка, вплоть до полной длины связывающего ДНК белка, при условии, что функция связывающего ДНК домена

состоит в связывании с конкретным чувствительным элементом. Члены суперсемейства ядерных рецепторов также отличаются присутствием четырех или пяти доменов: A/B, C, D, E и, в некоторых членах семейства, F (см. US 4,981,784 и Evans, Science 240-M9 (1988)). Домен "A/B" соответствует домену трансактивации, "C" соответствует

5 связывающему ДНК домену, "D" соответствует шарнирному участку и "E" соответствует лигандсвязывающему домену. Некоторые члены указанного семейства также могут содержать другой домен трансактивации на карбоксильном конце лигандсвязывающего домена, соответствующий "F".

[000308] DBD характеризуется присутствием двух цистeinовых цинковых пальцев,

10 между которыми расположены два аминокислотных мотива, Р-бокс и D-бокс, которые придают специфичность чувствительным элементам. Данные домены могут быть нативными, модифицированными или химерами различных доменов гетерологичных рецепторных белков. EcR, как подгруппа семейства ядерных рецепторов, также содержит менее четко определенные участки, ответственные за свойства гетеродимеризации. Так 15 как домены ядерных рецепторов блочные по своей природе, LBD, DBD и TD, могут быть взаимозаменяемыми.

[000309] В другом варианте реализации настоящего изобретения, фактор транскрипции содержит TD, DBD, который узнает чувствительный элемент, связанный с экзогенным геном, экспрессию которого нужно модулировать; и LBD ядерного 20 рецептора группы Н. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения, LBD ядерного рецептора группы Н содержит мутацию с заменой.

[000310] В другом варианте реализации настоящего изобретения, полинуклеотид, кодирующий генный переключатель, содержит первую последовательность фактора транскрипции под контролем первого промотора и вторую последовательность фактора 25 транскрипции под контролем второго промотора, при этом указанные белки, кодируемые указанной первой последовательностью фактора транскрипции и указанной второй последовательностью фактора транскрипции, взаимодействуют с образованием белкового комплекса, который функционирует как лиганд-зависимый фактор транскрипции, т.е. представляет собой генный переключатель, основанный на "двойном 30 переключателе" или на "двуихиридной" системе. Первый и второй промоторы могут быть одинаковыми или различными.

[000311] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения, полинуклеотид, кодирующий генный переключатель, содержит первую последовательность фактора транскрипции и вторую последовательность фактора транскрипции под контролем 35 промотора, при этом указанные белки, кодируемые указанной первой последовательностью фактора транскрипции и указанной второй последовательностью фактора транскрипции, взаимодействуют с образованием белкового комплекса, который функционирует как лиганд-зависимый фактор транскрипции, т.е. представляет собой "одиночный генный переключатель". Первую последовательность фактора транскрипции 40 и вторую последовательность фактора транскрипции можно соединить с помощью участка внутренней посадки рибосомы (IRES). IRES может представлять собой IRES EMCV.

[000312] В одном варианте реализации настоящего изобретения, первая последовательность фактора транскрипции кодирует полипептид, включающий TD, 45 DBD, который узнает чувствительный элемент, связанный с экзогенным геном, экспрессию которого нужно модулировать; и LBD ядерного рецептора группы Н, и вторая последовательность фактора транскрипции кодирует фактор транскрипции, включающий LBD ядерного рецептора, выбранный из LBD RXR позвоночного, LBD

RXR беспозвоночного, LBD белка ultraspiracle и химерного лигандсвязывающего домена, включающего два полипептидных фрагмента, при этом первый полипептидный фрагмент получен из LBD RXR позвоночного, LBD RXR беспозвоночного или LBD белка ultraspiracle, а второй полипептидный фрагмент получен из отличного LBD RXR позвоночного, LBD RXR беспозвоночного или LBD белка ultraspiracle.

[000313] В другом варианте реализации настоящего изобретения, указанный генный переключатель, содержит первую последовательность фактора транскрипции, кодирующую первый полипептид, включающий LBD и DBD ядерного рецептора, который узнает чувствительный элемент, связанный с экзогенным геном, экспрессию которого нужно модулировать, и вторую последовательность фактора транскрипции, кодирующую второй полипептид, включающий TD и LBD ядерного рецептора, при этом один из LBD ядерного рецептора представляет собой LBD ядерного рецептора группы Н. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, первый полипептид по существу свободен от TD и второй полипептид по существу свободен от DBD. Для целей настоящего изобретения, термин "по существу свободный" означает, что белок, о котором идет речь, содержит недостаточную последовательность домена, о котором идет речь, чтобы обеспечить активацию или связывающую активность.

[000314] В другом аспекте настоящего изобретения, первая последовательность фактора транскрипции кодирует белок, включающий партнер по гетеродимеризации и TD, и вторая последовательность фактора транскрипции кодирует белок, включающий DBD и LBD.

[000315] Когда только один LBD ядерного рецептора представляет собой LBD группы Н, другой LBD ядерного рецептора можно получить из любого другого ядерного рецептора, который образует димер с LBD группы Н. Например, когда LBD ядерного рецептора группы Н представляет собой LBD EcR, другой "партнер" LBD ядерного рецептора можно получить из EcR, RXR позвоночного, RXR беспозвоночного, белка ultraspiracle (USP) или химерного ядерного рецептора, содержащего по меньшей мере два различных полипептидных фрагмента LBD ядерного рецептора, выбранного из RXR позвоночного, RXR беспозвоночного и USP (см. WO 01/70816 A2, международную заявку на патент номер PCT/US02/05235 и US 2004/0096942 A1). "Партнерский" лигандсвязывающий домен ядерного рецептора может дополнительно включать мутацию укорачивания, делеционную мутацию, мутацию с заменой или другую модификацию.

[000316] В одном варианте реализации настоящего изобретения, LBD RXR позвоночного получают из RXR человека *Homo sapiens*, мыши *Mus musculus*, крысы *Rattus norvegicus*, цыпленка *Gallus gallus*, свиньи *Sus scrofa domestica*, лягушки *Xenopus laevis*, данио *Danio rerio*, оболочника *Polyandrocarpa misakiensis* или медузы *Tripedalia cysophora*.

[000317] В одном варианте реализации настоящего изобретения, лигандсвязывающий домен RXR беспозвоночного получают из полипептида ultraspiracle саранчи *Locusta migratoria* ("LmUSP"), гомолога 1 RXR иксодового клеща *Amblyomma americanum* ("AmaRXR1"), гомолога 2 RXR иксодового клеща *Amblyomma americanum* ("AmaRXR2"), гомолога RXR манящего краба *Celuca pugilator* ("CpRXR"), гомолога RXR мучного жука *Tenebrio Molitor* ("TmRXR"), гомолога RXR медоносной пчелы *Apis mellifera* ("AmRXR"), гомолога RXR тли *Myzus persicae* ("MpRXR") или гомолога RXR недвукрылых/нечешуекрылых.

[000318] В одном варианте реализации настоящего изобретения, химерный LBD RXR содержит по меньшей мере два полипептидных фрагмента, выбранных из

полипептидного фрагмента RXR позвоночных видов, полипептидного фрагмента RXR беспозвоночных видов и полипептидного фрагмента гомолога RXR беспозвоночных видов недвукрылых/нечешуекрылых. Химерный лигандсвязывающий домен RXR для применения в настоящем изобретении может включать по меньшей мере два

5 полипептидных фрагмента RXR различных видов, или, когда виды одинаковые, два или более полипептидных фрагмента могут быть получены из двух или более различных изоформ полипептидного фрагмента RXR указанного вида.

[000319] В одном варианте реализации настоящего изобретения, химерный лигандсвязывающий домен RXR содержит по меньшей мере один полипептидный 10 фрагмент RXR позвоночных видов и один полипептидный фрагмент RXR беспозвоночных видов.

[000320] В другом варианте реализации настоящего изобретения, химерный лигандсвязывающий домен RXR содержит по меньшей мере один полипептидный фрагмент RXR позвоночных видов и один полипептидный фрагмент гомолога RXR-15 беспозвоночных видов недвукрылых/нечешуекрылых.

[000321] Лиганд, когда он объединен с LBD ядерного рецептора(ов), который, в свою очередь, связан с чувствительным элементом, связанным с экзогенным геном, обеспечивает внешнюю временную регуляцию экспрессии экзогенного гена. Механизм связывания или порядок, в котором различные компоненты настоящего изобретения 20 связываются друг с другом, то есть, например, лиганд с LBD, DBD с чувствительным элементом, TD с промотором и т.д., не важен.

[000322] В конкретном примере, связывание лиганда с LBD ядерного рецептора группы H и с партнером LBD ядерного рецептора позволяет экспрессию экзогенного гена. Этот механизм не исключает возможности связывания лиганда с ядерным 25 рецептором группы H (GHNR) или его партнером, и образования в результате этого активных гомодимерных комплексов (например, GHNR+GHNR или партнер + партнер). Предпочтительно, один или более доменов рецептора изменяют, чтобы получить гибридный генный переключатель. Обычно, один или более из трех доменов, DBD, LBD и AD, можно выбрать из источника, отличного от источника других доменов, для 30 того, чтобы оптимизировать гибридные гены и полученные в результате этого гибридные белки в выбранной клетке-хозяине или организме по трансактивирующему активности, комплементарному связыванию лиганда и узнаванию определенного чувствительного элемента. Вдобавок, сам чувствительный элемент можно модифицировать или заменить на чувствительные элементы к доменам других 35 связывающих ДНК белков, таких как белок GAL-4 из дрожжей (см. Sadowski и др., Nature 335: 563 (1988)) или белок LexA из Escherichia coli (см. Brent и др., Cell 43: 729 (1985)), или на синтетические чувствительные элементы, специфичные для направленных взаимодействий с белками, разработанные, модифицированные и отобранные по таким 40 определенным взаимодействиям (см., например, Kim и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 3616 (1997)), чтобы привести чувствительный элемент в соответствие с гибридными рецепторами.

[000323] Функциональный комплекс EcR также может содержать дополнительный белок (белки), такой как иммунофилин. Дополнительные члены семейства белков ядерных рецепторов, известные как транскрипционные факторы (такие как DHR38 или 45 betaFTZ-1), также могут быть лигандзависимыми или независимыми партнерами для EcR, USP и/или RXR. Дополнительно, могут быть необходимы другие кофакторы, такие как белки, широко известные как коактиваторы (также называемые адаптерами или медиаторами. Данные белки не связываются специфично с последовательностью

ДНК и не участвуют в основной транскрипции. Они могут оказывать влияние на активацию транскрипций посредством различных механизмов, включая стимуляцию связывания активаторов с ДНК, влияние на структуру хроматина или опосредование взаимодействий активатора с инициирующим комплексом. Примеры таких

- 5 коактиваторов включают RIP140, TIF1, RAP46/Bag-1, ARA70, SRC-1/NCoA-1, TIF2/GRIP/NCoA-2, ACTR/AIB1/RAC3/pCIP, а также случайный коактиваторный белок, связывающий белок, связывающий цАМФ-чувствительный элемент, CBP/p300 (для обзора см. Glass и др., *Curr. Opin. Cell Biol.* 9: 222 (1997)). Также, кофакторы белков, широко известные как корепрессоры (также известные как репрессоры, сайленсеры 10 или медиаторы сайленсинга), могут быть необходимы для эффективного ингибиования активации транскрипции в отсутствии лиганда. Данные корепрессоры могут взаимодействовать с не связанным с лигандом EcR, чтобы подавлять активность на чувствительном элементе. В настоящее время имеются доказательства, которые позволяют предположить, что связывание лиганда изменяет конформацию рецептора, 15 что приводит к высвобождению корепрессора и привлечению описанных выше коактиваторов, нарушая тем самым подавляющую активность. Примеры корепрессоров включают N-CoR и SMRT (для обзора см. Horwitz и др., *Mol Endocrinol.* 10: 1167 (1996)). Данные кофакторы могут быть либо эндогенными в клетке или организме, либо их можно добавить экзогенно в виде трансгенов, которые будут экспрессироваться либо 20 регулируемым, либо нерегулируемым образом.

[000324] Экзогенный ген функционально связан с промотором, содержащим по меньшей мере один чувствительный элемент, который узнается DBD лиганд-зависимого фактора транскрипции, кодируемого генным переключателем. В одном варианте реализации настоящего изобретения, указанный промотор содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 25 9, 10 или более копий чувствительного элемента. Промоторы, содержащие желательные чувствительные элементы, могут представлять собой встречающиеся в природе промоторы или искусственные промоторы, созданные с помощью методик, которые хорошо известны в данной области, например, один или более чувствительных элементов функционально связаны с минимальным промотором.

30 [000325] Чтобы ввести полинуклеотиды в клетки, можно использовать вектор. Указанный вектор может представлять собой, например, плазмидный вектор или вирусный вектор из одно- или двухцепочечной РНК или ДНК. Такие векторы можно вводить в клетки с помощью хорошо известных способов введения ДНК и РНК в клетки. Вирусные векторы могут быть репликационно-компетентными или 35 репликационно-дефектными. В последнем случае, воспроизведение вируса, как правило, будет происходить только в комплементарных клетках-хозяевах. В данной заявке термин "клетка-хозяин" или "хозяин" используется для обозначения клетки согласно настоящему изобретению, которая содержит один или более полинуклеотидов согласно настоящему изобретению.

40 [000326] Таким образом, как минимум, векторы должны включать полинуклеотиды согласно настоящему изобретению. Другие компоненты вектора могут включать селектируемые маркеры, домены модификации хроматина, дополнительные промоторы, запускающие экспрессию других полипептидов, которые также могут присутствовать на векторе (например, летального полипептида), сайты встраивания в геном, сайты 45 рекомбинации и молекулярные элементы вставки, но не ограничиваются ими. Векторы могут содержать любое количество данных дополнительных элементов, либо внутри, либо снаружи указанных полинуклеотидов таким образом, что вектор можно приспособить для определенных целей желательных терапевтических способов.

[000327] В одном варианте реализации настоящего изобретения, векторы, которые вводят в клетки, дополнительно содержат "селектируемый маркерный ген", который, когда он экспрессируется, указывает на то, что конструкция генного переключателя согласно настоящему изобретению встроилась в геном клетки-хозяина. Таким образом, 5 селектируемый ген может быть положительным маркером встраивания в геном. Хотя его наличие не является крайне необходимым для способов согласно настоящему изобретению, присутствие селектируемого маркерного гена позволяет специалисту отобрать популяцию живых клеток, если векторная конструкция встроилась в геном указанных клеток. Таким образом, некоторые варианты реализации настоящего 10 изобретения включают отбор клеток, в которые вектор успешно встроился. В данной заявке термин "отбирать" или его варианты," когда они применяются в сочетании с клетками, предполагают означающими стандартные, хорошо известные способы отбора клеток с определенным генетическим составом или фенотипом. Обычные способы включают культивирование клеток в присутствии антибиотиков, таких как G418, 15 неомицин и ампициллин, но не ограничиваются ими. Другие примеры селектируемых маркерных генов включают гены, которые придают устойчивость к дигидрофолатредуктазе, гигромицину или миофенольной кислоте, но не ограничиваются ими. Другие способы селекции включают селектируемый маркерный ген, который позволяет использовать в качестве селекционных агентов тимидинкиназу, 20 гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазу или аденин фосфорибозилтрансферазу, но не ограничиваются ими. Клетки, содержащие векторную конструкцию, содержащую ген или гены устойчивости к антибиотику, затем способны расти при наличии антибиотика в культуре. Аналогично, клетки, не содержащие векторную конструкцию, 25 содержащую ген или гены устойчивости к антибиотику, не способны расти при наличии антибиотика в культуре.

[000328] В данной заявке термин "домен модификации хроматина" (CMD) относится к последовательности нуклеотидов, которая взаимодействует с множеством белков, связанных с поддержанием и/или изменением структуры хроматина, таких как ДНК-инсулаторы, не ограничиваются ими. См. Ciavatta и др., Proc. Nati Acad. Sci. U.S.A., 103: 30 9958 (2006). Примеры CMD включают инсулатор β -глобулина цыпленка и гиперчувствительный сайт 4 (cHS4) цыпленка, но не ограничиваются ими. Использование различных последовательностей CMD между одной или несколькими генными программами (т.е., промотор, кодирующая последовательность и 3'-регуляторная область), например, может способствовать применению последовательностей ДНК 35 различных CMD в качестве "мини плеч гомологии" в комбинации с различными микроорганизмами или рекомбинантными способами *in vitro*, чтобы "обменять" друг с другом генные программы имеющихся мультигенных и моногенных челночных векторов. Другие примеры доменов модификации хроматина известны в данной области, или их можно легко идентифицировать.

[000329] Конкретные векторы для применения в настоящем изобретении представляют собой векторы экспрессии, которые кодируют белки или полинуклеотиды. Как правило, такие векторы включают цис-действующие регуляторные области, эффективные для экспрессии в хозяине, функционально связанные с полинуклеотидом, экспрессию которого нужно осуществить. Подходящие транс-действующие факторы обеспечивает 40 хозяин, дополняющий вектор или сам вектор при его введении в хозяина.

[000330] Для экспрессии белков или полинуклеотидов можно применять большое разнообразие векторов экспрессии. Такие векторы включают хромосомные векторы, эпизомные векторы и векторы на основе вирусов, например, векторы, полученные из

бактериальных плазмид, из бактериофага, из эписом дрожжей, из хромосомных элементов дрожжей, из вирусов, таких как аденоассоциированные вирусы, лентивирусы, бакуловирусы, паповавирусы, такие как SV40, вирусы коровьей оспы, аденоавирусы, вирусы оспы птиц, вирусы псевдодобшенства и ретровирусы, и векторы, полученные из комбинации перечисленных, например, полученные из генетических элементов плазмиды и бактериофага, такие как космиды и фагмиды. Все перечисленные векторы можно применять для экспрессии в соответствии с данным аспектом настоящего изобретения. Как правило, в этом отношении можно применять для экспрессии любой вектор, подходящий для сохранения, передачи по наследству или экспрессирования

10 полинуклеотидов или белков в хозяине.

[000331] Полинуклеотидная последовательность в векторе экспрессии функционально связана с подходящей последовательностью(ями), контролирующей экспрессию, включая, например, промотор для прямой транскрипции мРНК. Типичные дополнительные промоторы включают конститутивные промоторы и тканеспецифичные или индуцируемые промоторы, но не ограничиваются ими. Примеры конститутивных эукариотических промоторов включают промотор гена металлотионеина I мыши (Hamer и др., J. Mol. Appl. Gen. 7: 273 (1982)); промотор ТК вируса герпеса (McKnight, Cell 31: 355 (1982)); ранний промотор SV40 (Benoist и др., Nature 290: 304 (1981)) и промотор вируса коровьей оспы, но не ограничиваются ими. Дополнительные примеры промоторов, которые можно применять для запуска экспрессии белка или полинуклеотида, включают тканеспецифичные промоторы и другие эндогенные промоторы для конкретных белков, такие как промотор альбумина (гепатоциты), промотор проинсулина (бета-клетки поджелудочной железы) и тому подобные, но не ограничиваются ими. Обычно, экспрессионные конструкции содержат сайты инициации и терминации транскрипции и, в транскрибируемом участке, сайт связывания рибосомы для трансляции. Кодирующая часть зрелых транскриптов, экспрессируемых конструкциями, может содержать инициирующий трансляцию кодон AUG в начале и терминирующий кодон (UAA, UGA или UAG), расположенный подходящим образом, на конце транслируемого полипептида.

[000332] Вдобавок, конструкции могут содержать регуляторные области, которые регулируют, а также вызывают экспрессию. Как правило, такие участки функционируют путем контроля транскрипции, как, например, сайты связывания репрессоров и энхансеров, среди прочих.

[000333] Примеры эукариотических векторов включают pW-LNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 и pSG, доступные от Stratagene; pSVK3, pBPV, pMSG и pSVL доступные от Amersham Pharmacia Biotech; и pCMVsRed2-express, pIRES2-DsRed2, pDsRed2-Mito и pCMV-EGFP, доступные от Clontech, но не ограничиваются ими. Многие другие векторы хорошо известны и доступны для приобретения.

[000334] Особенно пригодные векторы, которые содержат молекулярные элементы вставки для быстрой вставки и удаления элементов генных программ, описаны в опубликованной патентной заявке США номер 2004/0185556, патентной заявке США номер 11/233,246 и опубликованных международных заявках WO 2005/040336 и WO 2005/116231. Примером таких векторов является UltraVector™ Production System (Intrexon Corp., Блэксбург, Вирджиния), описанный в WO 2007/038276. В данной заявке термин "генная программа" представляет собой комбинацию генетических элементов, содержащих промотор (P), экспрессируемую последовательность (E) и 3'-регуляторную последовательность (3), таким образом, что "PE3" представляет собой генную программу. Можно легко заменить элементы внутри генной программы между

молекулярными элементами, которые фланкируют каждый из элементов генной программы. Молекулярный элемент в данной заявке определен как полинуклеотид, содержащий по меньшей мере два неизменчивых редких или малораспространенных сайта рестрикции, расположенных линейно. В одном варианте реализации настоящего изобретения, молекулярный элемент содержит по меньшей мере три неизменчивых редких или малораспространенных сайта рестрикции, расположенных линейно. Обычно, любой молекулярный элемент не будет содержать редкий или малораспространенный сайт рестрикции любого другого молекулярного элемента внутри одной генной программы. Узнаваемые последовательности размером больше 6 нуклеотидов, на которых действует рестрикционный фермент, называют "редкими" сайтами рестрикции. Тем не менее, существуют сайты рестрикции размером 6 п.о., которые встречаются реже, чем это предсказывают статистически, и такие сайты, и эндонуклеазы, которые их расщепляют, называют "малораспространенными". Примеры редких или малораспространенных рестрикционных ферментов включают AsIS I, Pac I, Sbf I, Fse I, Asc I, Mlu I, SnaB I, Not I, Sal I, Swa I, Rsr II, BSiW I, Sfo I, Sgr AI, AflIII, Pvu I, Ngo MIV, Ase I, Flp I, Pme I, Sda I, Sgf I, Srf I, Nru I, Acl I, Cla I, Csp45 I, Age I, Bst1107 I, BstB I, Hpa I, Aat II, EcoR V, Nhe I, Spe I, Avi II, Avr II, Mfe I, Af6 I, Fsp I, Kpn I, Sca I, BspE I, Nde I, Bfr I, Xho I, Pml I, ApaL I, Kas I, Xma I, BsrB I, Nsi I, Sac II, Sac I, Blp I, PspOM I, Pci I, Stu I, Sph I, BamH I, Bsu36 I, Xba I, BbvC I, Bgl II, Nco I, Hind III, EcoR I, BsrG I и Sse8781 I, но не ограничиваются ими.

[000335] Вектор также может содержать сайты рестрикции для второго класса рестрикционных ферментов, называемых ферментами хоуминг-эндонуклеазами (НЕ). У ферментов НЕ большие асимметричные сайты рестрикции (12-40 пар оснований), и их сайты рестрикции редко встречаются в природе. Например, у НЕ, известного как I-SceI, сайт рестрикции размером 18 п.о. (5'-TAGGGATAACAGGGTAAT-3' (SEQ ID NO: 28)), и теоретически он должен встречаться один раз на каждые 7×10^{10} пар оснований в произвольной последовательности. Такая частота встречаемости эквивалентна лишь одному сайту в геноме, который в 20 раз больше генома млекопитающего. Редкая встречаемость в природе сайтов НЕ сильно повышает вероятность того, что специалист в области генной инженерии сможет разрезать генную программу, не нарушая целостности генной программы, если сайты НЕ введены в подходящие положения клонирующей векторной плазиды.

[000336] Отбор подходящих векторов и промоторов для экспрессии в клетке-хозяине представляет собой хорошо известную процедуру, и необходимые методики конструирования вектора и введения его в хозяина, а также его экспрессии в хозяине, находятся в рамках средней компетенции в данной области.

[000337] Введение полинуклеотидов в клетки можно осуществить путем временной трансфекции, стабильной трансфекции или локус-специфической вставки вектора. Временную и стабильную трансфекцию векторами клетки-хозяина можно осуществить путем кальций-фосфатной трансфекции, опосредованной DEAE-декстраном трансфекции, опосредованной катионным липидом трансфекции, электропорации, трансдукции, инфекции или с помощью других способов. Такие способы описаны во многих стандартных лабораторных руководствах, таких как Davis и др., *Basic Methods in Molecular Biology* (1986); Keown и др., 1990, *Methods Enzymol.* 185: 527-37; Sambrook и др., 2001, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, третье издание. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Нью-Йорк. Данные способы стабильной трансфекции приводят к произвольному встраиванию вектора в геном клетки. Дополнительно, число копий и ориентация векторов, по большому счету, также произвольны.

[000338] В одном варианте реализации настоящего изобретения, вектор встраивают в биологически нейтральный сайт в геноме. Биологически нейтральный сайт представляет собой сайт в геноме, вставка полинуклеотидов в который практически не нарушает, если вообще нарушает, нормальное функционирование клетки.

- 5 Биологически нейтральные сайты можно выявить, применяя доступные способы биоинформатики. В данной области известно множество биологически нейтральных сайтов, например, эквивалентный ROSA локус. Другие биологически нейтральные сайты можно идентифицировать, применяя обычные методики, хорошо известные в данной области. Описание сайта(ов) встраивания в геном осуществляют, применяя 10 способы, известные в данной области. Для контролирования положения, числа копий и/или ориентации полинуклеотидов при введении вектора в клетки можно применять способы локус-специфической вставки. Способы локус-специфической вставки хорошо известны в данной области и включают, но не ограничены перечисленными, гомологичную рекомбинацию и опосредованное рекомбиназой встраивание в геном.
- 15 Разумеется, если в способах согласно настоящему изобретению нужно применять методы локус-специфической вставки, указанные векторы могут включать элементы, которые способствуют локус-специфической вставке, например, но не ограничиваясь, гомологичной рекомбинации. Например, векторы могут включать один, два, три, четыре или более сайтов встраивания в геном (GIS). В данной заявке термин "сайт 20 встраивания в геном" определен как часть последовательности вектора, последовательность нуклеотидов которой идентична или практически идентична областям генома в клетках, которая позволяет встраивание вектора в геном. В частности, указанный вектор может включать два сайта встраивания в геном, которые фланкируют по меньшей мере указанные полинуклеотиды. Разумеется, GIS может фланкировать 25 дополнительные элементы или даже все элементы, присутствующие на векторе.

[000339] В другом варианте реализации, локус-специфическую вставку можно осуществить путем вставки гена в определенный сайт рекомбиназы. Вкратце, бактериальные ферменты рекомбиназы, такие как интеграза PhiC31, но не ограничиваясь ей, могут действовать на "псевдо"-сайтах рекомбинации в геноме человека. Данные 30 псевдосайты рекомбинации могут представлять собой мишени для локус-специфической вставки с помощью рекомбиназ. Вставка гена в определенный сайт рекомбиназы описана у Thyagarajan и др., Mol. Cell Biol. 21: 3926 (2001). Другие примеры рекомбиназ и соответствующих их сайтов, которые можно применять для вставки гена в определенный сайт рекомбиназы, включают сериновые рекомбиназы, такие как R4 и 35 TP901-1, и рекомбиназы, описанные в WO 2006/083253, но не ограничиваются ими.

[000340] В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения, указанный вектор может включать ген устойчивости к химическим веществам, например, ген множественной лекарственной устойчивости mdr1, дигидрофолатредуктазу или 40 О⁶-алкилгуанин-ДНК-алкилтрансферазу. Ген устойчивости к химическим веществам может находиться под контролем конститутивного (например, CMV) или индуцируемого (например, RheoSwitch[®]) промотора. В данном варианте реализации настоящего изобретения, если требуется лечение заболевания у субъекта с сохранением 45 модифицированных клеток в субъекте, практикующий врач может применять химиотерапевтический агент для разрушения пораженных болезнью клеток, при этом модифицированные клетки будут защищены от агента в результате экспрессии подходящего гена устойчивости к химическим веществам, и можно будет продолжать применять его для лечения, снижения выраженности или предупреждения заболевания или расстройства. Путем помещения гена устойчивости к химическим веществам под

контроль индуцируемого промотора, можно избежать нежелательной экспрессии указанного гена устойчивости к химическим веществам, при этом он будет доступен в случае необходимости длительного лечения. Если сами модифицированные клетки становятся пораженными болезнью, их можно будет уничтожить путем индукции экспрессии летального полипептида, как описано ниже.

[000341] Способы согласно настоящему изобретению осуществляют путем введения полинуклеотидов, кодирующих генный переключатель и экзогенный ген, в клетки субъекта. Можно применять любой способ введения полинуклеотида в клетку, известный в данной области, такой как описанные выше.

[000342] Когда полинуклеотиды нужно вводить в клетки *ex vivo*, клетки можно получить из субъекта с помощью любого способа, известного в данной области, включая биопсии, соскобы и хирургическое удаление ткани, но не ограничиваясь ими.

Выделенные клетки можно культивировать в течение достаточного количества времени, чтобы позволить полинуклеотидам войти в клетки, например, в течение 2, 4, 6, 8, 10,

12, 18, 24, 36, 48 часов или более. Способы культивирования первичных клеток на протяжении небольших промежутков времени хорошо известны в данной области. Например, клетки можно культивировать в планшетах (например, в микролуночных планшетах), либо присоединенными, либо в супензии.

[000343] Для терапевтических способов *ex vivo*, клетки выделяют из субъекта и культивируют при условиях, подходящих для введения полинуклеотидов в клетки. Как только полинуклеотиды были введены в клетки, указанные клетки инкубируют в течение достаточного периода времени, чтобы позволить экспрессироваться лиганд-зависимому фактору транскрипции, например, в течение 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 18 или 24 часов или более. В некоторый момент времени после введения полинуклеотидов в

клетки (либо перед, либо после того, как экспрессировались значительные уровни лиганд-зависимого фактора транскрипции), клетки вводят обратно субъекту. Это введение можно осуществить с помощью любого способа, известного в данной области, например, путем внутривенной инфузии или непосредственной инъекции в ткань или полость. В одном варианте реализации настоящего изобретения, присутствие

полинуклеотидов в клетках определяют перед введением клеток обратно субъекту. В другом варианте реализации настоящего изобретения, клетки, содержащие полинуклеотиды, отбирают (например, на основании присутствия селектируемого маркера в полинуклеотидах) и только такие клетки, содержащие указанные полинуклеотиды, вводят субъекту. После того как клетки ввели обратно субъекту,

субъекту вводят лиганд, чтобы индуцировать экспрессию терапевтического полипептида или терапевтического полинуклеотида. В альтернативном варианте реализации, лиганд можно добавить в клетки даже перед тем, как клетки вводят обратно субъекту, таким образом, что терапевтический полипептид или терапевтический полинуклеотид экспрессируется перед введением клеток. Лицо можно вводить с помощью любого

подходящего способа, либо системно (например, перорально, внутривенно), либо местно (например, интраперитонеально, интрапекально, интравентрикулярно или путем непосредственной инъекции в ткань или орган, куда были введены клетки). Оптимальное время введения лиганда можно определить для каждого типа клеток и заболевания или расстройства, применяя только обычные способы.

[000344] Терапевтические способы *in vivo* согласно настоящему изобретению включают непосредственное введение *in vivo* полинуклеотидов в клетки субъекта. Полинуклеотиды можно вводить субъекту системно или местно (например, в место проявления заболевания или расстройства). Как только полинуклеотиды были введены

субъекту, можно вводить лиганд для индукции экспрессии терапевтического полипептида или терапевтического полинуклеотида. Лицо можно вводить с помощью любого подходящего способа, либо системно (например, перорально, внутривенно), либо местно (например, интраперитонеально, интратекально, интравентрикулярно или путем 5 непосредственной инъекции в ткань или орган, где проявилось заболевание или расстройство). Оптимальное время введения лиганда можно определить для каждого типа клеток и заболевания или расстройства, применяя только обычные способы.

[000345] Для применения *in vivo*, лиганда, описанные в данной заявке, можно принимать в фармацевтически приемлемых носителях, таких как, например, растворы, 10 суспензии, таблетки, капсулы, мази, эликсиры и инъецируемые композиции.

Фармацевтические композиции могут включать от 0.01% до 99% лиганда по весу. Композиции могут быть в виде лекарственных форм, содержащих одну либо множество 15 доз. Количество лиганда в любой конкретной фармацевтической композиции будет зависеть от эффективной дозы, то есть дозы, необходимой для индукции экспрессии или супрессии желательного гена.

[000346] Подходящие пути введения фармацевтических препаратов включают пероральный, ректальный, топический (включая дермальный, буккальный и сублингвальный), вагинальный, парентеральный (включая подкожный, 20 внутримышечный, внутривенный, внутриопухолевый, внутрикожный, интратекальный и эпидуральный) путь введения и введение с помощью назогастрального зонда. Для специалистов в данной области должно быть очевидно, что предпочтительный путь введения будет зависеть от состояния, которое лечат, и может изменяться в зависимости от таких факторов, как состояние реципиента.

[000347] В данной заявке термин "rAD.RheoIL12" относится к аденоизурульному 25 полинуклеотидному вектору, несущему ген IL-12 под контролем генного переключателя терапевтической системы RheoSwitch® (RTS), который способен продуцировать белок IL-12 в присутствии активирующего лиганда. В данной заявке термин "rAd.cIL12" относится к аденоизурульному полинуклеотидному контролльному вектору, включающему ген IL-12 под контролем конститутивного промотора.

[000348] В данной заявке термин "IL-12p70" относится к белку IL-12, который обычно 30 содержит две субединицы, как правило, называемые p40 и p35. В объем термина IL-12p70 входят гибридные белки, содержащие две субединицы IL-12 (p40 и p35), при этом указанный гибридный белок может содержать линкерные аминокислоты между субединицами.

[000349] В данной заявке термин "белок, обладающий функцией иммуномодулятора", 35 относится к белку, который обладает по меньшей мере 20% (например, по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90%) любой биологической активности иммуномодулятора, выбранного из IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10R или его субединицы DN, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, IL-24, IL-27, GM-CSF, IFN-альфа, IFN-40 гамма, CCL3 (MIP-1a), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP3), XCL1 (лимфотактина), CXCL1 (MGSA-альфа), CCR7, CCL19 (MIP-3b), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10), CXCL12 (SDF-1), CCL21 (6Ckine), OX40L, 4-1BBL, CD40, CD70, GITRL, LIGHT, b-дефензина, HMGB1, Flt3L, IFN-бета, TNF-альфа, dnFADD, BCG, TGF-альфа, PD-L1, TGFbRII DN, ICOS-L и S100. Аналогично, термин "белок, обладающий функцией IL-12", относится к белку, 45 который обладает по меньшей мере 20% (например, по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90%) любой биологической активности IL-12 человека. Биологические активности таких иммуномодуляторов хорошо известны. См. следующую таблицу.

Таблица 4.

Иммуномодуляторы и их функции	
Иммуномодулятор	Функция
Цитокины	
5 Интерлейкин-1 (IL-1)	IL-1 представляет собой цитокин, продуцируемый активированными макрофагами. IL-1 стимулирует пролиферацию тимоцитов, вызывая высвобождение IL-2, созревание и пролиферацию В-клеток и активность фактора роста фибробластов. Белки IL-1 участвуют в воспалительном ответе.
10 Интерлейкин-2 (IL-2)	IL-2 представляет собой семейство цитокинов, которые продуцируются Т-клетками в ответ на антигенную или митогенную стимуляцию, этот белок необходим для пролиферации Т-клеток и других активностей, важных для регуляции иммунного ответа. IL-2 может стимулировать В-клетки, моноциты, активированные лимфокином клетки-киллеры, клетки - естественные киллеры и клетки глиомы.
15 Интерлейкин-3 (IL-3)	IL-3 стимулирует пролиферацию гематопоэтических плюрипотентных клеток-предшественников. Он секретируется активированными Т-клетками для поддержания роста и дифференцировки Т-клеток из костного мозга при иммунном ответе. Было показано, что комбинированная внутриопухолевая генная терапия Ad-mIL-3 в комбинации с лучевой терапией значительно подавляет рост опухоли (Oh 2004).
20 Интерлейкин-4 (IL-4)	IL-4 представляет собой цитокин, который участвует в по меньшей мере нескольких процессах активации В-клеток, а также других типов клеток. Он представляет собой костимулятор синтеза ДНК. Он индуцирует экспрессию молекул МНС II класса на покоящихся В-клетках. Он увеличивает как секрецию, так и экспрессию на поверхности клеток IgE и IgG1. Он также регулирует экспрессию низкоаффинного Fc рецептора для IgE (CD23) на лимфоцитах и моноцитах.
Интерлейкин-5 (IL-5)	IL-5 стимулирует рост В-клеток, повышает секрецию иммуноглобулинов и вызывает подавление опухоли (Nakashima 1993, Wu 1992).
Интерлейкин-7 (IL-7)	IL-7 - это цитокин, который представляет собой гематопоэтический фактор роста, способный стимулировать пролиферацию лимфоидных клеток-предшественников. Он важен для пролиферации во время некоторых стадий созревания В-клеток.
Интерлейкин-9 (IL-9)	IL-9 поддерживает независимый от IL-2 и независимый от IL-4 рост хелперных Т-клеток.
Интерлейкин-15 (IL-15)	IL-15 представляет собой цитокин, который стимулирует пролиферацию Т-лимфоцитов. Стимуляция IL-15 требует взаимодействия IL-15 с компонентами IL-2R, включая IL-2R бета и, вероятно, IL-2R гамма, но не IL-2R альфа.
Интерлейкин-18 (IL-18)	IL-18 повышает активность клеток - естественных киллеров в клетках селезенки и стимулирует продукцию интерферона- гамма в Т-хелперных клетках I типа.

Иммуномодулятор		Функция
Интерлейкин-21 (IL-21)		IL-21 представляет собой цитокин с иммунорегуляторной активностью. IL-21 может вызывать переход между врожденным и приобретенным иммунитетом.
Интерлейкин-23 (IL-23)		IL-23 действует непосредственно на дендритных клетках, чтобы вызвать иммуногенное презентирование опухолевого пептида, что может привести к сильной инфильтрации CD8(+) и CD4(+) Т-клеток внутри опухоли и индукции специфичного ответа TH1-типа на опухоль в региональных лимфатических узлах и селезенке. (Hii 2006).
Интерлейкин-27 (IL-27)		IL-27 представляет собой цитокин с про- и противовоспалительными свойствами, который может регулировать развитие Т-хелперных клеток, подавлять пролиферацию Т-клеток, стимулировать активность цитотоксических Т-клеток, индуцировать переключение изотипа в В-клетках, и который оказывает различное действие на клетки врожденного иммунитета.
Интерлейкин-24 (IL-24)		Было показано, что IL-24 подавляет рост опухоли (Susan 2004, Fisher 2003).
INF-альфа (IFN α)		IFN-альфа имеет противоопухолевую функцию (Taqliaferri 2005).
Интерферон бета 1 (IFNB1)	1	IFNB1 представляет собой член группы белков интерферонов, которые связываются со специфичными рецепторами на поверхностях клеток (IFNAR) и стимулируют как макрофаги, так и клетки - естественные киллеры (NK), чтобы вызвать противовирусную, антибактериальную и противораковую активности.
Интерферон гамма (IFN-гамма)		IFN-гамма продуцируется лимфоцитами, активированными определенными антигенами или митогенами. IFN-гамма, помимо того, что он обладает противовирусной активностью, проявляет важные иммунорегуляторные функции. Он представляет собой эффективный активатор макрофагов, он оказывает антипролиферативное действие на трансформированные клетки и может усиливать противовирусное и противоопухолевое действие интерферонов I типа.
Фактор некроза опухоли (TNF-альфа)		TNF- α преимущественно секретируется макрофагами и может индуцировать гибель некоторых опухолевых линий клеток. Он представляет собой эффективный пироген, вызывающий жар путем непосредственного действия или путем стимуляции секреции интерлейкина-1.
Хемокины		
Хемокиновый (C-мотив) лиганд 1 (XCL1)		Хемокиновый (C-мотив) лиганд 1 (XCL1, также известный как лимфотактин) хемотактичен для CD4+ и CD8+ Т-клеток, но не для моноцитов, и вызывает повышение внутриклеточного кальция в лимфоцитах периферической крови. Комбинация XCL1 с IL-2 и IL-12 может улучшить иммунотерапию и усилить противоопухолевый ответ (Emtage 1999, Wang 2002).
СС хемокиновый лиганд 3 (CCL3)		СС хемокиновый лиганд 3 (CCL3), также известный как воспалительный белок макрофагов-1 (MIP-1), который

Иммуномодулятор		Функция
45		представляет собой так называемый монокин (тип цитокина, продуцируемого, главным образом, моноцитами и макрофагами), который участвует в привлечении и активации полиморфоидных лейкоцитов в состоянии острого воспаления.
	CCL5 (RANTES)	CCL5 (RANTES) представляет собой хемоаттрактант для моноцитов крови, Т-хелперных клеток памяти и эозинофилов. Вызывает высвобождение гистамина из базофилов и активирует эозинофилы. Связывается с CCR1, CCR3, CCR4 и CCR5. Представляет собой один из основных подавляющих HIV факторов, продуцируемых CD8+ Т-клетками.

	СС хемокиновый лиганд 7 (CCL7)	CCL7 представляет собой хемотаксический фактор, который привлекает моноциты и эозинофилы, но не нейтрофилы. CCL7 также усиливает противоопухолевую активность моноцитов. Также индуцирует высвобождение желатиназы B.
5	Хемокиновый (C-X-C-мотив) лиганд 9 (CXCL9)	CXCL9 представляет собой цитокин, который влияет на рост, передвижение или активированное состояние клеток, которые участвуют в иммунном и воспалительном ответе. Хемотаксичен для активированных Т-клеток.
	Хемокиновый (C-X-C-мотив) лиганд 10 (CXCL10)	Хемокиновый (C-X-C-мотив) лиганд 10 (CXCL10) представляет собой малый цитокин, который играет роль в хемоаттракции клеток иммунной системы, адгезии Т-клеток к эндотелиальным клеткам, противоопухолевой активности и ангиогенезе.
10	Хемокиновый (C-X-C-мотив) лиганд 12 (CXCL12)	Хемокиновый (C-X-C-мотив) лиганд 12 (CXCL12), также известный как фактор 1, выделенный из стромальных клеток (SDF-1), представляет собой малый цитокин, который принадлежит к семейству интеркринов, члены которого активируют лейкоциты и часто индуцируются провоспалительными стимулами, такими как LPS, TNF или ILL
	Хемокиновый (C-C-мотив) рецептор 7 (CCR7)	CCR7 представляет собой рецептор к MIP-3-бета хемокину. Вероятный медиатор действия EBV на В-лимфоциты или нормальных функций лимфоцитов.
15	Хемокиновый (C-C-мотив) лиганд 19 (CCL19), также известный как MIP-3 β	CCL19 играет роль не только в воспалительных и иммунологических ответах, но также и в нормальной рециркуляции и хоуминге лимфоцитов. CCL19 играет важную роль в направленной миграции Т-клеток в тимус и миграции Т-клеток и В-клеток во вторичные лимфоидные органы. Он специфично связывается с хемокиновым рецептором CCR7.
	СС хемокиновый лиганд 21 (CCL21)	CCL21 ингибирует гемопоэз и стимулирует хемотаксис. CCL21 хемотаксичен <i>in vitro</i> для тимоцитов и активированных Т-клеток, но не для В-клеток, макрофагов или нейтрофилов.
20	Интерлейкин-8 (IL-8)	IL-8 представляет собой хемотаксический фактор, который привлекает нейтрофилы, базофилы и Т-клетки, но не моноциты. Он также вовлечен в активацию нейтрофилов. Он

Иммуномодулятор	Функция	
	высвобождается несколькими типами клеток в ответ на воспалительный стимул.	
Факторы роста		
20	Колониестимулирующий фактор гранулоцитов/макрофагов (GM-CSF)	GM-CSF представляет собой цитокин, который стимулирует и дифференцировку гематопоэтических клеток-предшественников из различных линий, включая гранулоциты, макрофаги, эозинофилы и эритроциты.
25	Лиганд FMS-подобного рецептора с тирозинкиназной активностью (лиганд FLT3/FLK2, Flt3L)	Лиганд FMS-подобного рецептора с тирозинкиназной активностью (лиганд FLT3/FLK2, Flt3L), который может функционировать как рецептор фактора роста на гематопоэтических стволовых клетках или клетках-предшественниках, или обоих типах клеток.
	TGF-А	TGF-альфа представляет собой митогенный полипептид, который способен связываться с рецептором EGF и действовать синергично с TGF-бета, чтобы вызвать независимую от наличия подложки пролиферацию клеток в мягком агаре.
Адьюванты		
30	Бета-дефензин	Бета-дефензины представляют собой противомикробные пептиды, участвующие во врожденном иммунном ответе против многих грамотрицательных и грамположительных бактерий, грибков и вирусов.
	Белки высокомобильной группы-1 (HMGB1)	Белки высокомобильной группы-1 (HMGB1) представляют собой негистонные хромосомные белки, которые действуют как цитокины, опосредуя местный и системный ответы на некротическую гибель клеток и рак, инвазию патогенов, травму и сепсис.
35	S100	Фагоцитарные белки S100 опосредуют воспалительные ответы и привлекают воспалительные клетки в места повреждения ткани, и представляют собой члены семейства молекул молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением (DAMP), которые важны для врожденного иммунитета.
	Маннан	Маннан, полисахарид растений, который представляет собой полимер сахара маннозы, используют для выработки иммунного ответа.
40	Бацилла Кальметта-Герена (BCG)	Бацилла Кальметта-Герена (BCG), живые ослабленные виды микобактерий, применяют в качестве вакцины для предупреждения тяжелого и смертельного туберкулеза.
	Бактериальные липополисахариды (LPS)	Бактериальные липополисахариды (LPS) представляют собой эндотоксины, которые вызывают сильный иммунный ответ при инфицировании грамотрицательными бактериями.
	Костимулирующие молекулы (положительный эффект)	
45	Лиганд OX40	Лиганд OX40 (OX40L) принадлежит к членам 4 суперсемейства лигандов фактора некроза опухоли (Tnfsf4), экспрессируется на дендритных клетках и вызывает дифференцировку Th2-клеток.
	Лиганд 4-1 ВВ (4-1BBL)	Лиганд 4-1 ВВ (4-1BBL) принадлежит к членам 9 суперсемейства лигандов фактора некроза опухоли (Tnfsf9), он представляет собой трансмембранный гликопротеин 2

Иммуномодулятор	Функция	
	типа и экспрессируется на активированных Т лимфоцитах. 4-1BBL вызывает пролиферацию активированных Т-клеток периферической крови и играет роль в индуцированной активацией гибели клеток (AICD).	
45	CD40	Белок CD40 принадлежит к членам 5 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли, и является ключевым в опосредовании большого разнообразия иммунных и воспалительных реакций, включая зависимое от Т-клеток переключение классов иммуноглобулинов, развитие В-клеток памяти и образование зародышевого центра.
	Белок, родственный семейству индуцируемых глюкокортикоидами ре-	GITR может вызывать эффективный иммунитет к опухоли посредством стимуляции Т-клеток. Введение моноклонального антитела (mAb) против GITR может вызывать сильный противоопухолевый иммунитет и уничтожить развивающиеся опухоли, не вызывая явных аутоиммунных заболеваний.

цепторов фактора некроза опухоли (GITR)	
Лиганд GITR (GITRL)	GITRL представляет собой лиганд для GITR.
CD70	CD70 представляет собой цитокин, который связывается с CD27. Он играет роль в активации Т-клеток, индуцирует пролиферацию костимулированных Т-клеток и повышает образование цитолитических Т-клеток.
5 LIGHT (HSVgD)	Лиганд (HSVgD), связывающий медиатор входа в клетку вируса герпеса (HVEM), также называемый p30, или LIGHT, представляет собой член семейства TNF, вовлеченный в костимуляцию Т-клеток.
PD-L1 (также известный как CD274)	Белок PD-L1 (также известный как CD274) экспрессируется в активированных моноцитах, Т- и В-клетках. Экспрессия PD-L1 в моноцитах повышается при обработке IFN-гамма, а в дендритных клетках и кератиноцитах - при обработке IFN-гамма вместе с другими активаторами.
10 ICOS-L	ICOS-L представляет собой лиганд для рецептора клеточной поверхности ICOS, специфичного для Т-клеток, и действует как костимулирующий сигнал для пролиферации Т-клеток и секреции цитокинов; также индуцирует пролиферацию В-клеток и их дифференцировку в плазматические клетки.
Костимулирующие молекулы (отрицательный эффект)	
15 Антитела против CTLA4	Белок 4, связанный с цитотоксическими Т-лимфоцитами, (CTLA4) представляет собой член суперсемейства иммуноглобулинов и является костимулирующей молекулой, экспрессируемой в активированных Т-клетках.
Антитела против PD-L1	Связывание PD-L1 с рецептором PD-1 на Т-клетках приводит к передаче отрицательного костимулирующего сигнала в клетке, который предотвращает прохождение клетки по клеточному циклу и повышает пролиферацию Т-клеток. Ингибиция взаимодействия между PD-L1 и рецептором на Т-клетке с помощью антитела против PD-L1 приводит к снижению иммунного ответа, названного анергией иммунной клетки.
20 Антитела против PD-L2	PD-12 участвует в передаче костимулирующего сигнала, необходимого для пролиферации Т-лимфоцитов и продукции

Иммуномодулятор	Функция
20	IFN-гамма, независимо от PDCD1, но известно, что этот лиганд, главным образом, действует через PD-1, что приводит к анергическим ответам.
Молекулы, направленные против иммунных супрессоров (ингибиторы толерантности)	
25 TGFR2DN	При связывании лиганда, TGFR2 образует рецепторный комплекс, состоящий из двух трансмембранных серин/треонинкиназ II типа и двух I типа. Рецепторы II типа фосфорилируют и активируют рецепторы I типа, которые аутофосфорилируются, затем связывают и активируют регуляторы транскрипции SMAD. Рецептор для TGF-бета. Деления предсказанного серин/треонинкиназного цитоплазматического домена (нуклеотиды 1172-2036 кДНК TGFR2 H2-3FF, доступна в открытых базах данных под номером доступа M85079, и последовательность аминокислот, доступная под номером доступа AAA61164) нарушает экспрессию, зависимую от всех трех генов TGF-Р (1, 2 и 3).
Антитела против TGF β	TGF- β представляет собой многофункциональный белок, который регулирует пролиферацию, дифференцировку и другие функции во многих типах клеток. TGF- β , действуя синергично с TGF α , вызывает трансформацию клеток. Он также действует как негативный аутокринный фактор роста. Нарушенная регуляция активации и передачи сигнала TGF β может привести к апоптозу. Введение антитела против TGF- β может предотвратить почечную недостаточность и гломерулосклероз у мышей db/db, модели диабета II типа, у которых развивается явная нефропатия.
30 Антитела против IL-10	IL-10 представляет собой цитокин, продуцируемый активированными Th2-клетками, В-клетками, кератиноцитами, моноцитами и макрофагами. IL-10 используют, чтобы вызвать рост и дифференцировку активированных В-клеток человека, ингибирование Th1-ответов для предотвращения отторжения трансплантата и опосредованных Т-клетками аутоиммунных заболеваний.
Антитела против супрессора передачи сигнала цитокинов 1 (SOCS1)	Супрессор передачи сигнала цитокинов 1 (SOCS1) представляет собой основной ингибитор передачи сигнала от интерферона-гамма и предотвращает потенциально смертельное действие данного цитокина у новорожденных.
35 Антитела против TGF- α	TGF- α представляет собой митогенный полипептид, который способен связываться с рецептором EGF и действовать синергично с TGF- β , чтобы вызвать независимую от наличия подложки пролиферацию клеток в мягком агаре.
Fas содержит цитоплазматический Fas-ассоциированный белок с доменом смерти (FADD)	FADD необходим для индуцируемой Fas и TNF передачи сигнала программированной гибели клетки (апоптоза) и олигомеризации рецептора.

40 [000350] Биологические активности IL-12 также хорошо известны и включают дифференцировку наивных Т-клеток в Th1-клетки, стимуляцию роста и функционирования Т-клеток, продукцию интерферона-гамма (IFN-гамма) и фактора некроза опухоли-альфа (TNF- α) Т-клетками и клетками - естественными киллерами (NK), снижение опосредованного IL-4 подавления IFN-гамма, усиление цитотоксической активности NK-клеток и цитотоксических CD8 $^{+}$ Т-лимфоцитов, стимуляцию экспрессии IL-12R- β 1 и IL-12R- β 2, содействие презентации опухолевых антигенов с помощью повышения регуляции молекул МНС I и II класса и анти-ангиогенную активность, но не ограничиваются ими. В объем термина "белок, обладающий функцией IL-12" входят мутанты последовательности IL-12 дикого типа, в которых последовательность дикого

типа была изменена путем одной или нескольких вставок, делеций или замен аминокислот, а также не относящиеся к IL-12 белки, которые имитируют одну или более биологических активностей IL-12.

[000351] В данной заявке термины "активация" или "активируют" относятся к любому

измеримому повышению клеточной активности генного переключателя, приводящему к экспрессии интересующего гена (например, выбранного из IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10R или его субъединицы DN, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, IL-24, IL-27, GM-CSF, IFN-альфа, IFN-гамма, CCL3 (MIP-1a), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP3), XCL1 (лимфотактина), CXCL1 (MGSA-альфа), CCR7, CCL19 (MIP-3b), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10), CXCL12 (SDF-1), CCL21 (6Ckine), OX40L, 4-1BBL, CD40, CD70, GITRL, LIGHT, b-дефензина, HMGB1, Flt3L, IFN-бета, TNF-альфа, dnFADD, TGF-альфа, РНКи PD-L1, антисмыслового олигонуклеотида PD-L1, TGFbRII DN, ICOS-L и S100.

[000352] В данной заявке термины "лечить" или "лечение" заболевания относятся к выполнению протокола, который может включать введение одного или нескольких

лекарственных средств или сконструированных *in vitro* клеток млекопитающему (человеку или не относящемуся к человеку млекопитающему), с целью смягчить признаки или симптомы заболевания. Таким образом, "лечить" или "лечение" не должны обязательно толковаться как требующие полного смягчения признаков или симптомов, они не требуют излечения и, в частности, включают протоколы, которые оказывают

лишь незначительное влияние на субъекта.

[000353] В данной заявке термин "иммунные клетки" содержит дендритные клетки, макрофаги, нейтрофилы, тучные клетки, эозинофилы, базофилы, клетки - естественные киллеры и лимфоциты (например. В- и Т-клетки).

[000354] В данной заявке термины "дендритные клетки" и "DC" используются

взаимозаменяямо.

[000355] В данной заявке термин "вспомогательные клетки для терапии" (TSC) описывает клетки, которые можно модифицировать (например, трансфицировать, электропорировать и т.д.) вектором согласно настоящему изобретению, чтобы доставить один или более белков, обладающих функцией иммуномодулятора, и, возможно, белок, обладающий функцией IL-12, в микроокружение опухоли. Такие TSC включают стволовые клетки, фибробласти, эндотелиальные клетки и кератиноциты, но не ограничены ими.

[000356] В данной заявке термины "сконструированные *in vitro* иммунные клетки", или "популяция сконструированных *in vitro* иммунных клеток", или "популяция

сконструированных иммунных клеток", или "иммунные клетки, экспрессирующие иммуномодулятор", или "иммунные клетки, экспрессирующие IL-12", относятся к иммунным клеткам, например, дендритным клеткам, при определенных условиях экспрессирующим иммуномодулятор и/или IL-12, в зависимости от конкретного случая, под контролем генного переключателя, который можно активировать с помощью

активирующего лиганда.

[000357] В данной заявке термины "сконструированные *in vitro* TSC", или

"сконструированная *in vitro* популяция TSC", или "популяция сконструированных TSC", или "TSC, экспрессирующие иммуномодулятор", или "TSC, экспрессирующие IL-12", относятся к вспомогательным клеткам для терапии, например, стволовым клеткам, фибробластам, эндотелиальным клеткам и кератиноцитам, при определенных условиях экспрессирующим иммуномодулятор и/или IL-12, в зависимости от конкретного случая, под контролем генного переключателя, который можно активировать с помощью активирующего лиганда.

[000358] В данной заявке термин "модифицированная клетка" относится к клеткам, которые были изменены с помощью процесса, включающего трансфекции, электропорации, микроинъекции, трансдукции, слияния клеток, применения дексстрана DEAE, преципитации фосфатом кальция и липофекции (слияния лизосом), но не ограничивающегося ими.

[000359] В данной заявке термины "МОИ" или "множественность заражения" относятся к среднему количеству аденоовирусных частиц, которые заражают отдельную клетку в конкретном эксперименте (например, рекомбинантного аденоовируса или контрольного аденоовируса).

[000360] В данной заявке термин "опухоль" относится ко всему доброкачественному или злокачественному росту и пролиферации клеток, либо *in vivo*, либо *in vitro*, либо к предраковым, либо к раковым клеткам и/или тканям.

[000361] Примеры раков, которые можно лечить согласно настоящему изобретению, включают рак молочной железы, рак предстательной железы, лимфому, рак кожи, рак поджелудочной железы, рак толстой кишки, меланому, злокачественную меланому, рак яичников, рак мозга, первичную карциному мозга, рак головы и шеи, глиому, глиобластому, рак печени, рак мочевого пузыря, немелкоклеточную карциному легкого, карциному головы и шеи, карциному груди, карциному яичника, карциному легкого, мелкоклеточную карциному легкого, опухоль Вильмса, карциному шейки матки,

тестикулярную карциному, карциному мочевого пузыря, карциному поджелудочной железы, карциному желудка, карциному толстой кишки, карциному предстательной железы, карциному мочеполовой системы, рак щитовидной железы, карциному пищевода, миелому, множественную миелому, карциному надпочечников, почечноклеточную карциному, карциному эндометрия, карциному коры надпочечников,

злокачественную инсулину поджелудочной железы, злокачественную карциноидную карциному, хориокарциному, фунгоидный микоз, злокачественную гиперкальциемию, гиперплазию шейки матки, лейкемию, острую лимфоцитарную лейкемию, хроническую лимфоцитарную лейкемию, острую миелогенную лейкемию, хроническую миелогенную лейкемию, хроническую гранулоцитарную лейкемию, острую гранулоцитарную лейкемию, волосатоклеточную лейкемию, нейробластому, рабдомиосаркому, саркому Капоши, истинную полицитемию, эссенциальный тромбоцитоз, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, саркому мягких тканей, мезотелиому, остеогенную саркому, первичную макроглобулинемию и ретинобластому, и тому подобные раки.

[000362] Настоящее изобретение обеспечивает конструирование клеток, например, иммунных клеток и TSC таким образом, что они при определенных условиях экспрессируют белок, обладающий функцией иммуномодулятора, и возможно IL-12, и терапевтическое использование и/или применение для лечения рака или опухолей, или обоих. Сконструированные *in vitro* иммунные клетки и TSC, которые при определенных условиях экспрессируют белок, обладающий функцией иммуномодулятора, и возможно

IL-12, представляют собой безопасное усовершенствование конститутивной продукции белка (белков). Дополнительно, возможность контролировать время и уровень экспрессии иммуномодулятора и возможно экспрессии IL-12 обеспечивает улучшенный контроль эффективности лечения. Следовательно, сконструированные *in vitro* иммунные клетки и TSC могут входить в состав фармацевтических композиций как лекарства для

лечения рака или опухоли у человека или не относящегося к человеку организма. В качестве альтернативы, сконструированные *in vitro* популяции иммунных клеток, TSC или их субпопуляции можно применять в качестве носителей для доставки при определенных условиях иммуномодулятора и возможно белка IL-12 для их продукции

в определенной области (нормальная ткань, рак или опухоль) организма человека или не относящегося к человеку организма. Указанные иммунные клетки могут представлять собой аутологические или неаутологические дендритные клетки. Дендритные клетки можно выделить из костного мозга или из периферического кровообращения. У

5 пациентов-людей популяции дендритных клеток можно выделить с помощью процедуры лейкафереза, при которой выделяют и удаляют фракцию белых кровяных клеток и вводят обратно пациенту другие компоненты крови.

[000363] В другом варианте реализации настоящего изобретения, указанные дендритные клетки можно получить путем трансфекции гематопоэтических стволовых 10 клеток человека вектором согласно настоящему изобретению, экспрессирующем белок, обладающий функцией иммуномодулятора, и возможно белок, обладающий функцией IL-12, и дифференцировки трансфицированной стволовой клетки с получением дендритной клетки. См. патент США 6,734,014.

[000364] В одном варианте реализации настоящего изобретения, обеспечен

15 аденоовирусный вектор нуклеиновых кислот, содержащий генный переключатель, в котором кодирующие последовательности для VP16-RXR и Gal4-EcR, разделенные последовательностью участка внутренней посадки рибосомы (IRES) EMCV, вставлены в аденоовирусный членочный вектор под контролем промотора С убиквитина человека. Кодирующие последовательности для субъединиц p40 и p35 IL12, разделенные 20 последовательностью IRES и помещенные под контроль синтетического индуцируемого промотора, вставляют против хода транскрипции от промотора С убиквитина.

[000365] В другом варианте реализации, настоящее изобретение обеспечивает членочный вектор, несущий единицы транскрипции (VP16-RXR и Gal4-EcR) для двух гибридных белков и индуцируемые субъединицы IL-12, рекомбинированные с 25 аденоовирусным остовом (AdEasy1) в клетках E. coli BJ5183. После проверки рекомбинантного клона, плазмиду, несущую геном rAd.RheoIL12, растят в клетках XL10-Gold, а затем очищают от них, расщепляют плазмидный остов и упаковывают путем трансфекции в клетки HEK 293.

[000366] В конкретном варианте реализации настоящего изобретения, полученный

30 в результате этого первичный вирусный сток амплифицируют путем повторной инфекции клеток HEK 293 и очищают с помощью центрифугирования в градиенте плотности CsCl.

[000367] В одном варианте реализации настоящего изобретения, последовательность гена иммуномодулятора и/или гена IL-12 представляет собой последовательность гена 35 дикого типа. В другом варианте реализации настоящего изобретения, последовательность гена иммуномодулятора и/или гена IL-12 представляет собой модифицированную последовательность гена, например, химерную последовательность или последовательность, которая была модифицирована таким образом, чтобы использовались предпочтительные кодоны.

40 [000368] В одном варианте реализации настоящего изобретения, последовательность гена иммуномодулятора и/или гена IL-12 представляет собой последовательность дикого типа человека. В другом варианте реализации настоящего изобретения, последовательность по меньшей мере на 85% идентична последовательности дикого типа человека, например, по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентична

45 последовательности дикого типа человека. В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения, последовательность гена кодирует полипептид человека. В другом варианте реализации настоящего изобретения, ген кодирует полипептид, который по меньшей мере на 85% идентичен полипептиду дикого типа человека, например, по

меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичен полипептиду дикого типа человека.

[000369] В одном варианте реализации настоящего изобретения, ген IL-12 представляет собой последовательность дикого типа IL-12 мыши. В другом варианте реализации настоящего изобретения, указанная последовательность по меньшей мере на 85% идентична последовательности дикого типа IL-12 мыши, например, по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентична последовательности дикого типа IL-12 мыши. В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения, последовательность гена IL-12 кодирует полипептид IL-12 мыши. В другом варианте реализации настоящего изобретения, указанный ген кодирует полипептид, который по меньшей мере на 85% идентичен полипептиду дикого типа IL-12 мыши, например, по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичен полипептиду дикого типа IL-12 мыши.

[000370] Дендритные клетки (DC) можно выделить из костного мозга людей, мышей или других млекопитающих. Дендритные клетки можно выделить из крови людей, мышей или других млекопитающих. У пациентов-людей, популяции дендритных клеток можно выделить с помощью процедуры лейкафереза, известной в данной области, при которой выделяют и удаляют фракцию белых кровяных клеток и вливают обратно пациенту другие компоненты крови. В одном варианте реализации настоящего изобретения, DC получают из костного мозга мыши, как описано ранее (Tatsumi и др., 2003). Вкратце, костный мозг (BM) Tg мыши дикого типа или EGFP культивируют в кондиционированной среде (CM), дополненной 1000 ед./мл рекомбинантного колониестимулирующего фактора гранулоцитов/макрофагов мыши и рекомбинантным mIL-4 (Peprotech, Роки Хилл, Нью-Джерси) при 37°C в увлажненном термостате при 5% CO₂ в течение 7 дней. Затем выделяют CD11c⁺ DC, например, применяя специфичные гранулы MACSTM, следуя инструкциям изготовителя (Miltenyi Biotec, Оберн, Калифорния). Полученные таким образом CD11c⁺ DC были >95% чистыми, что выявили на основании морфологии и одновременной экспрессии CD11b, CD40, CD80 и антигенов МНС I класса и II класса.

[000371] Один вариант реализации настоящего изобретения обеспечивает сконструированные иммунные клетки и TSC, при определенных условиях экспрессирующие белок, обладающий функцией иммуномодулятора, и возможно IL-12, подходящие для терапевтического применения для лечения рака или опухоли, или обоих, в качестве генной терапии у человека или не относящегося к человеку организма. В некотором варианте реализации настоящего изобретения, настоящее изобретение обеспечивает сконструированные иммунные клетки и TSC, содержащие генный переключатель.

[000372] В другом варианте реализации, настоящее изобретение обеспечивает сконструированные иммунные клетки и TSC, содержащие по меньшей мере часть рецептора экдизона. В другом варианте реализации, настоящее изобретение обеспечивает сконструированные иммунные клетки и TSC, содержащие генный переключатель, основанный на рецепторе экдизона. В другом варианте реализации, настоящее изобретение обеспечивает сконструированные иммунные клетки и TSC, содержащие RheoSwitch. В другом варианте реализации, настоящее изобретение обеспечивает набор, включающий сконструированные иммунные клетки и TSC, содержащие генный переключатель, и лиганд, который модулирует генный переключатель. В другом варианте реализации настоящего изобретения, наборы дополнительно содержат лиганд диацилгидразин. В другом варианте реализации настоящего изобретения, набор дополнительно содержит RG-115830 или RG-115932.

[000373] В одном варианте реализации, настоящее изобретение обеспечивает сконструированную популяцию иммунных клеток и TSC. В одном варианте реализации настоящего изобретения, культивированные DC на 7 день обрабатывают рекомбинантным аденоовирусом, кодирующим иммуномодулятор и/или IL-12, экспрессия которых запускается с конститутивного или индуцируемого промотора, или инфицируют проверочным, контрольным аденоовирусным вектором (rAChψ5), в диапазоне множественности заражения (MOI). Через 48 ч. инфицированные DC собирают и анализируют их фенотип и продукцию иммуномодулятора и/или IL-12, применяя специальный набор ELISA (BD-PharMingen, Сан-Диего, Калифорния), с нижним порогом детектирования, составляющим 62.5 пг/мл.

[000374] В другом варианте реализации, настоящее изобретение обеспечивает сконструированную *in vitro* популяцию иммунных клеток и TSC, содержащих вектор, например, ДНК-вектор, включающий генный переключатель, способный при определенных условиях экспрессировать белок, обладающий функцией иммуномодулятора и/или IL-12, и дополнительно содержащий активирующий, лиганд.

[000375] В дополнительном варианте реализации, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения рака, например, меланомы или глиомы, путем введения сконструированных DC пациенту, а затем введения активирующего лиганда, такого как RG-115819, RG-115830 или RG-115932, указанному пациенту. Пациент может представлять собой человека или животного, страдающего от рака. Способы лечения и продукты, сконструированные клетки, наборы и лиганда находят применение в терапии человека и в терапии домашних животных. Следовательно, продукты и способы предполагают для применения у человека и для ветеринарных целей у животного.

[000376] В одном аспекте, настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, подходящую для введения человеку или не относящемуся к человеку субъекту, содержащую популяцию сконструированных *in vitro* иммунных клеток или TSC, экспрессирующих белок, обладающий функцией иммуномодулятора и/или IL-12, при этом указанная лекарственная форма подходит для введения внутрь опухоли. Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую активирующий лиганд, такой как RG-115819, RG-115830 или RG-115932, при этом указанная композиция подходит для введения интраперитонеальным, пероральным или подкожным путем.

[000377] В конкретном варианте реализации, описанном в данной заявке, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения опухоли, включающий следующие этапы по порядку:

- а. введение внутрь опухоли млекопитающего популяции сконструированных *in vitro* иммунных клеток или TSC; и
- б. введение указанному млекопитающему терапевтически эффективного количества активирующего лиганда.

[000378] В одном варианте реализации настоящего изобретения, активирующий лиганд вводят по существу в то же время, что и сконструированные *in vitro* иммунные клетки или TSC, например, в течение одного часа перед или после введения клеток. В другом варианте реализации настоящего изобретения, активирующий лиганд вводят через или менее чем через приблизительно 24 часа после введения сконструированных *in vitro* иммунных клеток или TSC. В еще одном варианте реализации настоящего изобретения, активирующий лиганд вводят через или менее чем через приблизительно 48 часов после введения сконструированных *in vitro* иммунных клеток или TSC. В другом варианте реализации настоящего изобретения, лиганд представляет собой RG-115932.

В другом варианте реализации настоящего изобретения, лиганд вводят в дозе, равной приблизительно от 1 до 50 мг/кг/день. В другом варианте реализации настоящего изобретения, лиганд вводят в дозе, равной приблизительно 30 мг/кг/день. В другом варианте реализации настоящего изобретения, лиганд вводят ежедневно в течение 5 периода от 7 до 28 дней. В другом варианте реализации настоящего изобретения, лиганд вводят ежедневно в течение 14 дней. В другом варианте реализации настоящего изобретения, вводят приблизительно от 1×10^6 до 1×10^8 клеток. В другом варианте реализации настоящего изобретения, вводят приблизительно 1×10^7 клеток.

[000379] В одном варианте реализации настоящего изобретения, дендритные клетки сконструированы таким образом, что они при определенных условиях экспрессируют IL-2 и IL-12. IL-2 оказывает эффективное иммунорегуляторное действие на эффекторные и регуляторные T-, NK- и NK-T-клетки. Ожидается, что экспрессия IL-2 и IL-12 в клетках приведет к взаимному повышению экспрессии рецепторов друг друга и индуцирует 10 различные биологические эффекты посредством отдельных путей передачи сигналов. Также ожидается, что комбинация IL-2 и IL-12 увеличит продолжительность иммунной стимуляции и позволит снизить эффективную дозу клеток, которая может быть лучше 15 переносима животными. См. Dietrich 2002, Wigginton 2002, 2001, 1996 и Koyama, 1997, McDermott и Atkins 2008; Bemtsen и др. 2008; Tarhim и др. 2008; Heemskerk и др. 2008; 20 Horton и др. 2008. Полинуклеотидные последовательности IL-2 доступны под номерами доступа U25676 (человека); NM_008366 (мыши); NM_204153 (цыпленка) и NM_053836 (крысы). Полинуклеотидные последовательности IL-12 доступны под номерами доступа NM_000882 (IL12A человека); NM_002187 (IL12B человека); NM_008351 (IL12a мыши); NM_008352 (IL12b мыши); NM_213588 (IL12A цыпленка); NM_213571 (IL12B цыпленка); 25 NM_053390 (IL12a крысы) и NM_022611 (IL12b крысы). SEQ ID NOS:13, 15, 21 и 23 кодируют IL-12 человека и мыши и их субъединицы.

[000380] В другом варианте реализации настоящего изобретения, дендритные клетки сконструированы таким образом, что они при определенных условиях экспрессируют IL-18 и IL-12. IL-18 индуцирует продукцию IFN-гамма и вызывает развитие T-хелперных 30 клеток и активацию NK-клеток. В добавок, IL-18 может повысить продукцию GM-CSF и понизить продукцию IL-10. Ожидается, что экспрессия IL-18 и IL-12 позволит преодолеть ограничения, наблюдаемые, когда каждый цитокин вводят отдельно. Ожидается, что экспрессия IL-12 и IL-18 в дендритных клетках будет стимулировать 35 более интенсивные Th1-ответы против опухолевого антигена, чем когда дендритные клетки трансфицируют каждым цитокином отдельно.

[000381] Внутриопухолевая инъекция DC, сконструированных таким образом, что они секретируют как IL-12, так и IL-18, вызывала наиболее высокие уровни продукции INF- γ и полное отторжение опухоли (Tatsumi 2003). См. Vujanovic, 2006. См. также Coughlin, 1998, Subleski, 206, Tatsumi, 2003, и Sabel, 2007; Shiratori и др. 2007; Lian и др. 2007; linuma и др. 2006. Полинуклеотидные последовательности IL-12 см. выше. 40 Полинуклеотидные последовательности IL-18 доступны под номерами доступа U90434 (человека); NM_008360 (мыши); EU747333 (цыпленка) и AY258448 (крысы).

[000382] В другом варианте реализации настоящего изобретения, дендритные клетки сконструированы таким образом, что они при определенных условиях экспрессируют 45 IL-15 и IL-12. IL-15 разделяет некоторые биологические активности с IL-2, что также делает его потенциально полезным для лечения рака. IL-15 стимулирует пролиферацию NK-клеток и активированных T-клеток и поддерживает экспансию эффекторных T-клеток. Сообщали, что IL-15 действовал синергично с IL-12 с повышением продукции IFN-гамма NK-клетками. Koka, 2004; Basak 2008; Lasek и др. 2004. Внутриопухолевая

доставка IL-15 и IL-12 вызывает существенную регрессию опухоли в модели меланомы (Lasek 1999). Полинуклеотидные последовательности IL-12 см. выше. SEQ ID NOS:11 и 19 кодируют IL-15 человека и мыши. На ФИГ.2 и 4 приведены карты плазмид для систем экспрессии, которые можно использовать для экспрессии IL-12 и IL-15 человека и мыши.

[000383] В другом варианте реализации настоящего изобретения, дендритные клетки сконструированы таким образом, что они при определенных условиях экспрессируют IL-21 и IL-12. IL-21 и его рецептор разделяют гомологию последовательностей с IL-2 и IL-15. IL-21 вызывает экспансию и созревание NK-клеток. Биологическое действие IL-

10 21 потенциально синергично с IL-12, так как обработка NK-клеток IL-21 приводит к существенному повышению экспрессии рецептора IL-12. Вдобавок, IL-21 может повышать передачу сигнала IL-12 и содействовать ему в повышении продукции IFN-гамма. Полинуклеотидные последовательности IL-12 см. выше. Полинуклеотидные последовательности IL-21 доступны под номерами доступа AF254069 (человека);

15 NM_021782 (мыши); NM_001024835 (цыпленка) и NM_001108943 (крысы). SEQ ID NOS: 6, 7, 8, 9, и 17 кодируют IL-21 человека и мыши. SEQ ID NOS:1 и 2 представляют собой Полинуклеотидные конструкции, которые кодируют IL-12 и IL-21 мыши и человека. На ФИГ.7 и 8 приведены карты плазмид для систем экспрессии, которые можно использовать для экспрессии IL-12 и IL-21 человека и мыши, соответственно.

20 [000384] В другом варианте реализации настоящего изобретения, дендритные клетки сконструированы таким образом, что они при определенных условиях экспрессируют TNF-альфа и IL-12. TNF-альфа представляет собой эффективный активатор иммунных клеток, и он опосредует противоопухолевые свойства. Вдобавок, TNF-альфа может действовать синергично с IL-12 с повышением экспрессии IFN-гамма и рецептора IL-12

25 на Т-клетках. В исследовании на животных, применение как IL-12, так и TNF-альфа привело к инфильтрации опухоли DN8+ Т-клетками, существенной продукции IFN-гамма и последующей регрессии опухоли. См. Sabel, 2003, 2004, 2007, Taniguchi, 1998, Lasek, 2000; и Xia и др. 2008. Полинуклеотидные последовательности IL-12 см. выше. Полинуклеотидные последовательности, кодирующие TNF-альфа, доступны под

30 номерами доступа X02910 (человека); NM_013693 (мыши) и BC107671 (крысы).

[000385] В другом варианте реализации настоящего изобретения, дендритные клетки сконструированы таким образом, что они при определенных условиях экспрессируют IL-7 и IL-12. IL-7 представляет собой член семейства IL-2, и он важен для лимфопоэза Т-клеток и В-клеток. IL-7 регулирует гомеостаз выживаемости и пролиферации наивных

35 Т-клеток и CD8+ Т-клеток памяти. Было показано, что IL-7 повышает образование CTL против опухолей. Вдобавок, IL-12 направленно действует на CD8+ Т-клетки с повышением опосредованной IL-7 пролиферации. Дополнительно, сообщали, что IL-7 и IL-12 синергично повышают цитотоксичность CD8+ Т-клеток. Mehrotra, 1995; Sharma и др. 2003; Tirapu и др. 2002. Таким образом, ожидается, что совместная экспрессия IL-7

40 и IL-12 обеспечит оптимальные противоопухолевые ответы. Полинуклеотидные последовательности, кодирующие IL-12, см. выше. Полинуклеотидные последовательности, кодирующие IL-7, доступны под номерами доступа J04156 (человека); NM_008371 (мыши); NM_001037833 (цыпленка) и NM_013110 (крысы).

[000386] В другом варианте реализации настоящего изобретения, дендритные клетки сконструированы таким образом, что они при определенных условиях экспрессируют GM-CSF и IL-12. GM-CSF регулирует дифференцировку и пролиферацию гематopoэтических клеток-предшественников и играет особенно важную роль в созревании специальных антигенпрезентирующих клеток (APC), таких как дендритные

клетки. GM-CSF также повышает способность дендритных клеток процессировать и представлять антигены. GM-CSF функционирует иначе, чем IL-12, и оба вызывают существенные противоопухолевые ответы в исследованиях на животных. Ожидается, что комбинация IL-12 (активация Т-клеток) и GM-CSF (активация дендритных клеток)

- 5 приведет к более эффективному противоопухолевому иммунитету. В исследованиях на животных, лечение GM-CSF в комбинации с IL-12 значительно подавляло рост опухоли во множестве моделей рака. Wang, 2001; Chang, 2007; Jean, 2004; Nair, 2006; Hill 2002; Small и др. 2007. В испытаниях на человеке, GM-CSF + IL-12 успешно применяли для лечения пациентов, страдающих миеломой, у которых комбинированное действие обоих
- 10 цитокинов приводило к уменьшению количества В-клеток в кровотоке. Rasmussen, 2003; Hansson, 2007; Abdalla, 2007. Ожидается, что совместная экспрессия GM-CSF и IL-12 в одной клетке поможет избежать нежелательных системных эффектов, таких как уменьшение количества В-клеток в кровотоке. Полинуклеотидные последовательности, кодирующие IL-12, см. выше. Полинуклеотидные последовательности GM-CSF доступны
- 15 под номерами доступа M11734 (человека); NM_009969 (мыши); EU520303 (цыпленка); NM_001037660 (Csf2ra крысы) и NMJ 33555 (Csf2rb крысы).

[000387] В другом варианте реализации настоящего изобретения, дендритные клетки сконструированы таким образом, что они при определенных условиях экспрессируют хемокин (например, CCL3 (MIP-1a), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP3), XCL1 (лимфотактин),

20 CCL19 (MIP-3b), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10), CXCL12 (SDF-1) или CCL21 (6Ckine)) и JL-2. Хемокины представляют, собой, хемоаттракторные цитокины, которые регулируют направленную миграцию и активацию лейкоцитов и других типов клеток при множестве воспалительных и невоспалительных состояний. Воспалительные цитокины контролируют привлечение лейкоцитов при воспалении и повреждении ткани.

25 Гомеостатические хемокины осуществляют функции домашнего хозяйства, такие как управление перемещением лейкоцитов (например, дендритных клеток) к вторичным лимфоидным органам и внутри них, а также в костном мозге и тимусе во время гематопоэза. В исследованиях на животных, совместная внутриопухолевая инъекция двух отдельных аденоовирусов, экспрессирующих IL-12 и CXCL10, привела к 100%

30 регрессии опухолевых узелков, произошедших от линии клеток колоректальной аденоракицомы мыши CT26. Narvaiza и др., 2000, Emtage и др., 1999, описали два дважды рекомбинантных аденоовирусных вектора, экспрессирующих либо IL2 и XCL1 (лимфотактин), либо IL-12 и XCL1. Внутриопухолевая инъекция указанных векторов в аденоракицомные опухоли груди у мышей вызвала эффективные противоопухолевые

35 реакции и защитный иммунитет. В других исследованиях на животных, совместная трансдукция аденоовирусных векторов, экспрессирующих IL-12 и CCL27, привела к регрессии опухоли и длительному специальному иммунитету. Gao и др., 2007. Таким образом, ожидается, что совместная экспрессия хемокина и IL-12 согласно настоящему изобретению приведет к синергичной противоопухолевой активности.

40 [000388] В другом варианте реализации настоящего изобретения, дендритные клетки сконструированы таким образом, что они при определенных условиях экспрессируют антиангиогенный цитокин (например, IP-10 и Mig) и IL-12. IP-10 и Mig представляют собой хемоаттрактанты для Т-клеток и NK-клеток, и их способность ингибировать ангиогенез зависит от NK-клеток. Исследования на животных показали, что

45 комбинированная терапия двумя аденоовирусами, один из которых экспрессирует IP 10, а другой экспрессирует IL-12, привела к заметному совместному противоопухолевому действию. Narvaiza и др., 2000. В других исследованиях, аденоовирусные векторы, экспрессирующие IP 10 или MIG и/или IL-12, вводили внутрь опухоли в модели на мышах

аденокарциномы и фибросаркомы молочной железы. Обнаружили, что введение IP-10 или MIG в комбинации с IL-12 привело к значительной регрессии опухоли и повышенной выживаемости несущих опухоль животных по сравнению с животными, которым вводили IP-10, MIG, IL-12 отдельно, или с контрольными животными, при этом

5 комбинация IP-10, IL12 была наиболее эффективной. Palmer, 2001. См. также Mazzolini, 2003; и Huang 2004. Таким образом, ожидается, что совместная экспрессия антиангиогенного цитокина и IL-12 приведет к синергичной противоопухолевой активности.

[000389] Чтобы продемонстрировать эффективную опосредованную IL-12 генную 10 терапию, использовали кондиционную систему экспрессии кДНК, которая позволяет запускать продукцию иммуномодулятора и/или IL-12 иммунными клетками или TSC в различные моменты времени после внутриопухолевой инъекции. На основании 15 результатов для модели агрессивной меланомы B 16 у мышей C57BL/6 были сделаны следующие выводы: 1) повышенные уровни IL-12 секретируются DC.RheoIL12 в присутствии активирующего лиганда RG-115830, но не в отсутствии указанного лиганда; 2) внутриопухолевая основанная на DC.RheoIL12 терапия также эффективна, как и 20 внутриопухолевая основанная на DC.cIL12 терапия, при условии, что RG-115830 вводят животным, которых лечат, в течение 24 ч после инъекции DC (а в более поздние моменты времени предоставления лиганда терапия RG-115830 терпит неудачу); 3) экспрессия IL-12 в DC, похоже, продлевает выживаемость данных клеток в микроокружении опухоли и связана с более высоким количеством DC, инъецированных внутрь опухоли, которые 25 мигрируют в дренирующие опухоль лимфатические узлы; и 4) наиболее сильный иммунный коррелят результата терапии представляет собой уровень опухолеспецифических CD8⁺ Т-клеток, перекрестно примиренных терапией, а не количество инъецированных DC, оставшихся в микроокружении опухоли. В целом, 30 полученные результаты позволяют предположить, что основанные на DC.IL12 методы лечения, вероятно, успешны благодаря положительному влиянию на афферентные события (перекрестное примирение) эффекторов CD8⁺ Т-клеток 1 типа, но не на более поздние эфферентные события, такие как опосредованное инъецированными DC 35 привлечение противоопухолевых Т-клеток в микроокружение опухоли и т.д.

[000390] Перед внутриопухолевой инъекцией, клетки (иммунные клетки или TSC) можно обработать некоторым фактором, чтобы стимулировать активность клеток. Например, клетки можно обработать костимулирующей молекулой, такой как 40 положительно костимулирующая молекула, включая OX40L, 4-1BBL, CD40, CD40L, GITRL, CD70, LIGHT или ICOS-L, или отрицательно. костимулирующей молекулой, такой как антитела против CTLA4, антитела против PD-L1 или антитела против PD-L2. Например, клетки (например, иммунные клетки или TSC) можно инкубировать с клеткой, 45 экспрессирующей одну или более костимулирующих молекул, например, с клетками лимфомы J588, экспрессирующими молекулу лиганда CD40. В другом варианте реализации настоящего изобретения, клетки (иммунные клетки или TSC) можно обработать молекулой, направленной против иммунных супрессоров (ингибитором толерантности), такой как антитела против TGF-бета (для ингибирования передачи сигнала TGF в микроокружении), антитела против IL-10, TGFbRII DN (для ингибирования передачи сигнала TGF в генномодифицированных клетках), DN IL-10R, dnFADD (для 50 ингибирования путей клеточной гибели внутри клеток), антитела против SOCS1, миРНК или рецепторы-ловушки (для ингибирования передачи супрессорного сигнала цитокинов внутри клеток) или антитела против TGFn.

[000391] Получали рекомбинантные аденоовириусы, несущие полинуклеотидные

последовательности, показанные на Фигурах 1-8. Например, hIL-21 получали путем совместной трансфекции вектора экспрессии hIL-21, линеаризованного с помощью рестрикционного расщепления в сайте, расположенному против хода транскрипции от левого ITR, и подходящего (например, с удаленным E3) аденоовирусного остова в

5 последовательности, показанные на Фигурах 1-8. Например, hIL-21 получали путем совместной трансфекции вектора экспрессии hIL-21, линеаризованного с помощью рестрикционного расщепления в сайте, расположенному против хода транскрипции от левого ITR, и подходящего (например, с удаленным E3) аденоовирусного остова в

10 пермиссивную линию клеток, такую как клетки HEK293. Аденоовирусный вектор, несущий иммуномодуляторные гены мыши, использовали для трансдукции дендритных клеток или TSC мыши для применения в терапевтических моделях на мышах. Для терапевтических применений у человека, полинуклеотид, кодирующий человеческий гомолог иммуномодуляторного гена, вставляли в подходящий вектор. Аденоовирусный

15 вектор для терапевтического применения у человека получали при условиях GMP (надлежащей производственной практики). Пример схемы лечения (клинического испытания) пациентов, страдающих меланомой III/IV стадии, описан далее. Лечение в

данном случае включало внутриопухолевую инъекцию трансфицированных

аденоовирусом дендритных клеток и ежедневное пероральное введение в течение 14

15 дней активаторного средства (лиганда). Субъектов подвергали скринингу от 30 дней

до одной недели до клинического испытания. Каждого субъекта просили подписать

информированное согласие перед началом проведения каких-либо процедур.

Исследователь информировал субъектов о природе, целях, продолжительности,

потенциальной опасности и процедурах, которые будут выполняться во время

20 испытания, и о вероятности того, что их медицинские карты может проверять FDA (Управление по контролю качества продовольствия и медикаментов). Субъектов (всего от 16 до 20) произвольно разделили на 4 группы. Все группы получали

внутриопухолевую инъекцию до 5×10^7 трансфицированных дендритных клеток, приблизительно через 3 часа после перорального введения первой дозы лиганда. 4

25 группы отличались по получаемой ежедневно пероральной дозе лиганда: например, группа 1 = 0.01 мг/кг; группа 2 = 0.3 мг/кг; группа 3 = 1 мг/кг; группа 4 = 3 мг/кг. Во время курса лечения, отбирали кровь в определенные промежутки времени для оценки однократной дозы и стационарной фармакокинетики активаторного лекарственного средства и его основных метаболитов. Также, кровь отбирали в определенные моменты

30 времени для оценки гуморального и клеточного иммунных ответов против вирусного вектора, компонентов RTS и опухоли. Собирали мочу и отбирали кровь в определенные моменты времени для химического анализа сыворотки, анализа мочи и гематологии (показатели безопасности). Биопсии опухоли и/или дренирующего опухоль

35 лимфатического узла брали в определенные моменты времени для оценки экспрессии трансгена и иммунного ответа на опухоль в результате терапии. Для пациентов устанавливали критерии раннего прекращения испытания в случае возникновения

нежелательных явлений, и нежелательные явления регистрировали. За пациентами

наблюдали в течение 1, 2, 3 и 4 месяцев для обнаружения нежелательных явлений и

результата терапии.

40 [000392] В другом варианте реализации настоящего изобретения, субъекту, нуждающемуся в лечении опухоли, (а) вводят дендритные клетки, сконструированные таким образом, что они экспрессируют иммуномодулятор, например, иммуномодулятор, описанный в данной заявке, либо конститутивно, либо при определенных условиях, и

45 (б) вектор, экспрессирующий иммуномодулятор, например, иммуномодулятор, описанный в данной заявке, либо конститутивно, либо при определенных условиях;

путем внутриопухолевой инъекции субъекту. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, дендритные клетки сконструированы таким образом, что они

45 экспрессируют вектор Ad-иммуномодулятор и, в частности, вектор Ad-RTS-

иммуномодулятор. В другом предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, вектор, который вводят путем внутриопухолевой инъекции субъекту, представляет собой вектор Ad-иммуномодулятор и, в частности, вектор Ad-RTS-иммуномодулятор.

- 5 [000393] В другом варианте реализации настоящего изобретения, субъекту, нуждающемуся в лечении опухоли, (а) вводят дендритные клетки, сконструированные таким образом, что они экспрессируют IL-12, либо конститутивно, либо при определенных условиях, и (б) вектор, экспрессирующий IL-12, либо конститутивно, либо при определенных условиях, путем внутриопухолевой инъекции субъекту. В 10 предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, дендритные клетки сконструированы таким образом, что они экспрессируют вектор Ad-IL-12, и, в частности, вектор Ad-RTS-IL-12. В другом предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, вектор, который вводят путем внутриопухолевой инъекции субъекту, представляет собой вектор Ad-IL-12, и, в частности, вектор Ad-RTS-IL-12.
- 15 [000394] В другом варианте реализации настоящего изобретения, субъекту, нуждающемуся в лечении опухоли, (а) вводят дендритные клетки, сконструированные таким образом, что они экспрессируют IL-12, либо конститутивно, либо при определенных условиях, и (б) субъекту вводят один или более противораковых химиотерапевтических агентов. В предпочтительном варианте реализации настоящего 20 изобретения, сконструированные дендритные клетки сконструированы таким образом, что они экспрессируют вектор Ad-IL-12, и, в частности, вектор Ad-RTS-IL-12. Указанный один или более противораковых химиотерапевтических агентов можно вводить перед введением сконструированных дендритных клеток, после введения сконструированных дендритных клеток или одновременно с введением сконструированных дендритных 25 клеток. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, указанный противораковый химиотерапевтический агент представляет собой паклитаксел, производное или аналог паклитаксела, темозоломид, производное или аналог темозоломида, сунитиниб, производное или аналог сунитиниба, гемцитабин, или производное или аналог гемцитабина.
- 30 [000395] В другом варианте реализации настоящего изобретения, субъекту, нуждающемуся в лечении опухоли, (а) вводят дендритные клетки, сконструированные таким образом, что они экспрессируют IL-12, либо конститутивно, либо при определенных условиях, (б) вектор, экспрессирующий IL-12, либо конститутивно, либо при определенных условиях, путем внутриопухолевой инъекции субъекту, и (с) 35 указанному субъекту вводят один или более противораковых химиотерапевтических агентов. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, дендритные клетки сконструированы таким образом, что они экспрессируют вектор Ad-IL-12, и, в частности, вектор Ad-RTS-IL-12. В другом предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, вектор, который вводят путем внутриопухолевой инъекции 40 субъекту, представляет собой вектор Ad-IL-12, и, в частности, вектор Ad-RTS-IL-12. Указанный один или более противораковых химиотерапевтических агентов можно вводить перед введением сконструированных дендритных клеток и вектора, экспрессирующего IL-12, после введения сконструированных дендритных клеток и вектора, экспрессирующего IL-12, или одновременно с введением сконструированных 45 дендритных клеток и вектора, экспрессирующего IL-12. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, указанный противораковый химиотерапевтический агент представляет собой паклитаксел, производное или аналог паклитаксела, темозоломид, производное или аналог темозоломида, сунитиниб, производное или

аналог сунитиниба, гемцитабин, или производное или аналог гемцитабина.

[000396] В другом варианте реализации настоящего изобретения, субъекту, нуждающемуся в лечении опухоли, (а) вводят дендритные клетки, сконструированные таким образом, что они экспрессируют иммуномодулятор, например, иммуномодулятор, описанный в данной заявке, либо конститутивно, либо при определенных условиях, и

5 (б) вектор, экспрессирующий иммуномодулятор, например, иммуномодулятор, описанный в данной заявке, либо конститутивно, либо при определенных условиях, путем внутриопухолевой инъекции субъекту. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, дендритные клетки сконструированы таким образом, что они 10 экспрессируют вектор Ad-иммуномодулятор и, в частности, вектор Ad-RTS-иммуномодулятор. В другом предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, вектор, который вводят путем внутриопухолевой инъекции субъекту, представляет собой вектор Ad-IL-иммуномодулятор, и, в частности, вектор Ad-RTS-иммуномодулятор.

15 [000397] В другом варианте реализации настоящего изобретения, субъекту, нуждающемуся в лечении опухоли, (а) вводят дендритные клетки, сконструированные таким образом, что они экспрессируют иммуномодулятор, например, иммуномодулятор, описанный в данной заявке, либо конститутивно, либо при определенных условиях, и (б) указанному субъекту вводят один или более противораковых химиотерапевтических

20 агентов. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, сконструированные дендритные клетки сконструированы таким образом, что они экспрессируют вектор Ad-иммуномодулятор и, в частности, вектор Ad-RTS-иммуномодулятор. Указанный один или более противораковых химиотерапевтических агентов можно вводить перед введением сконструированных дендритных клеток, после

25 введения сконструированных дендритных клеток или одновременно с введением сконструированных дендритных клеток. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, противораковый химиотерапевтический агент представляет собой паклитаксел, производное или аналог паклитаксела, темозоломид, производное или аналог темозоломида, сунитиниб, производное или аналог сунитиниба, гемцитабин 30 или производное или аналог гемцитабина.

[000398] В другом варианте реализации настоящего изобретения, субъекту, нуждающемуся в лечении опухоли, (а) вводят дендритные клетки, сконструированные таким образом, что они экспрессируют иммуномодулятор, например, иммуномодулятор, описанный в данной заявке, либо конститутивно, либо при определенных условиях, (б)

35 вектор, экспрессирующий иммуномодулятор, например, иммуномодулятор, описанный в данной заявке, либо конститутивно, либо при определенных условиях, путем внутриопухолевой инъекции субъекту, и (с) субъекту вводят один или более противораковых химиотерапевтических агентов. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, дендритные клетки сконструированы таким

40 образом, что они экспрессируют вектор Ad-иммуномодулятор и, в частности, вектор Ad-RTS-иммуномодулятор. В другом предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, вектор, который вводят путем внутриопухолевой инъекции субъекту, представляет собой вектор Ad-иммуномодулятор и, в частности, вектор Ad-RTS-иммуномодулятор. Указанный один или более противораковых

45 химиотерапевтических агентов можно вводить перед введением сконструированных дендритных клеток и вектора, экспрессирующего иммуномодулятор, после введения сконструированных дендритных клеток и вектора, экспрессирующего иммуномодулятор, или одновременно с введением сконструированных дендритных клеток и вектора,

экспрессионного иммуномодулятора. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, противораковый химиотерапевтический агент представляет собой паклитаксел, производное или аналог паклитаксела, темозоломид, производное или аналог темозоломида, сунитиниб, производное или аналог сунитиниба, гемцитабин или производное или аналог гемцитабина.

[000399] В любом из способов согласно настоящему изобретению, указанное заболевание или расстройство может представлять собой заболевание или расстройство, описанное в настоящей заявке. В одном варианте реализации настоящего изобретения, указанное заболевание или расстройство представляет собой заболевание или

расстройство, приведенное в Таблице 1 в данной заявке. В другом варианте реализации настоящего изобретения, указанное заболевание или расстройство представляет собой заболевание или расстройство, приведенное в Таблице 3 в данной заявке.

[000400] В любом из способов согласно настоящему изобретению, рак или опухоль может представлять собой заболевание или расстройство, описанное в настоящей

заявке. В одном варианте реализации настоящего изобретения, рак или опухоль представляет собой рак или опухоль, приведенные в Таблице 1 в данной заявке. В другом варианте реализации настоящего изобретения, рак или опухоль представляет собой рак или опухоль, приведенные в Таблице 3 в данной заявке.

[000401] Можно измерить влияние экспрессии иммуномодулятора и/или IL-12 на популяцию клеток путем измерения уровня экспрессии или активности цитокина типа Th1/Tc1, IFN-гамма, в биологическом образце из пациента.

[000402] Для целей настоящего изобретения, настоящее изобретение обеспечивает способ определения эффективности схемы лечения ракового пациента, основанной на сконструированных *in vitro* иммунных клетках или TSC, включающий:

а. измерение уровня экспрессии, или уровня активности, или обоих уровней для интерферона-гамма (IFN-гамма) в первом биологическом образце, полученном из пациента-человека, перед введением сконструированных *in vitro* клеток, например, иммунных клеток или TSC, таким образом получая контрольный уровень;

б. введение внутрь опухоли указанного пациента сконструированных *in vitro* клеток;

в. введение указанному пациенту эффективного количества активирующего лиганда;

г. измерение уровня экспрессии, или уровня активности, или обоих уровней для IFN-гамма во втором биологическом образце, полученном от указанного пациента в некоторый момент времени после введения указанного активирующего лиганда, таким образом получая результаты для *l* тестового уровня; и

д. сравнение контрольного уровня с тестовым уровнем IFN-гамма, при этом результаты, указывающие на повышение уровня экспрессии, активности, или обоих уровней для IFN-гамма в тестовом уровне относительно контрольного уровня, указывают на то, что схема лечения эффективна для указанного пациента. Настоящее изобретение также возможно может включать дополнительные этапы, перечисленные

далее:

е. проведение биопсии и подсчет инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) и/или

ж. наблюдение регрессии опухоли в ответ на лечение.

[000403] Термин "субъект" означает интактное насекомое, растение или животное. Также ожидается, что лиганда будут работать в равной степени хорошо, когда субъект будет представлять собой грибок или дрожжи. Животные, в которых используют настоящее изобретение, включают позвоночных, например, млекопитающих, таких как люди, грызуны, обезьяны и другие животные, но не ограничены ими, при этом люди или мыши наиболее предпочтительны. Другие животные включают домашних

животных, таких как собаки, коты, лошади, крупный рогатый скот, овцы, козы, свиньи и тому подобные.

[000404] Без привязки к какой-либо теории, ожидается, что настоящее изобретение будет содействовать применению генной терапии вводимыми внутрь опухоли

5 сконструированными *in vitro* иммунными клетками и TSC в клинической практике, уделяя особое внимание объективным клиническим ответам как первостепенному ожидаемому результату исследования и примированным противоопухолевым CD8⁺ T-клеткам (продуцирующим IFN-гамма) как второстепенному ожидаемому результату исследования. Возможность включать и выключать экспрессию иммуномодулятора и/ 10 или IL-12 *in vivo* повышает безопасность и терапевтический контроль над лечением, поскольку как время, так и уровень экспрессии белка можно контролировать с помощью введения лиганда, и дополнительно поскольку ожидают, что время экспрессии иммуномодулятора и/или IL-12 крайне важно для терапевтической эффективности указанного способа.

15 [000405] Настоящее изобретение дополнительно способствует терапевтическому применению сконструированных *in vitro* клеток со вставленными генами, экспрессируемыми при определенных условиях, как инновационному подходу для эффективного и действенного лечения заболеваний человека.

20 [000406] В случае противоречия между какой-либо идеей или предположением в любом из ссылочных материалов, цитируемых в них и настоящем описании, последнее должно иметь приоритетное значение для целей настоящего изобретения.

[000407] Все патенты, заявки на патент и публикации, цитированные в данной заявке, полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки.

25 [000408] Должно быть очевидно, что описанные выше варианты реализации и пояснительные примеры не предполагаются ограничивающими в каком-либо отношении объем настоящего изобретения, и что подразумевается, что в объем формулы изобретения, приведенной в данной заявке, входят все варианты реализации и пояснительные примеры, независимо от того, представлены они явным образом в данной заявке или нет.

30 [000409] Патентная заявка США номер 12/247,738 с названием "Engineered Dendritic Cells And Uses For Treatment Of Cancer", поданная 8 октября 2008 г., настоящим полностью включена посредством ссылки. Патентная заявка США номер 12/241,018 с названием "Therapeutic Gene-Switch Constructs And Bioreactors For The Expression Of Biotherapeutic Molecules, And Uses Thereof, поданная 29 сентября 2008 г., также настоящим полностью 35 включена посредством ссылки.

ПРИМЕР 1

40 [000410] Исследование предпринимали, чтобы определить дозу дендритных клеток и наиболее эффективный цитокин, который способен вызвать опухолеспецифические иммунные ответы и противоопухолевую активность в опухолевой модели почечноклеточного рака Renca.

[000411] В данном исследовании использовали две линии опухолевых клеток: Renca и Renca-НА. Последнюю линию клеток получали путем трансфекции клеток Renca гемагглютинином вируса гриппа (НА). Преимущество модели Renca-НА состоит в возможности отслеживать антигенспецифические Т-клетки, так как оба полученных из НА CD 8- и CD4-специфичных эпитопа известны и уже использовались.

[000412] Конкретная цель состояла в определении индукции НА-специфичных иммунных ответов после внутриопухолевого введения дендритных клеток.

[000413] Формировали подкожную опухоль Renca-НА у BALB/c мышей. Когда

опухоль становилась пальпируемой, дендритные клетки инъецировали внутрь опухоли. Введение дендритных клеток повторяли дважды с 7-дневными промежутками времени, всего осуществляли 3 введения.

[000414] Использовали следующие группы мышей (в каждой группе находилось 3

5 мыши):

1. Мыши, которым ничего не вводили;

10 2. Мыши, которым вводили 5×10^5 дендритных клеток, трансдуцированных контрольной плазмидой;

15 3. Мыши, которым вводили 10^6 дендритных клеток, трансдуцированных контрольной плазмидой;

4. Мыши, которым вводили 5×10^6 дендритных клеток, трансдуцированных контрольной плазмидой;

15 5. Тех же, что и в группах 2-4, применяя дендритные клетки, трансдуцированные IL-12;

16 6. Тех же, что и в группах 2-4, применяя дендритные клетки, трансдуцированные IL-15; и

17 7. Тех же, что и в группах 2-4, применяя дендритные клетки, трансдуцированные IL-21.

20 Для тестирования влияния комбинации различных цитокинов, мышам одновременно вводили:

21 8. 5×10^5 дендритных клеток, трансдуцированных IL-12, и 5×10^5 дендритных клеток, трансдуцированных IL-15,

25 9. 5×10^5 дендритных клеток, трансдуцированных IL-12, и 5×10^5 дендритных клеток, трансдуцированных IL-21, и

10. 5×10^5 дендритных клеток, трансдуцированных IL-15, и 5×10^5 дендритных клеток, трансдуцированных IL-21.

[000415] Через четыре дня после последнего введения, лимфатические узлы несущих опухоль мышей удаляли и клетки стимулировали либо подходящим для МНС I класса пептидом (для обнаружения ответов CD8⁺ Т-клеток), либо подходящим для МНС II класса пептидом (для обнаружения ответов CD4⁺ Т-клеток).

[000416] Проводили следующие анализы:

[000417] 1. ELISPOT IFN- γ и IL-2;

35 2. Анализ пролиферации Т-клеток;

36 3. Обнаружение высвобождения TNF α , IL-10, IL-4 и GM-CSF клетками лимфатических узлов.

[000418] В добавок, NK-активность клеток лимфатических узлов оценивали, применяя клетки YAC в качестве мишеней.

40 [000419] Параллельно, клетки стимулировали антителами против CD3/CD28, чтобы оценить неспецифический ответ Т-клеток.

[000420] Определили наиболее эффективную дозу дендритных клеток, способную вызвать антигенспецифические иммунные ответы.

45 [000421] Конкретная цель 2 - оценить противоопухолевую активность дендритных клеток, трансдуцированных генами цитокинов.

[000422] В дальнейших экспериментах использовали только такие трансдуцированные цитокинами дендритные клетки, для которых продемонстрировали статистически значимую индукцию иммунных ответов.

[000423] Лечение несущих опухоль Renca-НА мышей осуществляли, как описано в конкретной цели 1. Использовали одну дозу DC, трансдуцированных цитокинами, которые проявили специфическую активность в предшествующих экспериментах. В качестве контроля использовали дендритные клетки, трансфицированные контрольным 5 аденоизвирусом. Чтобы достигнуть статистической значимости, в каждую группу включали по 10 мышей.

[000424] Оценивали рост опухоли. Опухоль Renca-НА содержит иммуногенный эпипотоп, который полезен для иммунологического контроля и предварительного тестирования противоопухолевого действия. Тем не менее, чтобы проверить 10 потенциальную противоопухолевую активность лечения, нужно использовать нетрансфицированные опухолевые клетки. Следовательно, эксперименты, описанные выше, повторяли с применением модели опухоли Renca.

ПРИМЕР 2

[000425] Безопасность, переносимость, функционирование трансгена и

15 иммунологическое действие внутриопухолевой инъекции(й) трансдуцированных аденоизвирусом аутологических дендритных клеток, сконструированных таким образом, что они экспрессируют hIL-12 и один или более других иммуномодуляторов под контролем RTS, у субъектов с меланомой на стадиях III и IV оценивали с помощью таких способов, как описанные ниже.

20 [000426] Исследование с участием субъектов исследования с меланомой на стадиях III и IV осуществляли на 4 когортах (группах) субъектов, при этом каждый субъект получал одну внутриопухолевую инъекцию (в меланомную опухоль) трансдуцированных аденоизвирусом аутологических (введенных обратно тому же субъекту, от которого они произошли) дендритных клеток (DC), сконструированных таким образом, что они 25 экспрессируют интерлейкин-12 человека (ML-12) и один или более других

иммуномодуляторов, в дозе, равной 5×10^7 , в комбинации с ежедневным пероральным введением доз активаторного средства (активирующего лиганда). В исследовании применяли инъекции дендритных клеток, трансдуцированных *ex vivo* (после того, как клетки удаляли из субъектов) аденоизвирусным вектором, для индуцируемой экспрессии IL-12 человека и одного или нескольких других иммуномодуляторов инъецированными DC 30 "запускали" (индуцировали) с помощью активации RTS путем перорального введения активирующего средства (RG-115932). Безопасность и переносимость оценивали с помощью физического обследования (включая функциональный статус по ECOG),

35 измерения показателей жизнедеятельности, химического анализа сыворотки, анализа мочи, гематологии, возникновения нежелательных "побочных эффектов" и антител и клеточного иммунного ответа на аденоизвирус, компоненты RTS и активирующее средство. Чтобы оценить улучшение, измеряли однодозовую и стационарную

40 фармакокинетику/ADME (всасывание, распределение, метаболизм и выведение) перорального активирующего средства и его основных метаболитов, осуществляли анализ уровней hIL-12, уровней других иммуномодуляторов и клеточного иммунного ответа (T-клетки) в биоптатах целевых опухолей, дренирующих опухоли лимфатических узлах и периферическом кровообращении, а также измеряли профиль цитокинов в 45 сыворотке.

45 [000427] Например, 16 субъектов с меланомой на стадиях III и IV разделяли на четыре группы, при этом группы 1 и 2 включали по три субъекта и группы 3 и 4 включали по 5 субъектов. Все субъекты получали однократную внутриопухолевую инъекцию 5×10^7 аутологических DC, трансфицированных аденоизвирусным вектором, кодирующим IL-

12 человека и один или более других иммуномодуляторов под контролем RTS.

Например, субъектам осуществляли внутриопухоловую инъекцию аутологических DC, трансдуцированных аденоизом вектором, кодирующим IL-12 человека под контролем RTS и иммуномодулятор, такой как IL-15 или IL-21.

- 5 [000428] Субъекты получали однократную ежедневную пероральную дозу активирующего средства (группа 1: 0.01 мг/кг, группа 2: 0.1 мг/кг, группа 3: 1.0 мг/кг или группа 4: 3 мг/кг), при этом первую дозу вводили приблизительно за 3 часа до инъекции DC в день 1 и продолжали введение в течение 13 следующих дней.
- 10 Дополнительную инъекцию(и) трансдуцированных аденоизом аутологических дендритных клеток в комбинации с 14 однократными (один раз) ежедневными пероральными дозами активирующего средства можно осуществлять подходящим субъектам, которые удовлетворяют критериям для повторного лечения. Безопасность, переносимость и функционирование дендритных клеток оценивают для всех субъектов в каждой группе, начиная с группы 1, в течение вплоть до одного месяца после инъекции
- 15 сконструированных *in vitro* дендритных клеток, перед включением в исследование следующих субъектов, получающих более высокие дозы активирующего средства. Оценку безопасности продолжали для всех субъектов в течение 3 месяцев после первоначальной инъекции сконструированных дендритных клеток, с возможностью продлить период наблюдения до шести месяцев, чтобы проконтролировать безопасность
- 20 для субъекта, если наблюдается токсичность или субъект получает дополнительную инъекцию(и) дендритных клеток.

- [000429] Такое исследование демонстрирует безопасность и переносимость однократной или многократной внутриопухоловой инъекции(й) трансдуцированных аденоизом аутологических дендритных клеток в комбинации с пероральным активирующим средством у субъектов с меланомой. Исследование позволяет получить стационарную фармакокинетику/ADME перорального активирующего средства. Данное исследование демонстрирует функциональность RTS у субъектов с помощью измерения экспрессии hIL-12 и экспрессии одного или нескольких других иммуномодуляторов трансдуцированными аденоизом аутологическими дендритными клетками в целевой опухоли и/или дренирующих опухоль лимфатических узлах в ответ на активацию RTS посредством перорального введения активирующего средства. Более того, данное исследование демонстрирует иммунологическое действие трансдуцированных аденоизом аутологических дендритных клеток в отношении клеточного иммунного ответа в целевой опухоли, дренирующих ее лимфатических узлах и периферическом
- 30 кровообращении после перорального введения активирующего средства.
- 35 [000430] Меланому выбрали в качестве примера рака. Было показано, что меланома, в частности, среди солидных опухолей, отвечает на иммунотерапевтические подходы, и меланомные опухоли легко доступны для внутриопухоловой инъекции и биопсии. Субъекты, включенные в исследование, имели неоперабельную меланому III или IV

- 40 стадии, которая была по меньшей мере 0.5 см в диаметре, с любой толщиной опухоли, любым количеством вовлеченных лимфатических узлов, транзитными метастазами или отдаленными метастазами.

Получение аденоиза, несущего терапевтическую систему RheoSwitch, ML-12 и один или более других иммуномодуляторов.

- 45 [000431] Рекомбинантную ДНК переносили в дендритные клетки (DC) путем трансдукции аденоизом вектора *ex vivo*. Рекомбинантную ДНК применяли для экспрессии IL-12 человека (p70) и одного или нескольких других иммуномодуляторов инъецированными внутрь опухоли незрелыми дендритными клетками, что придавало

выживаемость и стимулировало созревание DC в окружении опухоли и приводило к их последующей миграции в дренирующие опухоль лимфатические узлы. Это приводило к смещению дифференцировки Т-хелперных клеток в тип Th1, а также к активации опухолеспецифических цитотоксических Т-клеток путем примирования

5 перекрестнореагирующими опухолевыми антигенами.

[000432] Рекомбинантная ДНК, используемая в виде рекомбинантного аденоовирусного вектора, позволяет экспрессию IL-12 человека и одного или нескольких других иммуномодуляторов под контролем терапевтической системы RheoSwitch® (RTS). RTS содержит бицистронную информационную последовательность,

10 экспрессируемую с промотора С убиквитина человека и кодирующую два слитых белка: Gal4-EcR и VP16-RXR. Gal4-EcR представляет собой слитые связывающий ДНК домен (аминокислоты 1-147) Gal4 дрожжей и DEF-домены рецептора эндизона насекомого Choristoneura fumiferana. В другом варианте реализации настоящего изобретения, RTS состоит из бицистронной информационной последовательности, экспрессируемой с

15 промотора С убиквитина человека и кодирующей два слитых белка: Gal4-EcR и VP16-RXR. Gal4-EcR представляет собой слитые связывающий ДНК домен (аминокислоты 1-147) Gal4 дрожжей и DEF-домены рецептора эндизона насекомого Choristoneura fumiferana. VP16-RXR собой слитые домены активации транскрипции HSV-VP16 и EF-домены химерного RXR, полученного из последовательностей человека и саранчи.

20 Данные последовательности Gal4-EcR и VP16-RXR разделены участком внутренней посадки рибосомы (IRES) из EMCV. Данные два слитых белка димеризуются, когда Gal4-EcR связывается с низкомолекулярным лекарственным средством (RG-115932) и активирует транскрипцию ML-12 и одного или нескольких других иммуномодуляторов с чувствительного к Gal4 промотора, который содержит шесть сайтов связывания Gal4

25 и синтетический минимальный промотор. Единицу транскрипции RTS, описанную выше, помещают по ходу транскрипции от единиц транскрипции hIL-12 и одного или нескольких других иммуномодуляторов. Всю эту кассету RTS-hIL12-иммуномодулятор включают в геном аденоовиуса 5 в сайт, где участок E1 был удален. В аденоовиусном остеове также отсутствует ген E3. Карта для аденоовиусного вектора Ad-RTS-hIL-12

30 показана на ФИГ.8 в US 2009/0123441 A1.

[000433] Рекомбинантный аденоовиусный вектор, применяемый в данном исследовании, содержит следующие типичные регуляторные элементы, в добавок к последовательностям вирического вектора: промотор С убиквитина человека, участок внутренней посадки рибосомы, полученный из EMCV, индуцируемый промотор,

35 включающий 6 копий сайта связывания Gal4, 3 копии сайта связывания SP-1 и последовательность синтетического минимального промотора, сайты полиденилирования SV40 и последовательность терминатора транскрипции, полученную из гена альфа-глобина человека. Должно быть очевидно, что можно использовать другие регуляторные элементы в качестве альтернативы.

40 [000434] Типичный рекомбинантный аденоовиусный вектор Ad-RTS-hIL-12-иммуномодулятор(ы) получают следующим способом. Кодирующие последовательности для рецепторных слитых белков, VP16-RXR и Gal4-EcR, разделенные IRES (участком внутренней посадки рибосомы) EMCV, вставляли в аденоовиусный членочный вектор под контролем промотора С убиквитина человека (конститутивного промотора). Затем,

45 кодирующие последовательности для субъединиц p40 и p35 hIL-12, разделенных IRES, и одного или нескольких других иммуномодуляторов помещали под контроль синтетического индуцируемого промотора, включающего 6 копий сайта связывания Gal4, и вставляли против хода транскрипции от последовательностей промотора С

убиквитина и рецептора. Челночный вектор включал последовательности аденоовириуса серотипа 5 с левого конца по единицу картирования 16 (е.к. 16), из которого последовательности E1 были удалены и замещены на RTS, IL-12 и одну или более последовательностей других иммуномодуляторов (RTS-hIL-12). Челночный вектор,

- 5 несущий RTS-hIL-12-иммуномодулятор(ы), тестировали, с помощью временной трансфекции им клеток НТ-1080, на зависимую от присутствия активирующего средства экспрессию IL-12 и другого иммуномодулятора(ов). Челночный вектор затем объединили с аденоовириусным оством путем совместной трансфекции ими клеток НЕК 293 с получением рекомбинантного аденоовириуса Ad-RTS-hIL-12-иммуномодулятор(ы). В 10 аденоовириусном остве удалены последовательности с 0 по 9.2 е.к. с левого конца генома и ген E3. Челночный вектор и аденоовириусный оств содержат перекрывающуюся последовательность с е.к. 9.2 по е.к. 16, которая позволяет рекомбинацию между ними и получение рекомбинантного аденоовириусного вектора. Так как в рекомбинантном аденоовириусном векторе отсутствуют участки E1 и E3, вирус не может реплицироваться 15 в нормальных клетках млекопитающих. Тем не менее, вирус может реплицироваться в клетках НЕК 293, которые содержат участок E1 аденоовириуса-5 и, следовательно, обеспечивают функционирование E1 в трансположении.

- [000435] Типичный рекомбинантный аденоовириусный вектор получали следующим способом. Линеаризованным членочным вектором, несущим элементы ДНК для 20 индуцируемой экспрессии IL-12 человека и одного или нескольких Других иммуномодуляторов, и аденоовириусным оством совместно трансфицировали клетки НЕК293. Рекомбинация между перекрывающимися последовательностями на членочном векторе и вирусном остве приводила к получению рекомбинантного аденоовириуса и его упаковыванию в вирусные частицы в клетках НЕК293. Клетки НЕК293 выращивали 25 в среде DMEM, содержащей фетальную бычью сыворотку.

- [000436] Вирус, используемый для предложенного исследования, очищали путем центрифугирования в градиенте плотности CsCl. Рекомбинантный аденоовириус подвергали двум раундам очистки бляшк и полученный в результате этого материал для посева использовали для получения основного вирусного банка (MVB) путем 30 амплификации в клетках НЕК293 из полностью охарактеризованного основного клеточного банка. MVB подвергали комплексным выпускным испытаниям согласно cGMP/GLP (текущие правила надлежащей производственной практики/надлежащей лабораторной практики), включая репликационную компетентность аденоовириуса (RCA), стерильность, присутствие микоплазмы, случайных вирусов, ретровируса, вирусов 35 человека HIV1/2, HTLV1/2, HAV, HBV, HCV, EBV, В 19, CMV, HHV-6, 7 и 8, бычих и свиных" вирусов, полное секвенирование вектора и функциональное тестирование путем индуцируемой AD экспрессии IL-12 и одного или нескольких-других иммуномодуляторов в линиях клеток человека.

- [000437] Вирус из MVB можно применять для получения очищенного вируса в 40 лаборатории cGMP, который можно снова подвергнуть выпускным испытаниям, включая идентичность, RCA, стерильность, присутствие микоплазмы, случайных вирусов, соотношение вирусных частиц к инфекционным дозам, контаминацию с ДНК, эндотоксином и белками клетки-хозяина, и функциональное тестирование путем индуцируемой AD экспрессии IL-12 и одного или нескольких других иммуномодуляторов 45 в линиях клеток человека.

Трансдукция аутологических дендритных клеток аденоовириусом, включающим трансген hIL-12 и один или более других иммуномодуляторов и терапевтическую систему Rheoswitch® (RTS)

[000438] Дендритные клетки, полученные из людей, трансдудировали *ex vivo* и инъецировали в опухоль. DC перед вирусной трансдукцией охарактеризовали по жизнеспособности, чистоте (как правило, >80% клеток проявляли DC-фенотип), стерильности, отсутствию микоплазмы и эндотоксина. После вирусной трансдукции, 5 клетки промывали повторно, чтобы удалить любой непоглощенный вирус. Супернатант с последней промывки тестировали на содержание остаточного вируса с помощью ПЦР. Так как DC трансдудировали *ex vivo* с помощью аденоовирусного вектора (невстраивающийся вирус) и время жизни DC после внутриопухолевой инъекции и 10 последующей миграции в дренирующие опухоль лимфатические узлы мало, не ожидали, что вирусная ДНК может включиться в какие-либо нецелевые клетки. Ожидали, что протокол, используемый для аденоовирусной трансдукции DC, позволит получить 80-90% трансдукции, и считали его очень эффективным.

[000439] Сбор РВМС (мононуклеаров периферической крови) путем лейкафереза: Субъектов подвергали стандартному лейкаферезу от 90 до 120 минут на устройстве 15 для афереза от UPCI Outpatient. Процедура лейкафереза включала удаление крови из вены одной руки; пропускание крови через центрифугу (разделитель клеток), в которой компоненты разделялись и один или более компонентов удалялись; и возвращение оставшихся компонентов в вену субъекта на той же или другой руке. Отбирали не более 20 чем 15% общего объема крови субъекта единовременно, когда кровь пропускалась через устройство для разделения клеток. В разделителе клеток, кровь разделяли на плазму, тромбоциты, белые кровяные клетки и красные кровяные клетки. Белые кровяные клетки (WBC) удаляли, а все другие компоненты возвращали в 25 кровообращение субъекта. Использовали каждую возможность применить два периферических венозных катетера для этой процедуры. Если это невозможно, может быть необходимо применение центрального венозного катетера. Лечащий врач должен сначала все разъяснить субъекту перед проведения ему лейкафереза, и должен подвергнуть его обычному скринингу на показатели жизнедеятельности (включая 30 кровяное давление) перед этой процедурой.

[000440] Обработка: После сбора, пакет с лейкоцитами доставляли вручную на CPL и немедленно обрабатывали путем элютриационного центрифугирования в ELHTOA™. Это закрытая система, утвержденная для клинического применения. Получали фракцию моноцитов, и после получения и проверки жизнеспособности клеток их переносили в картридж Aastrom для культивирования в течение 6 дней в присутствии IL-4 и GM-CSF. Все процедуры обработки и промывки осуществляли в стерильных условиях.

[000441] Исходный посев: Моноциты, полученные из одного пакета с лейкоцитами, подсчитывали в присутствии красителя трипановый синий, чтобы определить количество жизнеспособных клеток. Моноциты оценивали по чистоте с помощью проточной цитометрии. Моноциты ресуспенсировали при концентрации от 5 до 10×10^6 клеток/мл в бессывороточной и свободной от антибиотиков среде CellGenix, содержащей 1000 40 ME/мл IL-4 и 1000 ME/мл GM-CSF на SOP-CPL-0166, и помещали в картридж Aastrom. Для инокуляции кассеты необходим минимальный загрузочный объем 50 мл и минимальное количество клеток.

[000442] Культура: Картридж Aastrom помещали в термостат в Replicell System - полностью закрытое, cGMP-совместимое автоматизированное культуральное устройство 45 для получения незрелых DC.

[000443] Сбор незрелых DC: В день 6, картридж Aastrom удаляли из термостата и собирали незрелые DC. Клетки получали с помощью центрифугирования при 1500 об/мин, промывали в среде CellGenix, подсчитывали в присутствии красителя трипановый

синий и проверяли на морфологические и фенотипические свойства.

[000444] Жизнеспособность: Жизнеспособность определяли путем осуществления гемоцитометрического подсчета клеток в присутствии трипанового синего. Как правило, >95% собранных клеток были жизнеспособными, т.е., не включали краситель

5 трипановый синий. Если жизнеспособность была менее 70%, незрелые DC отбрасывали.

[000445] Определение фенотипа: Клетки, полученные в культуре, подсчитывали путем исследования под микроскопом на гемоцитометре, и предварительную лейкоцитарную формулу (DC против лимфоцитов) получали, применяя краситель трипановый синий. Подтверждение полученной лейкоцитарной формулы получали с 10 помощью проточной цитометрии, устанавливая дискриминационное окно на DC против лимфоцитов и используя свойства сильного прямого и бокового рассеяния незрелых DC в качестве критерия для их идентификации. Незрелые DC обычно содержат >80% клеток с морфологией дендритных клеток и имеют фенотип DC.

[000446] Анализ эффективности IL-12p70: Было установлено, что зрелые DC (mDC)

15 способны продуцировать IL-12p70 самопроизвольно или при активации CD40L с добавлением или без сигналов врожденного иммунитета (например, LPS). Недавно учредили стандартизованный анализ продукции IL-12p70, который пригоден для малых образцов или больших партий вакцин DC, полученных при множестве условий. Современный анализ эффективности состоит из двух отдельных этапов, первый этап 20 включает совместное инкубирование реактивных DC с клетками лимфомы J588, стабильно трансфицированными геном лиганда CD40 человека в качестве стимулятора. Второй этап включает тестирование супернатантов из данных совместных культур на уровне IL-12p70, секретируемого DC, стимулированными J558/CD40L +/- LPS, в системе Luminex. Данный анализ эффективности имеет коэффициент вариации для серии анализов 25 18.5% (n=30) и широкий динамический диапазон, что способствует оценке продуктов различных DC, характеризуемых сильно различающимися уровнями продукции IL-12p70. Стандартный диапазон для учрежденного анализа, в котором используют продукты DC, полученные из моноцитов 13 здоровых доноров, составлял 8-999 пг/мл, со средним значением 270 пг/мл.

30 Критерии продукции и высвобождения для дендритных клеток.

[000447] Каждую партию полученных *in vitro* дендритных клеток тестировали на присутствие микробных контаминаントов (аэробных и анаэробных бактерий, грибков и микоплазмы), а также эндотоксина, и описывали фенотипически и функционально. Все дендритные клетки для инъектирования субъектам должны быть свежими и не 35 должны подвергаться криоконсервированию.

[000448] Проверка гарантии качества DC: DC, полученные как описано выше, оценивали на стерильность, жизнеспособность, чистоту, эффективность и стабильность. Устанавливали критерии выпуска клеточного продукта и строго следовали им.

[000449] Жизнеспособность: Клетки, полученные в культуре, подсчитывали с 40 помощью исследования под микроскопом на гемоцитометре, и получали лейкоцитарную формулу (DC против лимфоцитов), применяя краситель трипановый синий. Эта формула позволяла получать процент жизнеспособных клеток в тестируемой культуре. Для удовлетворения этого критерия выпуска требовалось более 70% жизнеспособных клеток после исключения трипановым синим и минимум 70% клеток, экспрессирующих HLA-45 DR и CD86 в качестве моноцитарных маркеров DC. В пробный анализ можно включить дополнительные маркеры, такие как CD83 и CCR7 для оценки статуса созревания DC и CD3 и CD 19 для оценки контаминации лимфоцитами.

[000450] Чистота: Анализ методом проточной цитометрии с использованием

двуцветовой маркировки клеток, окрашенных FITC- и PE-конъюгированными МАТ, использовали для определения того, что популяция DC, идентифицированная морфологически, экспрессирует поверхностные антигены, определенные для DC, и не экспрессирует антигены моноцитарных линий клеток и линий Т- и В-клеток. Для

5 получения вакцины, полученные DC должны экспрессировать HLA-DR и CD86 и не должны экспрессировать CD3, CD19 или CD14. Чтобы считать их mDC, клетки должны экспрессировать CD83+ и CCR7+.

[000451] Эффективность: Чтобы определить меру эффективности DC, мы определили их способность продуцировать IL-12p70, как описано выше.

10 [000452] Стерильность: DC тестировали с помощью бактериальных (аэробных и анаэробных) и грибковых культур, применяя систему BD Bactec (Becton Dickinson Co., Спаркс, Мэриленд), в микробиологической лаборатории медицинского центра университета Питтсбурга. Окончательные результаты ведения микробных культур получали через 14 дней. Перед выпуском DC для применения в качестве вакцины, 15 осуществляли окрашивание по Граму, которое должно быть отрицательным по присутствию микроорганизмов.

[000453] С помощью IMCPL проверяют на наличие микоплазмы, применяя систему быстрого определения микоплазмы в культуре ткани Gen-Probe Mycoplasma Tissue Culture Rapid Detection System (Gen-Probe, Inc. Сан-Диего, Калифорния), которая основана 20 на способе гибридизации нуклеиновых кислот. Тестирование на наличие эндотоксина осуществляли, применяя анализ Limulus Amoebocyte Lysate Pyrogen Plus (Bio Whittaker, Inc., Уолкервиль, Мэриленд). Тестирование на наличие эндотоксина осуществляли на культуре клеток в момент сбора и перед выпуском конечного продукта. Приемлемый уровень эндотоксина составлял <5 ЕЭ/кг массы тела. Нетрансдущированные и 25 трансдущированные дендритные клетки подвергали криоконсервированию для дальнейшего анализа.

[000454] Ожидали, что все трансдущированные клетки будут экспрессировать трансген. Ожидали, что более чем 80% DC трансдущированы. Продукт должен быть биологически активным, так как в трансгене сохраняется нативная кодирующая последовательность. 30 Трансдущированные вирусом DC, инъецированные в опухоль, имели незрелый фенотип DC и не экспрессировали IL-12 и один или более других иммуномодуляторов до тех пор, пока их не подвергли созреванию, и, следовательно, на этой стадии экспрессия IL-12 и одного или нескольких других иммуномодуляторов преимущественно осуществлялась с трансгена. Так как экспрессия трансгена, содержащего IL-12 и один 35 или более других иммуномодуляторов, индуцировалась низкомолекулярным активирующим средством RG-115932 зависимым от дозы образом, можно было поддерживать уровень экспрессии трансгена в трансдущированных DC на желательных уровнях. Небольшую часть трансдущированных DC, полученных для введения людям, можно тестировать *in vitro* на зависимую от активирующего средства индукцию 40 экспрессии IL-12 и одного или нескольких других иммуномодуляторов. Экспрессию IL-12 и одного или нескольких других иммуномодуляторов можно проанализировать с помощью ELISA с чувствительностью 4 нг/мл.

[000455] Ожидается, что индукция *in vitro* IL-12 и одного или нескольких других иммуномодуляторов в клетках, трансдущированных вектором, применяемым в 45 предложенном исследовании, позволяет получить приблизительно 500 нг IL-12 и одного или нескольких других иммуномодуляторов из 10^6 клеток за 24 часа, что определяли с помощью ELISA. В доклинических исследованиях с использованием модели меланомы на мышах, внутриопухолевая инъекция 10^6 или более трансдущированных DC показала

свою эффективность. Тем не менее, ожидается, что необходимая внутриопухолевая инъекция может проявить эффективность на уровнях ниже этого количества и, следовательно, можно осуществлять инъекции 5×10^7 трансдуцированных DC в качестве исходной точки, чтобы определить, требуются ли меньшие или большие количества.

⁵ [000456] Например, *in vitro*, линии клеток человека и мыши и первичные дендритные клетки, Трансдуцированные рекомбинантным аденоовирусным вектором, несущим гены IL-12 и одного или нескольких других иммуномодуляторов, проявили индукцию экспрессии IL-12 в ответ на активирующее средство зависимым от дозы образом.

6.3. Лекарственная форма активирующего средства

¹⁰ [000457] Активирующее средство, применяемое в данной заявке, входит в состав любой из следующих лекарственных форм:

(1) 100% лабразол;

¹⁵ (2) Ароматизированный листерином лабразол (Latitude Pharmaceuticals Inc., США) содержащий (a) ментол, (b) тимол, (c) эвкалиптол, (d) аспартам, (e) сахаринат натрия, (f) лимонную кислоту, (g) ароматизатор мяты перечной, (h) ароматизатор сливок, (i) лабразол;

(3) Миглиол 812 и фосфолипон 90G (Latitude Pharmaceuticals Inc., США); или

²⁰ (4) Миглиол 812, фосфолипон 90G и витамин Е (токоферола полиэтиленгликольсукцинат) (Latitude Pharmaceuticals Inc., США).

Доставка

[000458] Несмотря на то, что можно предположить множество концентраций и определенных протоколов, один пример лечения пациентов будет включать осуществление пациентам внутриопухолевой инъекции(й) трансдуцированных

²⁵ аутологических дендритных клеток (AdDC) в концентрации 5×10^7 , суспендированных в стерильном солевом растворе, сконструированных таким образом, что они экспрессируют hIL-12 (интерлейкин-12 человека) и один или более других иммуномодуляторов под контролем RTS, в комбинации с пероральным введением активирующего средства (RG-115932).

Первоначальное лечение

[000460] День 1 приема стационарного пациента: В день 1, осуществляли базовое физическое обследование (включая показатели жизнедеятельности, вес и статус ECOG). Собирали мочу и отбирали кровь для базового химического анализа сыворотки, анализа мочи и гематологии (показателей безопасности). Приблизительно за 3 часа до

³⁵ внутриопухолевой инъекции сконструированных *in vitro* дендритных клеток, каждому субъекту вводили дозу активирующего средства (группа 1 - 0.01 мг/кг, 0.3 мг/кг, 1.0 мг/кг, и 3 мг/кг) незамедлительно после приема пищи. Отбирали кровь в определенные промежутки времени (перед введением дозы, через 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 12, 16 и 24 часа после введения дозы AD) в день 1 для оценки фармакокинетики однократной дозы активирующего средства и его основных метаболитов. Каждый субъект получал

⁴⁰ однократную внутриопухолевую инъекцию трансдуцированных аденоовирусом аутологических дендритных клеток в концентрации 5×10^7 клеток, сконструированных таким образом, что они экспрессируют hIL-12 и один или более других иммуномодуляторов под контролем RTS. За субъектами тщательно наблюдали на

⁴⁵ предмет возникновения реакций в месте инъекции и/или реакций гиперчувствительности. В дни с 2 по 14 приема стационарного пациента: В дни с 2 по 14, каждому субъекту вводили дозу активирующего средства незамедлительно после приема пищи. Показатели жизнедеятельности и нежелательные явления отслеживали ежедневно в дни с 2 по 14.

В день 4±24 часа, биопсии опухоли и/или дренирующих опухоль лимфатических узлов осуществляли у приблизительно 50% субъектов для измерения уровня hIL-12 и клеточного иммунного ответа. В день 8 измеряли вес. В день 8±24 часа, биопсии опухоли и/или дренирующих опухоль лимфатических узлов осуществляли у субъектов, которым

5 не осуществляли биопсию в день 4, для измерения уровня hIL-12 и одного или нескольких других иммуномодуляторов и клеточного иммунного ответа. Кровь отбирали в день 4±24 часа и в день 8±24 часа для анализа на присутствие антител и клеточных иммунных ответов против аденоовириуса и/или компонентов RTS. Также получали профиль цитокинов в сыворотке, чтобы определить, влияет ли на экспрессию других цитокинов 10 лечение трансгеном hIL-12 и одного или нескольких других иммуномодуляторов. В день 8 собирали мочу и отбирали кровь для базового химического анализа сыворотки, анализа мочи и гематологии (показателей безопасности). В день 8 отбирали кровь в определенные промежутки времени (перед введением дозы, через 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 15 и 24 часа после введения дозы AD) для оценки стационарной фармакокинетики/ADME активирующего средства и его основных метаболитов.

[000461] День 14 приема стационарного пациента: В день 14 каждому субъекту вводили дозу активирующего средства незамедлительно после приема пищи. Каждому субъекту проводили физическое обследование (включая показатели жизнедеятельности, рост, вес и статус ECOG). Собирали мочу и отбирали кровь для химического анализа 20 сыворотки, анализа мочи и гематологии (показателей безопасности). Кровь отбирали в день 14±24 часа для анализа на наличие антител и клеточного иммунного ответа против аденоовириуса и/или компонентов RTS. Также получали профиль цитокинов в сыворотке, чтобы определить, изменилась ли экспрессия других цитокинов.

[000462] Кровь собирали у субъектов в определенные приемы стационарных 25 пациентов и амбулаторных пациентов, чтобы измерить наличие антител и клеточного иммунного ответа на аденоовириус и компоненты RTS. Кровь получали для измерения базового профиля цитокинов в сыворотке. Для обнаружения гуморального ответа на аденоовириусный вектор применяли анализ блокирования инфицирующей способности AdVeGFP (Gambotto, Robins и др. 2004). Гуморальный ответ на компоненты RTS 30 оценивали с помощью анализа вестерн-блот и/или ELISA, используя сыворотку из пациента и белки RTS, продуцированные вектором экспрессии. Вдобавок, осуществляли мультиплексное тестирование цитокинов в сыворотке с помощью Luminex для IL-12, IFN-гамма, IP-10 и других ТЫ/ТЫ цитокинов, таких как IL-2, TNF-альфа, IL-4, IL-5 и IL-10. Для данных анализов на антитела и цитокины требуется приблизительно 10 мл 35 крови.

[000463] Возможный гуморальный и клеточный иммунный ответ на аденоовириус и/или компоненты RTS: Кровь собирали у субъектов в определенные приемы стационарных пациентов и амбулаторных пациентов, чтобы оценить возможный гуморальный и клеточный иммунный ответ на аденоовириус и компоненты RTS, и на 40 опухолевые антигены. Для обнаружения гуморального ответа на аденоовириусный вектор применяли анализ блокирования инфицирующей способности AdVeGFP (Nwanegbo, и др. 2004). Гуморальный ответ на компоненты RTS оценивали с помощью анализа вестерн-блот и/или ELISA, используя сыворотку из субъектов и белки RTS, продуцированные вектором экспрессии. Вдобавок, осуществляли мультиплексное 45 тестирование цитокинов в сыворотке с помощью Luminex для IL-12, IFN-гамма, IP-10 и других Th1/Th2 цитокинов, таких как IL-2, TNF-альфа, IL-4, IL-5 и IL-10. Для данных анализов на антитела и цитокины требуется приблизительно 10 мл крови.

[000464] Для анализов клеточного иммунного ответа требовалось приблизительно

50-60 мл крови, из которой отделяли CD4 и CD8 субпопуляции Т-клеток. Отделенные Т-клетки смешивали с аутологическими DC, трансдуцированными пустым вектором AdV, векторами AdV-RTS или AdV-RTS-hIL12-иммуномодулятор(ы), и анализировали с помощью ELISPOT на продукцию IFN-гамма Т-клетками, активированными

5 антигенами, полученными из AdV и RTS, при наличии таковых. Подобные анализы осуществляли, используя опухолевые клетки сами по себе и/или DC, экспрессирующие общие меланомные антигены, для оценки раннего иммунного ответа на опухоль. При необходимости также можно осуществить дополнительные анализы.

[000465] ТЕСТ НА ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕРЕМЕННОСТИ: Женщинам детородного

10 периода проводили тест на определение беременности по моче на первом скрининге и перед первым приемом стационарного пациента для повторной фазы лечения.

Тестирование осуществляли по меньшей мере за 72, 48, 24 или 12 часов до введения активирующего средства во время как первоначального лечения, так и всех повторных периодов лечения. Если тест на определение беременности по моче был положительным,

15 то его подтверждали с помощью теста на определение беременности по сыворотке.

Если беременность подтверждали, субъекту не позволяли начинать испытание или продолжать повторную фазу лечения. Тест на определение беременности можно осуществлять столько раз, сколько это необходимо.

[000466] ОПРОС О СОПУТСТВУЮЩЕМ ПРИЕМЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ

20 СРЕДСТВ: На этапе скрининга и перед первым приемом стационарного пациента для повторной фазы лечения, каждого субъекта опрашивали, чтобы получить перечень принимаемых одновременно лекарственных средств, для определения любой возможной взаимосвязи с нежелательными явлениями, которые возникают во время испытания и периода последующего наблюдения.

25 [000467] КРИТЕРИИ ДОПУСКА К ПОВТОРНОМУ ЛЕЧЕНИЮ: Если субъект переносил предшествующее введение AdDC без возникновения нежелательных реакций, которые ограничивали прием лекарственного средства, и проявил отсутствие прогрессирования заболевания или уменьшение симптомов к моменту возможного повторного лечения, считали, что он подходит для повторного лечения. Если по мнению

30 научного руководителя и лечащего врача была возможна клиническая польза от дополнительной внутриопухолевой инъекции(й) AdDC в комбинации с активирующим средством (максимально переносимая доза из группы 1) в течение 14 следующих дней, субъекту предлагали повторное лечение, при условии, что удовлетворялись следующие критерии:

- 35 1. Отсутствовала ограничивающая токсичность,
 2. Заболевание субъекта было стабильным или проявило клинические или субъективные признаки улучшения, и
 3. Отсутствовали признаки гуморального или клеточного иммунного ответа на аденоовирусные компоненты терапевтической системы RheoSwitch®.

40 [000468] ОЦЕНКА ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ТРАНСГЕНА И

ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ: Пункционные или хирургические биопсии опухоли и дренирующих опухоль лимфатических узлов осуществляли во время скрининга (с дня -12 по день -7), в день 4, день 8 и день 14 испытания и в 1 месяц последующего наблюдения (см. Таблицы 3-5) для оценки *in vivo* экспрессии трансгена hIL-12 и одного или нескольких других иммуномодуляторов, и клеточного иммунного ответа.

45 Тонкоигольные пункционно-аспирационные биопсии опухоли и дренирующих опухоль лимфатических узлов осуществляли с дня -12 по день -7 и в день 14 повторного лечения для оценки *in vivo* экспрессии трансгена hIL-12 и одного или нескольких других

иммуномодуляторов, и клеточного иммунного ответа. Биоптаты оценивали с помощью стандартной световой микроскопии и иммуногистохимии для оценки Т-клеточной инфильтрации опухоли и дренирующих опухоль лимфатических узлов. Биопсийные срезы изучал патоморфолог, не знающий исходные; данные исследуемого субъекта.

5 Чтобы отличить эндогенную и индуцированную экспрессию IL-12 дендритными клетками в опухоли и дренирующих опухоль лимфатических узлах, применяли ОТ-ПЦР на РНК со специально разработанными праймерами. Отбирали кровь для получения профиля цитокинов в сыворотке при скрининге, в день 4, день 8 и день 14 испытания, в 1 месяц последующего наблюдения и в дни с -12 по -7, в день 8 и день 14 повторного 10 лечения (см. Таблицы 3-5). Получали профиль цитокинов в сыворотке, чтобы определить, влияло ли на экспрессию других цитокинов лечение трансгеном hIL-12. Осуществляли мультиплексное тестирование цитокинов в сыворотке с помощью Luminex для IL-12, IFN-гамма, IP-10 и других Th1/Th2 цитокинов, таких как IL-2, TNFa, IL-4, IL-5 и IL-10. Для данных анализов на антитела и цитокины требовалось приблизительно 10 мл крови.

15 [000469] ОДНОДОЗОВАЯ И СТАЦИОНАРНАЯ ФАРМАКОКИНЕТИКА

АКТИВИРУЮЩЕГО СРЕДСТВА: Кровь отбирали, в определенные промежутки времени (перед введением дозы, через 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 12, 16 и 24 часа после утреннего введения дозы) в день 1 испытания для оценки однодозовой фармакокинетики и в день 8 испытания для измерения стационарной фармакокинетики/ADME активирующего 20 средства и его основных метаболитов. Плазму оценивали с помощью ВЭЖХ, чтобы получить следующие критические точки стационарной фармакокинетики активирующего средства и основных метаболитов: C_{max} (максимальная наблюдаемая концентрация в плазме), T_{max} (время достижения максимальной наблюдаемой концентрации в плазме), C_{trough} (минимальная наблюдаемая концентрация в плазме, вычисленная как средняя 25 концентрация в промежутке времени от 0 и 24 часов), C_{24h} (концентрация в плазме через 24 часа), AUC_{24h} (площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени в промежутке времени от 0 до 24 часов), K_e (видимая скорость выведения) и T_{1/2} (видимое время полужизни).

30 [000470] Должно быть очевидно, что описанные выше варианты реализации и пояснительные примеры не предполагаются ограничивающими в каком-либо отношении объем настоящего изобретения, и что подразумевается, что в объем формулы изобретения, приведенной в данной заявке, входят все варианты реализации и пояснительные примеры, независимо от того, представлены они явным образом в данной заявке или нет.

35 Литература

Abdalla, 2007.

Abdi K, Singh N, Matzinger P (2006). T-cell control of IL-12p75 production. Scand J Immunol 64: 83-92.

40 Adorini L (1999). Interleukin-12, a key cytokine in Th1-mediated autoimmune diseases. Cell Mol Life Sci 55: 1610-25.

Adorini L (2001). Interleukin 12 and autoimmune diabetes. Nat Genet 27: 131-2.

Adorini L, Gregori S, Harrison LC (2002). Understanding autoimmune diabetes: insights from mouse models. Trends Mol Med 8: 31-8.

45 Adorini L, Gregori S, Magram J, Trembleau S (1996). The role of IL-12 in the pathogenesis of Th1 cell-mediated autoimmune diseases. Ann N Y Acad Sci 795: 208-15.

Akhtar N, Padilla ML, Dickerson EB, Steinberg H, Breen M, Auerbach R et al (2004).

Interleukin-12 inhibits tumor growth in a novel angiogenesis canine hemangiosarcoma xenograft model. Neoplasia 6: 106-16.

- Akiyama Y, Watanabe M, Maruyama K, Ruscetti FW, Wiltzout RH, Yamaguchi K (2000). Enhancement of antitumor immunity against B16 melanoma tumor using genetically modified dendritic cells to produce cytokines. *Gene Ther* 7: 2113-21.
- 5 Al-Mohanna F, Saleh S, Parhar RS, Collison K (2002). IL-12-dependent nuclear factor-kappaB activation leads to de novo synthesis and release of IL-8 and TNF-alpha in human neutrophils. *J Leukoc Biol* 72: 995-1002.
- Aliberti JC, Cardoso MA, Martins GA, Gazzinelli RT, Vieira LQ, Silva JS (1996). Interleukin-12 mediates resistance to Trypanosoma cruzi in mice and is produced by murine macrophages in response to live tryptomastigotes. *Infect Immun* 64: 1961-7.
- 10 Allavena P, Paganin C, Zhou D, Bianchi G, Sozzani S, Mantovani A (1994). Interleukin-12 is chemotactic for natural killer cells and stimulates their interaction with vascular endothelium. *Blood* 84: 2261-8.
- Ali RS, Khar A (2004). Interleukin-12 secreted by mature dendritic cells mediates activation of NK cell function. *FEBS Lett* 559: 71-6.
- 15 Alzona M, Jack HM, Simms PE, Ellis TM (1996). Interleukin-12 activates interferon-gamma production by targeted activation of CD30+ T cells. *Ann N Y Acad Sci* 795: 127-36.
- Amemiya K, Meyers JL, Trevino SR, Chanh TC, Norris SL, Waag DM (2006). Interleukin-12 induces a Th1-like response to *Burkholderia mallei* and limited protection in BALB/c mice. *Vaccine* 24: 1413-20.
- 20 Araujo MI, Bliss SK, Suzuki Y, Alcaraz A, Denkers EY, Pearce EJ (2001). Interleukin-12 promotes pathologic liver changes and death in mice coinfecte with *Schistosoma mansoni* and *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 69: 1454-62.
- Arulanandam BP, Van Cleave VH, Metzger DW (1999). IL-12 is a potent neonatal vaccine adjuvant. *Eur J Immunol* 29: 256-64.
- 25 Athie MV, Flotow H, Hilyard KL, Cantrell DA (2000). IL-12 selectively regulates STAT4 via phosphatidylinositol 3-kinase and Ras-independent signal transduction pathways. *Eur J Immunol* 30: 1425-34.
- Athie-Morales V, Smits HH, Cantrell DA, Hilkens CM (2004). Sustained IL-12 signaling is required for Th1 development. *J Immunol* 172: 61-9.
- 30 Atkins MB, Robertson MJ, Gordon M, Lotze MT, DeCoste M, DuBois JS et al (1997). Phase I evaluation of intravenous recombinant human interleukin 12 in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* 3: 409-17.
- Berard F, Blanco P, Davoust J, Neidhart-Berard EM, Nouri-Shirazi M, Taquet N et al (2000). Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with 35 killed allogeneic melanoma cells. *J Exp Med* 192: 1535-44.
- Bertagnolli MM, Lin BY, Young D, Herrmann SH (1992). IL-12 augments antigen-dependent proliferation of activated T lymphocytes. *J Immunol* 149: 3778-83.
- Bhardwaj N, Seder RA, Reddy A, Feldman MV (1996). IL-12 in conjunction with dendritic cells enhances antiviral CD8+ CTL responses in vitro. *J Clin Invest* 98: 715-22.
- 40 Biedermann T, Lametschwandtner G, Tangemann K, Kund J, Hinteregger S, Carballido-Perrig N et al (2006). IL-12 instructs skin homing of human Th2 cells. *J Immunol* 177: 3763-70.
- Brunda MJ, Gately MK. (1994). Antitumor activity of interleukin-12. *Clin Immunol Immunopathol* 71: 253-5.
- Buchanan JM, Vogel LA, Van Cleave VH, Metzger DW (1995). Interleukin 12 alters the 45 isotype-restricted antibody response of mice to hen eggwhite lysozyme. *Int Immunol* 7: 1519-28.
- Chang, 2007.
- Coughlin, 1998.
- Dietrich 2002.

Emtage et al., "Adenoviral Vectors Expressing Lymphotactin and Interleukin 2 or Lymphotactin and Interleukin 12 Synergize to Facilitate Tumor Regression in Murine Breast Cancer Models," *Hum. Gene Ther.* 10: 697 (1999).

Faure F, Even J, Kourilsky P (1998). Tumor-specific immune response: current in vitro analyses

5 may not reflect the in vivo immune status. *Crit Rev Immunol* 18: 77-86.

Gao et al., "Cotransduction of CCL27 gene can improve the efficacy and safety of IL-12 gene therapy for cancer," *Gene Ther.* 14: 491-502 (2007)

Hansson, 2007.

Heinzerling L, Burg G, Dummer R, Maier T, Oberholzer PA, Schultz J et al (2005). Intratumoral 10 injection of DNA encoding human interleukin 12 into patients with metastatic melanoma: clinical efficacy. *Hum Gene Ther* 16: 35-48.

Hill 2002.

Itoh T, Storkus WJ, Gorelik E, Lotze MT (1994). Partial purification of murine tumor-associated 15 peptide epitopes common to histologically distinct tumors, melanoma and sarcoma, that are presented by H-2Kb molecules and recognized by CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol* 153: 1202-15.

Jean, 2004.

Kang WK, Park C, Yoon HL, Kim WS, Yoon SS, Lee MH et al (2001). Interleukin 12 gene 20 therapy of cancer by peritumoral injection of transduced autologous fibroblasts: outcome of a phase I study. *Hum Gene Ther* 12: 671-84.

Koka, 2004.

Koyama, 1997

Lasek, 2000.

Mehrotra, 1995.

25 Narvaiza et al., "Intratumoral coinjection of two adenoviruses, one encoding the chemokine IFN-gamma-inducible protein-10 and another encoding IL-12, results in marked antitumoral synergy," *J. Immunol.* 164: 3112 (2000).

Nair, 2006.

30 Narvaiza et al., Intratumoral Coinjection of Two Adenoviruses, One Encoding the Chemokine IFN- γ -Inducible Protein-10 and Another Encoding IL-12, Results in Marked Antitumoral Synergy," *J. Immunol.* 164: 3112-3122 (2000).

Palmer et al., "Combined CXC chemokine and interleukin-12 gene transfer enhances antitumor activity," *Gene Ther.* 5: 282-290 (2001).

Rasmussen, 2003.

35 Romani L, Puccetti P, Bistoni F (1997). Interleukin-12 in infectious diseases, *Clin Microbiol Rev* 10: 611-36.

Rothe H, Burkart V, Faust A, Kolb H (1996). Interleukin-12 gene expression mediates the accelerating effect of cyclophosphamide in autoimmune disease. *Ann N Y Acad Sci* 795: 397-9.

Sabel, 2003, 2004, 2007.

40 Sangro B, Mazzolini G, Ruiz J, Herraiz M, Quiroga J, Herrero I et al (2004). Phase I trial of intratumoral injection of an adenovirus encoding interleukin-12 for advanced digestive tumors. *J Clin Oncol* 22: 1389-97.

Sangro B, Melero I, Qian C, Prieto J (2005). Gene therapy of cancer based on interleukin 12. *Curr Gene Ther* 5: 573-81.

45 Satoh Y, Esche C, Gambotto A, Shurin GV, Yurkovetsky ZR, Robbins PD et al (2002). Local administration of IL-12-transfected dendritic cells induces antitumor immune responses to colon adenocarcinoma in the liver in mice. *J Exp Ther Oncol* 2: 337-49.

Satoskar AR, Rodig S, Telford SR, 3rd, Satoskar AA, Ghosh SK, von Lichtenberg F et al

- (2000). IL-12 gene-deficient C57BL/6 mice are susceptible to *Leishmania donovani* but have diminished hepatic immunopathology. *Eur J Immunol* 30: 834-9.
- 5 Schopf LR, Bliss JL, Lavigne LM, Chung CL, Wolf SF, Sypek JP (1999). Interleukin-12 is capable of generating an antigen-specific Th1-type response in the presence of an ongoing infection-driven Th2-type response. *Infect Immun* 67: 2166-71.
- Subleski, 2006.
- Svane IM, Boesen M, Engel AM (1999). The role of cytotoxic T-lymphocytes in the prevention and immune surveillance of tumors-lessons from normal and immunodeficient mice. *Med Oncol* 16: 223-38.
- 10 Taniguchi, 1998.
- Tatsumi T, Huang J, Gooding WE, Gambotto A, Robbins PD, Vujanovic NL et al (2003). Intratumoral delivery of dendritic cells engineered to secrete both interleukin (IL)-12 and IL-18 effectively treats local and distant disease in association with broadly reactive Tc1-type immunity. *Cancer Res* 63: 6378-86.
- 15 Thomas GR, Chen Z, Enamorado I, Bancroft C, Van Waes C (2000). IL-12- and IL-2-induced tumor regression in a new murine model of oral squamous-cell carcinoma is promoted by expression of the CD80 co-stimulatory molecule and interferon-gamma. *Int J Cancer* 86: 368-74.
- Trinchieri G (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3: 133-46.
- 20 Triozzi PL, Alien KO, Carlisle RR, Craig M, LoBuglio AF, Conry RM (2005). Phase I study of the intratumoral administration of recombinant canarypox viruses expressing B7.1 and interleukin 12 in patients with metastatic melanoma, *Clin Cancer Res* 11: 4168-75.
- Tsung K, Meko JB, Peplinski GR, Tsung YL, Norton JA (1997). IL-12 induces T helper 1-directed antitumor response. *J Immunol* 158: 3359-65.
- 25 Vujanovic, 2006.
- Wang, 2001.
- Wigginton 2002, 2001, 1996
- Wolf SF, Sieburth D, Sypek J (1994). Interleukin 12: a key modulator of immune function. *Stem Cells* 12: 154-68.
- 30 Yamanaka R, Zullo SA, Ramsey J, Yajima N, Tsuchiya N, Tanaka R et al (2002). Marked enhancement of antitumor immune responses in mouse brain tumor models by genetically modified dendritic cells producing Semliki Forest virus-mediated interleukin-12. *J Neurosurg* 97: 611-8.
- Yuminamochi E, Koike T, Takeda K, Horiuchi I, Okumura K (2007). Interleukin-12- and interferon-gamma-mediated natural killer cell activation by *Agaricus blazei* Murill. *Immunology*.
- 35 McDermott, D.F. and Atkins, M.B. (2008) Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma. *Cancer J.* 14, 320-324.
- Bemtsen, A., Trepiakas, R., Wenandy, L., Geertsen, P.F., thor Straten, P., Andersen, M.H., Pedersen, A.E., Claesson, M.H., Lorentzen, T., Johansen, J.S. and Svane, I.M. (2008) Therapeutic dendritic cell vaccination of patients with metastatic renal cell carcinoma: a clinical phase 1/2 trial. *J. Immunother.* 31, 771-780.
- 40 Tarhini, A.A., Kirkwood, J.M., Gooding, W.E., Moschos, S. and Agarwala, S.S. (2008) A phase 2 trial of sequential temozolomide chemotherapy followed by high-dose interleukin 2 immunotherapy for metastatic melanoma. *Cancer*. 113, 1632-1640.
- Heemskerk, B., Liu, K., Dudley, M.E., Johnson, L.A., Kaiser, A., Downey, S., Zheng, Z.,
- 45 Shelton, T.E., Matsuda, K., Robbins, P.P., Morgan, R.A., Rosenberg, S.A. (2008) Adoptive cell therapy for patients with melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes genetically engineered to secrete interleukin-2. *Hum Gene Ther.* 19, 496-510.
- Horton, H.M., Lalor, P.A. and Rolland, A.P. (2008) IL-2 plasmid electroporation: from

preclinical studies to phase I clinical trial. *Methods Mol Biol.* 423, 361-372.

Shiratori, I., Suzuki, Y., Oshiumi, H., Begum, N.A., Ebihara, T., Matsumoto, M., Hazeki, K., Kodama, K., Kashiwazaki, Y. and Seya, T. (2007) Recombinant interleukin-12 and interleukin-18 antitumor therapy in a guinea-pig hepatoma cell implant model.

5 *Cancer Sci.* 98, 1936-1942.

Lian H, Jin N, Li X, Mi Z, Zhang J, Sun L, Li X, Zheng H, Li P. (2007) Induction of an effective anti-tumor immune response and tumor regression by combined administration of IL-18 and Apoptin. *Cancer Immunol Immunother.* 56, 181-192.

Iinuma, H., Okinaga, K., Fukushima, R., Inaba, T., Iwasaki, K., Okinaga, A., Takahashi, I. and

10 Kaneko, M. (2006) Superior protective and therapeutic effects of IL-12 and IL-18 gene-transduced dendritic neuroblastoma fusion cells on liver metastasis of murine neuroblastoma. *J. Immunol.* 176, 3461-3469.

15 Basak, G.W., Zapala, L., Wysocki, P.J., Mackiewicz, A., Jakóbisiak, M. and Lasek, W. (2008) Interleukin 15 augments antitumor activity of cytokine gene-modified melanoma cell vaccines in a murine model. *Oncol Rep.* 19, 1173-1179.

Lasek, W., Basak, G., Switaj, T., Jakubowska, A.B., Wysocki, P.J., Mackiewicz, A., Drela, N., Jalili, A., Kamiński, R., Kozar, K. and Jakóbisiak, M. (2004) Complete tumour regressions induced by vaccination with IL-12 gene-transduced tumour cells in combination with IL-15 in a melanoma model in mice. *Cancer Immunol Immunother.* 53, 363-372.

20 Xia, Y., Dai, J., Lu, P., Huang, Y., Zhu, Y. and Zhang, X. (2008) Distinct effect of CD40 and TNF-signaling on the chemokine/chemokine receptor expression and function of the human monocyte-derived dendritic cells. *Cell Mol Immunol.* 5, 121-131.

25 Sharma, S., Batra, R.K., Yang, S.C., Hillinger, S., Zhu, L., Atianzar, K., Strieter, R.M., Riedl, K., Huang, M. and Dubinett, S.M. (2003) Interleukin-7 gene-modified dendritic cells reduce pulmonary tumor burden in spontaneous murine bronchoalveolar cell carcinoma. *Hum Gene Ther.* 14, 1511-1524.

Tirapu, I., Rodriguez-Calvillo, M., Qian, C., Duarte, M., Smerdou, C., Palencia, B., Mazzolini, G., Prieto, J. and Melero, I. (2002) Cytokine gene transfer into dendritic cells for cancer treatment. *Curr. Gene Ther.* 2, 79-89.

30 Small, E.J., Sacks, N., Nemunaitis, J., Urba, W.J., Dula, E., Centeno, A.S., Nelson, W.G., Ando, D., Howard, C., Borellini, F., Nguyen, M., Hege, K. and Simons, J.W. (2007) Granulocyte macrophage colony-stimulating factor-secreting allogeneic cellular immunotherapy for hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 13, 3883-3891.

35 Huang, H. and Xiang, J. (2004) Synergistic effect of lymphotoxin and interferon gamma-inducible protein-10 transgene expression in T-cell localization and adoptive T-cell therapy of tumors. *Int. J. Cancer.* 109, 817-825.

Формула изобретения

1. Вектор для экспрессии при определенных условиях иммуномодуляторных 40 полипептидов, содержащий полинуклеотид, кодирующий генный переключатель, при этом указанный полинуклеотид содержит (1) по меньшей мере одну последовательность фактора транскрипции, которая функционально связана с промотором, при этом указанная по меньшей мере одна последовательность фактора транскрипции кодирует лиганд-зависимый фактор транскрипции, и (2) полинуклеотид, кодирующий полипептид IL-12 и один или более иммуномодуляторных полипептидов, выбранных из IL-2, IL-7, IL-15, IL-18, IL-21, GM-CSF, CCL3 (MIP-1a), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP3), XCL1 (лимфотактин), CCL19 (MIP-3b), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10), CXCL12 (SDF-1), CCL21 (6Ckine) или TNF-альфа.

2. Вектор по п. 1, отличающийся тем, что указанный вектор представляет собой аденоовирусный вектор.

3. Вектор по п. 1, отличающийся тем, что указанный полинуклеотид, кодирующий указанный иммуномодуляторный полипептид, и указанный полинуклеотид, кодирующий указанный полипептид IL-12, находятся под контролем регулируемого промотора указанного генного переключателя.

4. Вектор по п. 1, отличающийся тем, что указанный генный переключатель представляет собой генный переключатель на основе рецептора экдизона (EcR).

5. Вектор по п. 1, отличающийся тем, что указанный полинуклеотид, кодирующий 10 генный переключатель, содержит первую последовательность фактора транскрипции под контролем первого промотора и вторую последовательность фактора транскрипции под контролем второго промотора, при этом указанные белки, кодируемые указанной первой последовательностью фактора транскрипции и указанной второй последовательностью фактора транскрипции, взаимодействуют с образованием 15 белкового комплекса, который функционирует как лиганд-зависимый фактор транскрипции.

6. Вектор по п. 1, отличающийся тем, что указанный полинуклеотид, кодирующий один или более иммуномодуляторных полипептидов, кодирует иммуномодулятор(ы) человека.

20 7. Способ получения популяции иммунных клеток или вспомогательных клеток для терапии (TSC), экспрессирующих иммуномодуляторные полипептиды, включающий модификацию указанных клеток рекомбинантным вектором по п. 1, причем указанный способ не включает использования клеток эмбриона человека.

25 8. Сконструированная *in vitro* иммунная клетка или TSC для экспрессии при определенных условиях иммуномодуляторных полипептидов, причем указанные клетки содержат вектор по п. 1 и при этом указанные клетки не включают клетки эмбриона человека.

9. Вектор по п. 1, отличающийся тем, что указанный полинуклеотид, кодирующий генный переключатель, содержит первую последовательность фактора транскрипции 30 и вторую последовательность фактора транскрипции под контролем промотора, при этом указанные белки, кодируемые указанной первой последовательностью фактора транскрипции и указанной второй последовательностью фактора транскрипции, взаимодействуют с образованием белкового комплекса, который функционирует как лиганд-зависимый фактор транскрипции.

35 10. Вектор по п. 9, отличающийся тем, что указанная первая последовательность фактора транскрипции и указанная вторая последовательность фактора транскрипции соединены посредством участка внутренней посадки рибосомы (IRES) EMCV.

11. Вектор по п. 1, отличающийся тем, что один или более иммуномодуляторных полипептидов представляют собой полипептиды IL-15 или IL-21.

40 12. Способ получения популяции дендритных клеток, экспрессирующих иммуномодуляторные полипептиды, включающий осуществление модификации указанных клеток вектором согласно п. 11.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ИНТРЕКСОН КОРПАРЕЙШН
БИЧ, Роберт, Паттерсон
РИД, Томас, д.

СКОНСТРУИРОВАННЫЕ КЛЕТКИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ МНОЖЕСТВЕННЫЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРЫ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

<130> 2584.060PC01

<150> US 61/103,810
<151> 2008-10-08

<160> 29

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 13294

<212> DNA

<220>
<223> Synthetic MIL-12 and MIL-21

<400> 1 taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtgc ccacctgacg tctaagaaac 60
cattattatc atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc acgaggccct ttcgttctca 120
attaatcgca ccggtatcta tgtcgggtgc ggagaaaagag gtaatgaaat ggcagctagc 180
atcatcaata atataccctta ttttggattt aagccaatat gataatgagg gggtgagtt 240
tgtgacgtgg cgccgggcgt gggAACGGGG cgggtgacgt agtagtgtgg cgaaagtgtg 300
atgttgcagc tgtggcggaa cacatgttaa cgacggatgt ggcaaaagtgc acgttttgg 360
tgtgcgcgg tgtacacagg aagtgacaat tttcgcgcgg ttttaggcgg atgttgttagt 420
aaatttgggc gtaaccgagt aagatttggc cattttcgcg ggaaaactga ataagaggaa 480
gtgaaatctg aataattttt tgttactcat agcgcgtaat atttgtctag ggagatccgg 540
taccgatatac ctagacaacg atgctgagct aactataacg gtcctaaggt agcgaccgcg 600
gagacttaggt gtatttatct aagcgatcgc ttaattaagg ccggccgcgg caataaaaata 660
tctttatccc cattacatct gtgtgtgg tttttgtgtg aatccatagt actaacatac 720
gctctccatc aaaacaaaaac gaaacaaaaac aaactagcaa aataggctgt ccccaagtgc 780
agtccaggtg ccagaacatt tctctatcca taatgcaggg gtaccgggtg atgacgggtga 840
aaaccccaa ttgcggagta ctgtccctccg agcggagtac tgtccctccga gcggagttact 900
gtcctccgag cggagttactg tcctccgagc ggagttactgt cctccgagcg ggtttactgtc 960
ctccgagccg agagtccccg gggacctaga gggtatataa tgggtgcctt agctgggtgt 1020
tgacccatc ttcctgtacg cccctgcagg ggcgcgccac gcgtcgaaga aggtgagtaa 1080
tcttaacatg ctctttttt tttttttgc taatcccttt tgtgtgtca tgtaggtatc 1140
acatttacaa caaatgtttt ttcctgcacag gaaaaacccctt gctgggttacc ttcgttgcgg 1200

gacacttctt gtcctctact ttggaaaaaa ggaattgaga gccgctagcc caccatgtgc	1260
ccccagaagc tgaccatcg ctggttcgcc atcgctgc tggtgagccc cctgatggcc	1320
atgtggagc tggagaagga cgtgtacgtg gtggaggtgg actggacccc cgacgcccc	1380
ggcgagacg tgaacctgac ttgcgacacc cccgaggagg acgacatcac ctggaccagc	1440
gaccagagac acggcgtcat cggcagcggc aagaccctga ccatcaccgt gaaggagttc	1500
ctggacgccc gacagtacac ctgtcacaag ggcggcgaga ccctgagcc aagccacctg	1560
ttgctgcaca agaaggagaa cggcatctgg agcaccgaga tcctgaagaa cttcaagaac	1620
aagaccttcc tgaagtgcga ggccccaac tacagcggca gattcacctg tagctggctg	1680
gtgcagagaa acatggacct gaagttcaac atcaagagca gcagcagcag ccccgacagc	1740
agagccgtga catgcggcat ggccagcctg agcggcgaga aggtgaccct ggaccagaga	1800
gactacgaga agtacagcgt gagctgccag gaggacgtga cctgtcccac cgccgaggag	1860
accctgcca tcgagcttgc cctggaagcc agacagcaga acaagtacga gaactacagc	1920
accagcttct tcatcagaga catcatcaag cccgacccc ccaagaacct ccagatgaag	1980
cccctgaaga acagccaggt ggaggtgtcc tggagtacc ccgacagctg gagcaccccc	2040
cacagctact tcagcctgaa gttcttcgtg agaatccaga gaaagaagga gaagatgaag	2100
gagaccgagg agggctgcaa ccagaagggc gcttcctgg tggagaaaac cagcacccag	2160
gtgcagtgca agggcggcaa cgtgtgtgt caggcccagg acagatacta caacagcagc	2220
tgctccaagt gggctgcgt gcccgcgc gtgagaagct gaatcgattt cgcaaagctc	2280
ccccctcccc tcccccccccc ctaacgttac tggccgaagc cgcttggaaat aaggccggtg	2340
tgcgttgc tatatgttat tttccaccat attgccgtct tttggcaatg tgagggcccg	2400
gaaacctggc cctgtttct tgacgagcat tcctagggtt cttccccc tcgccaaagg	2460
aatgcaaggt ctgttgaatg tcgtgaagga agcagttct ctggaagctt cttgaagaca	2520
aacaacgtct gtagcgaccc tttgcaggca gcggaaacccc ccacctggcg acaggtgcct	2580
ctgcggccaa aagccacgtg tataagatac acctgcaaag gcggcacaac cccagtgc当地	2640
cgttgtgagt tggatagttt agtcgaggaa aaaaaacgtc tagccccccc gaaccacggg	2700
gacgtggttt tccttgaaa aacacgatct cttaaatgtcta gcggcaccat gtgccagagc	2760
agataacgtt tggatagttt agtcgaggaa aaaaaacgtc tagccccccc gaaccacggg	2820
gacgtggttt tccttgaaa aacacgatct cttaaatgtcta gcggcaccat gtgccagagc	2880
agataacgtt tggatagttt agtcgaggaa aaaaaacgtc tagccccccc gaaccacggg	2940
gacgtggttt tccttgaaa aacacgatct cttaaatgtcta gcggcaccat gtgccagagc	3000
gacgtggttt tccttgaaa aacacgatct cttaaatgtcta gcggcaccat gtgccagagc	3060
gacgtggttt tccttgaaa aacacgatct cttaaatgtcta gcggcaccat gtgccagagc	3120
gacgtggttt tccttgaaa aacacgatct cttaaatgtcta gcggcaccat gtgccagagc	3180
gacgtggttt tccttgaaa aacacgatct cttaaatgtcta gcggcaccat gtgccagagc	3240

gaggacctga agatgtacca gaccgagttc caggccatca acgcccgcct gcaaaaccac	3300
aaccaccagc agatcatcct ggacaaggc atgttggtgg ccatcgacga gctgatgcag	3360
agcctgaacc acaacggcga gaccctgaga cagaagcccc ccgtggcga ggccgacccc	3420
tacagagtga agatgaagct gtgcacgcct tcagcaccag agtggtgacc	3480
atcaacagag ttagggcta cctgagcagc gcctgaatcg aatgcgcact cgagtggtat	3540
tacgctcaac ttccagaatct cactaaaaga atagatagtc ttcccttaac tggaaaatttt	3600
tccttacaaa cagatatgga cgtcaactagc accaccatgg agaggaccct ggtgtgcctg	3660
gtggtgatct tcctggcac cgtggccac aagagcagcc cccagggacc cgacaggctg	3720
ctgatccggc tgagacaccc gatcgacatc gtggagcagc tgaagattta cgagaacgac	3780
ctggaccccg agctgctgtc cgccccccag gacgtgaagg gccactgcga gcacgcccgc	3840
ttcgcctgct tccagaaggc caagctgaag cccagcaacc ccggcaacaa caagaccttc	3900
atcatcgacc tggtgccca gctgagaagg aggctgccc ccaggagggg cggcaagaag	3960
cagaagcaca tcgccaagtg cccagctgc gacagctacg agaagcggac ccccaaggag	4020
ttcctggaga ggctgaagtg gctgctgca aagatgatcc accagcacct gagctgaatc	4080
gcctgcgcag catgctcgcg acctaagtgc gccgctaaag tttacgtac ggccgcgtcg	4140
acgatagtt gatgggtggc atccctgtga cccctccccca gtgcctctcc tggccctgga	4200
agttgccact ccagtgcaca ccagccttgc cctaataaaaa ttaagttgca tcattttgtc	4260
tgacttagtg tccttctata atattatggg gtggaggggg gtggatgga gcaaggggca	4320
agttggaaag acaacctgta gggcctgcgg ggtctattgg gaaccaagct ggagtgcagt	4380
ggcacaatct tggctcaactg caatctccgc ctccctgggtt caagcgattc tcctgcctca	4440
gcctcccgag ttgttgggat tccaggcatg catgaccagg ctcagctaattttttttt	4500
ttggtagaga cggggtttca ccatattggc caggctggtc tccaaactcct aatctcagg	4560
gatctaccca ccttggcctc ccaaattgct gggattacag gcgtgaacca ctgctccctt	4620
ccctgtcctt ctgattttaa aataactata ccagcaggag gacgtccaga cacagcatag	4680
gctacctggc catgcccac cggggacata tttgagttgc ttgcttggca ctgtcctctc	4740
atgcgttggg tccactcagt agatgcctgt tgaattctga tttaaatcgg tccgcgtacg	4800
gcgtggtagg tccgaacgaa tccatggatt accctgttat ccctatccgg agttAACCTC	4860
gaggacttcg gaacttctag aaccagaccg ttcaagttaa acgctttct cccctcgag	4920
ggcctcccgccg ccgggttttgcg cgcctcccg cggggcccccc cctcctcactg gcgagcgctg	4980
ccacgtcaga cgaaggcgcg agcgagcgtc ctgatccttc cgccggacg ctcaggacag	5040
cggcccgctg ctcataagac tcggccttag aaccccagta tcagcagaag gacatttttag	5100
gacgggactt gggtagtctt agggcactgg ttttcttcc agagagcggaa acaggcggagg	5160
aaaagttagtc ctttctcgcc gattctgcgg agggatctcc gtggggcggt gaacgcccgt	5220
gattatataa ggacgcgcgg ggtgtggcac agctagttcc gtcgcagccg ggattttgggt	5280

cgcggttcctt	gtttgtggat	cgctgtgatc	gtcacttggt	gagtagcggg	ctgctgggct	5340		
gggtacgtgc	gctcggggtt	ggcgagtg	ttttgtgaag	tttttaggc	acctttgaa	5400		
atgtaatcat	ttgggtcaat	atgtat	ttttagac	ggcatgcggg	gggggggggg	ggcaattggc	5460	
ttctggccgt	ttttggcttt	ttttagac	ggcatgcggg	gggggggggg	ggcaattggc	5520		
caccatgggc	cccaagaaga	aaaggaaggt	ggcccccccc	accgacgtga	gcctggcga	5580		
cgagctgcac	ctggacggcg	aggacgtggc	catggcccac	gccgacgccc	tggacgactt	5640		
cgacactggac	atgctggcg	acggcgacag	ccccggcccc	ggcttcaccc	cccacgacag	5700		
cgccccctac	ggcgccctgg	acatggccga	cttcgagttc	gagcagatgt	tcaccgacgc	5760		
cctgggcac	gacgagtacg	gcggccat	ggagatgccc	gtggacagga	ttctggaggc	5820		
cgaactcgcc	gtggagcaga	aaagcgacca	ggcgtggag	ggcccccggc	gaaccggcgg	5880		
cagcggcagc	agccccaa	accccg	caacatctgc	caggccgccc	acaaggagct	5940		
gttcaccctg	gtggagtggg	ccaagaggat	tccccacttc	agcagcctgc	ccctggacga	6000		
ccaggtgatc	ctgctgaggg	ccggatggaa	cgagctg	atcgccagct	tcagccacag	6060		
gagcatcgac	gtgagggacg	gcatcctg	ggccaccggc	ctgcacgtcc	ataggaacag	6120		
cgcccac	gccggagtgg	gcgc	cgacagggtg	ctgaccg	ttgtgagcaa	6180		
gatgagggac	atgaggatgg	acaagaccga	gctggctgc	ctgagggcca	tcatcctgtt	6240		
caaccccgag	gtgagggg	tgaaaagcgc	ccaggagg	gagctg	ctga gaa	6300		
gtacgccc	ctggaggagt	acaccaggac	cacccacccc	gacgacccc	gcagattcgc	6360		
caagctg	ctgaggctgc	ccagc	tgatc	ctgac	ttggacac	6420		
gttcttcttc	aggctgatcg	g	catcgacacc	ttc	ctgatgg	agatgctgga	6480	
gagcccc	gacagctg	ccgg	actc	gatc	ttccagc	aggcagagg	6540	
agcgagc	cg	ggcgg	gcta	gggtgg	gagga	gcccggc	6600	
cctgg	gagatcc	g	gcaat	gggg	ggcttc	gcct	6660	
atcccc	c	agc	gtgc	ccat	ccac	aaactt	gccc	6720
ggcgg	act	ttg	actg	ccat	ccac	ttcc	gac	6780
gggagg	ct	tg	cccatt	tgg	ggact	tccc	g	6840
aaagg	ct	tt	gggg	ttcc	ccat	ttcc	cc	6900
ccct	c	cc	gg	ccat	gg	ccat	cc	6960
acc	at	cc	gg	gtgc	atcg	ttcg	cc	7020
cat	ct	gg	atcg	g	catcg	ccat	cc	7080
ctg	gagg	gg	atcg	gg	gagg	ccat	cc	7140
cccc	gg	gg	atcg	gg	atcg	ccat	cc	7200
ccac	gg	gg	atcg	gg	atcg	ccat	cc	7260
cc	gg	gg	atcg	gg	atcg	ccat	cc	7320
cc	gg	gg	atcg	gg	atcg	ccat	cc	

cagcgaggag	agcagcaaca	agggccagag	gcagctgacc	gtgagccccc	agtttcccg	7380
gatcaggccc	gagtgcgtgg	tgccc gagac	ccagtgcgcc	atgaaaagga	aggagaagaa	7440
ggcccagaag	gagaaggaca	agctgcccgt	gagcaccacc	accgtcgatg	accacatgcc	7500
ccccatcatg	cagtgcgagc	cccccccccc	cgaggccgccc	aggattcacf	aggtcgtgcc	7560
caggttcctg	agcgacaagc	tgctggtgac	caacaggcag	aagaacatcc	cccagctgac	7620
cgccaaccag	cagttcctga	tcgcccaggct	gatctggtat	caggacggct	acgagcagcc	7680
cagcgacgag	gacctgaaaa	ggatcaccca	gacctggcag	caggccgacg	acgagaacga	7740
ggagagcgac	acccccttca	ggcagatcac	cgagatgacc	atcctgaccg	tgcagctgat	7800
cgtggagttc	gccaaggggcc	tgcccgatt	cgccaagatc	agccagcccg	accagatcac	7860
cctgctgaag	gcttgcagca	gcgaggtgat	gatgctgagg	gtggccagga	ggtacgacgc	7920
cgccagcgac	agcatcctgt	tcgccaacaa	ccaggcttac	accagggaca	actacaggaa	7980
ggctggcatg	gccgaggtga	tcgaggacct	cctgcacttc	tgcagatgta	tgtacagcat	8040
ggccctggac	aacatccact	acgcccctgct	gaccgcccgt	gtgatcttca	gcgacaggcc	8100
cggcctggag	cagccccagc	tggtgagga	gatccagagg	tactacctga	acaccctgag	8160
gatctacatc	ctgaaccagc	tgagcggcag	cgccaggagc	agcgtgatct	acggcaagat	8220
cctgagcatc	ctgagcgagc	tgaggaccct	ggaatgcag	aacagaata	tgtgtatcag	8280
cctgaagctg	aagaacagga	agctgcccc	cttcctggag	gagatttggg	acgtggccga	8340
catgagccac	accagcccc	cccccatcct	ggagagcccc	accaacctgt	aatcgattta	8400
gacatgataa	gatacattga	tgagtttga	caaaccacaa	ctagaatgca	gtaaaaaaa	8460
tgcttaattt	gtgaaatttgc	tgtatgcatt	gcttaatttgc	taaccattat	aagctgcaat	8520
aaacaagtta	ataaaacatttgc	atttgcatt	ttatgtttca	gttcagggg	gagatgtggg	8580
aggttttta	aagcaagtaa	aacctctaca	aatgtggat	ctagagctct	tccaaataga	8640
tctggaaagg	gctgaggtac	gatgagaccc	gcaccagggt	cagaccctgc	gagtgtggcg	8700
gtaaacatat	taggaaccag	cctgtatgc	tggatgtgac	cgaggagctg	aggcccgtatc	8760
acttggtgct	ggcctgcacc	cgcgtgatgt	ttggctctag	cgatgaagat	acagatttag	8820
gtactgaaat	gtgtggcgt	ggcttaaggg	tggaaagaa	tatataaggt	gggggtctta	8880
tgtatgttttgc	agcagcccg	ccgcccgcatt	gagcaccaac	tcgtttgatg	9000	
gaagcattgt	gagctcatat	ttgacaacgc	gcatgcccc	atggccggg	gtgcgtcaga	9060
atgtatggg	ctccagcatt	gatggtcgcc	ccgtcctgcc	cgcaaactct	actaccttgc	9120
cctacgagac	cgtgtctgga	acgcccgtgg	agactgcagc	ctccgcccgc	gcttcagccg	9180
ctgcagccac	cgtccgcggg	attgtactg	actttgccttgc	cctgagcccg	cttgcacagca	9240
gtgcagcttc	ccgttcatcc	gcccgcgtat	acaagttgac	ggctcttttgc	gcacaattgg	9300
attcttgatgc	ccgggaactt	aatgtcgatgc	ctcagcagct	gttggatctg	cgccagcagg	9360
tttctccct	gaaggcttcc	tcccccacca	atgcggttta	aaacataaaat	aaaaaaaccag	

actctgtttg	gatttggatc	aagcaagtgt	cttgctgtct	ttat taggg	gttttgcgcg	9420
cgcggtaggc	ccgggaccag	cggctcggt	cgtt gagggt	cctgttatt	ttttccagga	9480
cgtggtaaag	gtgactctgg	atgttca	catgggcat	aagcccgct	ctggggtgga	9540
ggtagcacca	ctgcagagct	tcatgctcg	gggtgggtt	gtatgtatc	cagtcgtac	9600
aggagcgctg	ggcgtggtgc	ctaaaaatgt	ctttcagtag	caagctgatt	gccaggggca	9660
ggcccttgg	gtta	acaaagcggt	taagctgg	tgggtgcata	cgtggggata	9720
tgagatgcat	cttggactgt	atttttaggt	tggctatgtt	cccagccata	tccctccggg	9780
gattcatgtt	gtcagaacc	accagcacag	tgtatccgg	gcacttgg	aatttgtcat	9840
gtagcttaga	aggaaatgcg	tggaagaact	tggagacg	cttgcac	ccaagat	9900
ccatgcattc	gtccataatg	atggcaatgg	gcccacgg	ggcggcctgg	gcgaagat	9960
ttctgggatc	actaacgtca	tagttgtt	ccaggatgag	atcgcatag	gccat	10020
caaagcgcgg	gcggagggt	ccagactgcg	gtataatgg	tccatccgg	ccagggcgt	10080
agttaccctc	acagatttgc	atttccacg	cttgcgtt	agatgggg	atcatgtct	10140
cctgcggggc	gatgaagaaa	acggttccg	ggtaggg	gatcagctgg	gaagaaagca	10200
ggttcctgag	cagctgcac	ttaccgc	cggtggccc	gtaaatcaca	cctattaccg	10260
ggtaactg	gtat	tttgcgtt	tgccgtatc	cctgagcagg	ggggccactt	10320
cgttaagcat	gtccctgact	cgcat	ccctgac	atccgcaga	aggcgctcg	10380
cgc	ccagcga	tagcgtt	tgcaagg	caaagt	tttgcgtt	10440
ccgtaggcat	gctttgagc	gtttgac	gcagttccag	gcgg	ttccac	10500
cctgc	ctc	ggcatctcg	tccagcatat	ctc	cgggttgg	10560
gctgtacggc	agt	atcggt	gtcg	acggccagg	gtcatgtctt	10620
cagg	tc	tc	tctgggtc	ggtaagg	tgcgtccgg	10680
ggcc	cgggt	cg	ttgtcctg	gtgtcgt	cgctgcccgt	10740
cgc	gtcg	cc	aggcatt	tgaccat	gtcatagtcc	10800
cttggcgc	agcttgc	ctt	tgaggaggc	gccgcac	ggcagtgc	10860
ggc	gtag	ttt	tttgcgcga	gaaatacc	ttccgggag	10920
ccc	cgac	gt	ccacgacca	ggt	catccg	10980
cag	gttccc	ccat	gttttgc	tttccat	gccgggttcc	11040
acg	tcgg	tg	atgcgtt	tttcc	gttccat	11100
gacc	atgc	tt	tttgcgc	ttcaaccc	tcagctc	11160
ctat	gtcg	tc	actgttt	ttatcat	actcgat	11220
cag	cg	tc	tttgcgtt	ggcaggacc	gtttcgct	11280
tgt	cg	tt	tttgcgtt	tttgcgtt	ggtattcg	11340
ccac	aaac	ttt	tttgcgtt	ttatcgcc	catggcgg	11400

gctacgtctt gctggcggttc gcgacgcgag gctggatggc cttccccatt atgattcttc 11460
 tcgcttccgg cggtttccgg atgcccgcgt tgcaaggccat gctgtccagg caggtatgt 11520
 acgaccatca gggacagcgtt caaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt 11580
 tgctggcggtt tttccatagg ctccgcggcc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa 11640
 gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaaagct 11700
 ccctcggtcg ctctccgtt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gccttctcc 11760
 cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgttagt gtatctcagt tcgggttagg 11820
 tcgttcgctc caagctggc tgtgtgcacg aaccccccgt tcagccgcac cgctgcgcct 11880
 tatccggtaa ctatcgctt gagtccaacc cggttaagaca cgacttatcg ccactggcag 11940
 cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgttagg cggtgctaca gagttcttga 12000
 agtggtggcc taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggtatctgc gctctgctga 12060
 agccagttac cttcggaaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaacaa accaccgctg 12120
 gtagcggtgg ttttttgg tgcggcggc agattacgac cagaaaaaaa ggatctcaag 12180
 aagatccccc gatctttct acggggctcg acgctcagtga gacgaaaac tcacgttaag 12240
 ggatttttgtt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat 12300
 gaagttttaa atcaatctaa agtatatatg agtaaaacttg gtctgacagt taccaatgt 12360
 taatcagtga ggcacctatc tcagcgtatct gtctatttcg ttcatccata gttgcctgac 12420
 tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgcgtcaa 12480
 tgataccgcg agacccacgc tcaccggctc cagatttac agcaataaac cagccagccg 12540
 gaagggccga gcgcagaagt ggtccctgaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt 12600
 gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttatag tttgcgcac gttgttgcca 12660
 ttgcgtcagg catcggttg tcacgctcgt cggttggtat ggcttcatttc agctccgggtt 12720
 cccaaacgatc aaggcgagtt acatgatccc ccatgttgc caaaaaaaaagcg gttagctcct 12780
 tcggtcctcc gatcggttgc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg 12840
 cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaaat atgctttct gtgactgggt 12900
 agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgccccg 12960
 cgtcaacacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgcgtc atcattggaa 13020
 aacgttcttc gggcgaaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgtatgt 13080
 aacccactcg tgcacccaaac tgatcttcag catctttac tttcaccagc gtttctgggt 13140
 gagaaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaaggaaat aaggcgacca cggaaatgtt 13200
 gaataactcat actcttcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca 13260
 tgagcggata catatggaa tgtatggaa aaaa 13294

<210> 2
 <211> 13333
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic hIL-12 and hIL-21

2	60
taaacaata ggggttccgc gcacattcc ccgaaaagtgc acggccct ttcgtttca	120
attatattatc atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc acgaggccct ttcgtttca	180
atcatcaata atataccctt tttggattt aagccatat gataatgagg ggggggagtt	240
tgtgacgtgg cgccggcggt gggAACGGGG CGGGTGACGT AGTAGTGTGG CGGAAGTGTG	300
atgttgcaag tgtggcgaa cacatgtaag cgacggatgt ggccaaagtgc acgttttgg	360
tgtgcgcgg tgtacacagg aagtgacaat tttcgcgcgg ttttaggcgg atgtttagt	420
aaatgggc gtaaccgagt aagatttggc cattttcgcc ggaaaactga ataagagggaa	480
gtgaaatctg aataattttt tgttactcat agcgcgtat atttgcgtat ggagatccgg	540
taccgatatac ctagacaacg atgctgagct aactataacg gtcctaaggt agcgaccgcg	600
gagactaggt gtatattatct aagcgatcgc ttaattaagg cccggccgg caataaaaata	660
tctttatccc cattacatct gtgtgttggg tttttgtgt aatccatagt actaacatatac	720
gctctccatc aaaacaaaaac gaaacaaaaac aaactagcaa aataggctgt ccccagtgc	780
agtccaggtg ccagaacatt tctctatcca taatgcagggt gtaccgggtg atgacgggt	840
aaacctccaa ttgcggagta ctgtcctccg agcggagttac tgcctccga gcggagttact	900
gtcctccgag cggagttactg tcctccgagc ggagttactgt cctccgagcg gagttactgtc	960
ctccgagcg agagttcccg gggacctaga ggttatataa tgggtgcctt agctgggt	1020
tgacccatc ttccgttacg cccctgcagg ggcgcgcac gcgtcgaaga aggtgagtaa	1080
tcttaacatg ctctttttt tttttttgc taatccctt tgcgtgttga tgtaggt	1140
acatttacaa caaatgtttt ttcctgacag gaaaaacctt gctgggtacc ttcgttgc	1200
gacacttctt gtcctctact ttggaaaaaa ggaattgaga gccgctagcc caccatgggt	1260
caccagcagt tggcatctc ttggtttcc ctggttttc tggcatctcc cctcgtggcc	1320
atatggaaac tgaagaaaga tgtttatgtc gtatgttgg attggatcc ggtatccccct	1380
ggagaaatgg tggcctcac ctgtgacacc cctgaagaag atggatcac ctggacccctt	1440
gaccagagca gtgaggtctt aggctctggc aaaaccctga ccatccaagt caaagagttt	1500
ggagatgtg gccagttacac ctgtcacaaa ggaggcgagg ttctaaagcca ttcgtctcg	1560
ctgcttcaca aaaaggaaga tggatattgg tccactgata tttaaagga ccagaaagaa	1620
cccaaaaaata agacccctt aagatgcgag gccaagaatt attctggacg tttcacctgc	1680
tggtggctga cgacaatcag tactgatttt acattcagtg tcaaaagcag cagaggctct	1740
tctgacccccc aagggggtgac gtgcggagct gctacactct ctgcagagag agtcagaggg	1800
qacaacaagg agtatgagta ctcagtggag tgccaggagg acagtgcctg cccagctgct	1860

gaggagagtc tgcccattga ggtcatggtg gatgccgttc acaagctcaa gtatgaaaac 1920
tacaccagca gcttcttcat cagggacatc atcaaacctg acccacccaa gaacttgcag 1980
ctgaagccat taaaagaattc tcggcaggtg gaggtcagct gggagtaccc tgacacctgg 2040
agtactccac attcctactt ctccctgaca ttctgcgttc aggtccaggg caagagcaag 2100
agagaaaaaga aagatagagt cttcacggac aagacctcg ccacggtcat ctgcccggaaa 2160
aatgccagca ttagcgtgcf ggcccaggac cgctactata gctcatctt gagcgaatgg 2220
gcatctgtgc cctgcagttt gatcgattgc gcaaagctcc ccctctccct ccccccccccc 2280
taacgttact ggccgaagcc gcttggataa aggccgggtgt gcgtttgtct atatgttatt 2340
ttccaccata ttgccgtctt ttggcaatgt gagggcccccgg aaacctggcc ctgtcttctt 2400
gacgagcatt cctaggggtc tttccctctt cgccaaagga atgcaagggtc tggtaatgt 2460
cgtgaaggaa gcagttcctc tggaaagcttc ttgaagacaa acaacgtctg tagcaccct 2520
ttgcaggcag cgaaacccccc cacctggcga caggtgcctc tgcggccaaa agccacgtgt 2580
ataagataca cctgcaaagg cgacacaacc ccagtgcac gttgtgagtt ggatagttgt 2640
ggaaagagtc aaatggctct cctcaagcgt attcaacaag gggctgaagg atgcccagaa 2700
ggtaccccat tggatggat ctgatctgg gcctcgggtc acatgcttta catgtgttta 2760
gtcgaggtta aaaaacgtctt aggccccccg aaccacgggg acgtggttt ccttgaaaaa 2820
acacgatctc ttaagtctag cgccaccatg gttccagcgc gcagcctcct ccttggct 2880
accctggtcc tcctggacca cctcagttt gccagaaacc tccccgtggc cactccagac 2940
ccaggaatgt tcccatgcct tcaccactcc caaaacctgc tgaggccgt cagcaacatg 3000
ctccagaagg ccagacaaac tctagaattt tacccttgca cttctgaaga gattgatcat 3060
gaagatatac caaaagataa aaccacaca gtggaggcct gtttaccatt ggaattaaacc 3120
aagaatgaga gttgcctaaa ttccagagag acctcttca taactaatgg gagttgcctg 3180
gcctccagaa agacctttt tatgtggcc ctgtgccttta gtatgttta tgaagacttg 3240
aagatgtacc aggtggagtt caagaccatg aatgcaagc ttctgtatgg tcctaagagg 3300
cagatcttc tagataaaaa catgctggca gttattgtatg agctgtatgc ggccctgaat 3360
ttcaacagtg agactgtgcc aaaaaatcc tcccttgaag aaccggattt ttataaaaact 3420
aaaatcaagc tctgcatact tcttcatgct ttcagaattc gggcagtgcac tattgtataga 3480
gtgtatgtatgttccatgatggccatgatggccatgatggccatgatggccatgatggccatg 3540
cttcagaatc tcactaaaag aatagatagt cttcctttaa ctgaaaattt ttcccttacaa 3600
acagatataa acgtcaactg caccaccatg agaagcagcc ccggcaacat ggagagaatc 3660
gtgtatgtgcc tgatgggtat cttccctggc accctgggtc ataagagcag cagccaggcc 3720
caggacagac acatgatccg catgagacag ctgatgcaca tcgtggacca gctgaagaac 3780
tacgtgaacg acctgggtcc cgagttccctg cccggcccccgg aggacgtgga gaccaactgc 3840
qagtggqagcg cttcagctg cttccagaag gcccagctga agtccgcacca caccggcaac 3900

aacgagagaa tcatcaacgt gagcatcaag aagctgaagc ggaagccccc cagcaccaac	3960
gccggaagaa gacagaagca cagactgacc tgtcccagct gcgacagcta cgagaagaag	4020
cccccaagg agttcctgga gagattcaag agcctgctgc aaaagatgat ccaccagcac	4080
ctgagcagca gaacccacgg cagcgaggac agctgaatcg cctgcgcagc atgctcgca	4140
cctaagtccgg ccgctaaagt ttacgttagcg gccgcgtcga cgatagctt atgggtggca	4200
tccctgtgac ccctccccag tgcctctcct ggcctggaa gttgccactc cagtgccac	4260
cagccttgc ctaataaaat taagttgcat cattttgtct gactaggtgt cttctataa	4320
tattatgggg tggagggggg tggtatggag caagggcaa gttggaaaga caacctgtag	4380
ggcctgcggg gtctattggg aaccaagctg gagtcagtg gcacaatctt ggctcaactgc	4440
aatctccgcc tcctgggttc aagcgattct cctgcctcag cctcccgagt tggggatt	4500
ccaggcatgc atgaccaggc tcagctaatt ttttttttt tggtagagac ggggtttac	4560
catattggcc aggtggtct ccaactccta atctcaggtg atctacccac cttggcctcc	4620
caaattgtg ggattacagg cgtgaaccac tgctcccttc cctgtccttc tgatttaaa	4680
ataactatac cagcaggagg acgtccagac acagcatagg ctacctggcc atgccaacc	4740
ggtggacat ttgagttgct tgcttggcac tgcctctca tgcgtgggt ccactcagta	4800
gatgcctgtt gaattctgat taaaatcggt ccgcgtacgg cgtggtaggt ccgaacgaat	4860
ccatggatta ccctgttatac cctatccgga gtaacctcg aggacttcgg aacttctaga	4920
accagaccgt tcagttaaa cgctttctc cccctcgagg gcctccgcgc cgggtttgg	4980
cgcctccgc gggccccccc ctccacgg cgagcgctgc cacgtcagac gaagggcgca	5040
gcgagcgtcc tgatccttcc gcccggacgc tcaggacagc ggccgcgtc tcataagact	5100
cggccttaga accccagtt cagcagaagg acattttagg acggacttg ggtgactcta	5160
gggcactggc tttctttcca gagagcgaa caggcgagga aaagtagtcc cttctcgccg	5220
attctgcgga gggatctccg tggggcggtg aacgcccgtt attatataag gacgcgcccgg	5280
gtgtggcaca gctagttccg tcgcagccgg gattttggtc gcgggtctt tttgtggatc	5340
gctgtatcg tcacttggtg agtagcgggc tgctggctg ggtacgtgc ctcggggttgc	5400
gcgagtgtgt tttgtgaagt ttttttaggc ccttttggaa tgtaatcatt tgggtcaata	5460
tgtattttc agtgttagac tagtaaatttgc tccgctaaat tctggccgtt tttggcttt	5520
ttgttagacg gcatgcgggg gggggggggg gcaattggcc accatggcc ccaagaagaa	5580
aaggaaggtg gccccccca ccgacgtgag cctggcgac gagctgcacc tggacggcgaa	5640
ggacgtggcc atggcccacg ccgacgcccgg ggacgacttc gacctggaca tgctggcgaa	5700
cggcgacagc cccggccccg gcttcacccccc ccacgacagc gccccctacg gcgcctggaa	5760
catggccgac ttgcgttgc agcagatgtt caccgacgcc ctgggcattcg acgagttacgg	5820
cggccatatg gagatgcccgg tggacaggat tctggaggcc gaactcgccg tggagcagaa	5880
aagcgaccag ggcgtggagg gccccggcgaa acccgccggc agcggcagca gccccaaacga	5940

ccccgtgacc aacatctgcc aggccgccga caagcagctg ttcaccctgg tggagtggc 6000
caagaggatt ccccacttca gcagcctgcc cctggacgac caggtatcc tgctgagggc 6060
cggatggaac gagctgctga tcgccagctt cagccacagg agcatcgacg tgagggacgg 6120
catcctgctg gccaccggcc tgcacgtcca taggaacagc gcccacagcg ccggagtgg 6180
cgccatcttc gacagggtgc tgaccgagct ggtgagcaag atgagggaca tgaggatgga 6240
caagaccgag ctgggctgcc tgagggccat catcctgttc aaccccgagg tgaggggcct 6300
gaaaagcgcc caggaggtgg agctgctgag ggagaaggtg tacgcccggcc tggaggagta 6360
caccaggacc acccaccggc acgagccgg cagattcgcc aagctgctgc tgaggctgcc 6420
cagcctgagg agcatcgcc tgaagtgcct ggagcacctg ttcttcttca ggctgatcg 6480
cgacgtgccc atcgacacct tcctgatgga gatgctggag agcccccagcg acagctgagc 6540
cgccaactcg ctgtagtaat tccagcgaga ggcagagggc gcgagcgggc ggcgggctag 6600
ggtggaggag cccggcgagc agagctgcgc tgcggcgctc ctggaaaggag agatccggag 6660
cgaatagggg gcttcgcctc tggccagcc ctccccgtga tccccccagcc agcgggtgc 6720
aaccctagcc gcatccacga aactttgccc atagcagcgg gcgggcactt tgcactggaa 6780
cttacaacac ccgagcaagg acgcgactct cccgacgcgg ggaggctatt ctgcccattt 6840
ggggacactt ccccgccgct gccaggaccc gcttctctga aaggctctcc ttgcagctgc 6900
ttagacgctg gatTTTTTC gggtagtgga aaaccagcag cctcccgca ccagatctgc 6960
caccatgaag ctgctgagca gcatcgagca ggcttgcgc acatctgcaggc tgaagaagct 7020
gaagtgcagc aaggagaagc ccaagtgcgc caagtgcctg aagaacaact gggagtgcag 7080
atacagcccc aagaccaaga ggagccccct gaccagggcc cacctgaccg aggtggagag 7140
caggctggag aggctggagc agctgttcct gctgatcttc cccagggagg acctggacat 7200
gatcctgaag atggacagcc tgcaagacat caaggccctg ctgaccggcc tgttcgtgca 7260
ggacaacgtg aacaaggacg ccgtgaccga caggctggcc agcgtggaga ccgacatgcc 7320
cctgaccctg aggacgcaca ggatcagcgc caccagcagc agcgaggaga gcagcaacaa 7380
ggccagagg cagctgaccg tgagccccga gtttccggg atcaggcccc agtgcgtggt 7440
gcccggacc cagtgcgcga tgaaaaggaa ggagaagaag gcccagaagg agaaggacaa 7500
gctgcccgtg agcaccacca ccgtcgatga ccacatgccc cccatcatgc agtgcgagcc 7560
cccccccccc gaggccgcga ggattcacga ggtcgtgccc agttcctga gcgacaagct 7620
gctggtgacc aacaggcaga agaacatccc ccagctgacc gccaaccagc agttcctgat 7680
cgccaggctg atctggtac aggacggcta cgagcagccc agcgacgagg acctgaaaag 7740
gatcacccag acctggcagc aggccgacga cgagaacgag gagagcgcaca cccccttcag 7800
gcagatcacc gagatgacca tcctgaccgt gcagctgatc gtggagttcg ccaagggcct 7860
gcccggattc gccaagatca gccagcccgaa ccagatcacc ctgctgaagg cttgcagcag 7920
cgaggtatg atgctgaggg tggccaggag gtacgacgcgcc gccagcgcaca gcatcctgtt 7980

cgccaacaac caggcttaca ccagggacaa ctacaggaag gctggcatgg ccgaggtat	8040
cgaggacctc ctgcacttct gcagatgtat gtacagcatg gccctggaca acatccacta	8100
cgccctgctg accgcccgtgg ttagtcttcag cgacaggccc ggcctggagc agccccagct	8160
ggtggaggag atccagaggt actacctgaa caccctgagg atctacatcc tgaaccagct	8220
gagcggcagc gccaggagca gcgtgatcta cggcaagatc ctgagcatcc tgagcgagct	8280
gaggaccctg ggaatgcaga acagcaatat gtgtatcagc ctgaagctga agaacaggaa	8340
gctgcccccc ttcctggagg agattggga cgtggccgac atgagccaca cccagcccc	8400
ccccatcctg gagagccccca ccaacctgtg aatcgattag acatgataag atacattgat	8460
gagtttggac aaaccacaac tagaatcag tgaaaaaaat gcttaatttgc tgaaatttgc	8520
gatgctatttgc cttaatttgc aaccattata agctgcaata aacaagttaa taaaacatttgc	8580
gcattcattt tatgtttcag gttcaggggg agatgtggga gttttttaa agcaagttaa	8640
acctctacaa atgtggtac tagagctctt ccaaataatgc ctggaagggtg ctgaggtagc	8700
atgagacccg caccagggtgc agaccctgcg agtgtggcg taaacatatt aggaaccagc	8760
ctgtgtatgc ggtatgtgacc gaggagctga ggcccgatca cttggtgctg gcctgcaccc	8820
gcgcgtgatgtt tggctctagc gatgaagata cagattgagg tactgaaatgc tggtggcg	8880
gcttaagggt gggaaagaat atataaggtg ggggtcttgc gtagttttgc atctgtttgc	8940
cagcagccgc cgccgcctatgc agcacaact cgtttgtatgc aagcattgtg agctcatatt	9000
tgacaacgcg catgccccca tgggccccggg tgcgtcagaa tgtgtatggc tccagcattgc	9060
atggtcgccc cgtcctgcggcc gcaaactcta ctaccttgc ctacgagacc gtgtctggaa	9120
cgccgttggaa gactgcagcc tccgcgcgc cttcagccgc tgccagccacc gcccgcgggaa	9180
ttgtgacttgc ctggctttgc ctgagccgc ttgcaagcag tgccagttgc cggtcatccg	9240
cccgcgtatgc caagtttgcg gctctttgg cacaatttgc ttctttgacc cgggaacttgc	9300
atgtcgtttc tcagcagctg ttggatctgc gccagcagggt ttctgcctgc aaggcttcct	9360
ccccctccaa tgcggttaa aacataaata aaaaaccaga ctctgtttgg atttggatca	9420
agcaagtgtc ttgtgttgc ttttagggg ttttgcgcgc gcggtaggcc cgggaccagc	9480
ggtctcggtc gttgagggtc ctgtgtatgc ttccaggac gtggtaaagg tgactctggatgc	9540
tgttcagata catggcata agccgtctc tgggggtggag gtagcaccac tgccagatgc	9600
catgctgcgg ggtgggttg tagatgtatgc agtcgtatgc ggagcgttgc gcgtgggtgc	9660
aaaaatgtc ttctgtatgc aagctgatttgc ccaggggcag gcccttggatgc taagtgtttgc	9720
caaagcggtt aagctggat gggatgcatac gtggggatgc gagatgcatttgc ttggactgtatgc	9780
tttttaggtt ggctatgttc ccagccatgc ccctccgggg attcatgttgc tgccagaacca	9840
ccagcacagt gtatccggat cacttggaa atttgcattgc tagcttagaa gggaaatgcgt	9900
ggagaactt ggagacgcgc ttgtgacctc caagatttgc catgcattgc tccataatgc	9960
tggcaatggg cccacgggcgc gcggcctggg cgaagatatt tctggatca ctaacgtcat	10020

agttgtgttc caggatgaga tcgtcatagg ccattttac aaagcgccgg cgaggaggc 10080
 cagactgcgg tataatggtt ccatccggcc cagggcgta gttaccctca cagatttgc 10140
 tttcccacgc tttgagttca gatgggggga tcgtgtctac ctgcggggcg atgaagaaaa 10200
 cggtttccgg ggttaggggag atcagctggg aagaaagcag gttcctgagc agctgcgact 10260
 taccgcagcc ggtgggccccg taaatcacac ctattaccgg gtgcaactgg tagttaagag 10320
 agctgcagct gccgtcatcc ctgagcaggg gggccacttc gttaagcatg tccctgactc 10380
 gcatgttttc cctgacccaaa tccgcccagaa ggcgctcgcc gcccagcgt agcagttctt 10440
 gcaaggaagc aaagtttttc aacggttga gaccgtccgc cgtaggcatg ctttgaggcg 10500
 tttgaccaag cagttccagg cggtcccaca gctcggtcac ctgctctacg gcatctcgat 10560
 ccagcatatc tcctcgtttc gcgggttggg gcggcttgc ctgtacggca gtatcggtg 10620
 ctcgtccaga cgggccaggg tcgtgtctt ccacggcgc agggtcctcg tcagcgttagt 10680
 ctgggtcacf gtgaaggggt ggcgtccggg ctgcgcgtg gccagggtgc gttgaggct 10740
 ggtcctgctg gtgtgaagc gtcgcggc ttcgcctgc gcgtcgccca gtagcattt 10800
 gaccatggtg tcatagtcca gcccctccgc ggcgtggccc ttggcgcgca gcttgccctt 10860
 ggaggaggcg ccgcacgagg ggcagtgcag acttttgggg gcgtagagct tggcgcgag 10920
 aaataccgat tccggggagt aggcattccgc gccgcaggcc ccgcagacgg tctcgattt 10980
 cacgagccag gtgagctctg gccgttcggg gtcaaaaacc aggtttcccc catgttttt 11040
 gatgcgtttc ttacctctgg tttccatgag ccgggtgtcca cgctcggtga cgaaaaggct 11100
 gtccgtgtcc ccgtatacag acttgagagg cctgtcctcg accgatgccc ttgagagcct 11160
 tcaaccagt cagtccttc cgggtggcgc ggggcattgac tatcgctgccc gcacttatga 11220
 ctgtcttctt tatcatgcaa ctcgtaggac aggtgcccggc agcgctctgg gtcattttcg 11280
 gcgaggaccg ctttcgctgg agcgacgatc tgatcgccct gtcgcgtcg gtattcgaa 11340
 tcttgacgc cctcgctcaa gccttcgtca ctgggtcccgc caccaaacgt ttcggcgaga 11400
 agcaggccat tatcgccggc atggcgcccg acgcgttggg ctacgtcttg ctggcggtcg 11460
 cgacgcgagg ctggatggcc ttccccattt tgattctt cgttccggc ggcattcgaa 11520
 tgcccgctt gcaggccatg ctgtccaggc aggttagatga cgaccatcag ggacagcttc 11580
 aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcgaaa ttccataggc 11640
 tccgcccccc tgacgagcat cacaataatc gacgctcaag tcagagggtgg cgaaacccga 11700
 caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaaagctc cctcgctgc tctcctgttc 11760
 cgaccctgccc gcttaccggc tacctgtccg ctttctccc ttccggaaagc gtggcgcttt 11820
 ctcatagctc acgctgttagg tatctcagtt cggtgttaggt cgttcgctcc aagctgggct 11880
 gtgtgcacga accccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgcttgc 11940
 agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggattt 12000
 gcagagcgag gtatgttaggc ggtgctacag agttcttggaa gtggcgccct aactacggct 12060

acaactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa	12120
gagttggtag ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcgggttgt tttttgttt	12180
gcaaggcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atctttctta	12240
cggggctctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gatTTTggtc atgagattat	12300
caaaaaggat cttcacctag atccTTTaa attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa	12360
gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagttag gcacctatct	12420
cagcgatctg tctatTTcgt tcatccatag ttgcctgact ccccgctgt tagataacta	12480
cgatacggga gggcttacca tctggccccca gtgctgcaat gataccgcga gacccacgct	12540
cacggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg aaggGCCGAG cgcagaagtg	12600
gtcctgcaac tttatccgccc tccatccagt ctattaattt ttgcgggaa gctagagtaa	12660
gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctgcaggc atcgtggtgt	12720
cacgctcgtc gtttggtagt gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtttta	12780
catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggTCCCTCG atcgttgtca	12840
gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta	12900
ctgtcatgcc atccgtaaga tgctttctg tgactggtagt gtactcaacc aagtcatctt	12960
gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct cttggccggc gtcaacacgg gataataccg	13020
cGCCACATAG cagaacttta aaagtgcgtca tcattggaaa acgttctcg gggcgaaaac	13080
tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgtt acccactcgt gcacccaaact	13140
gatcttcagc atctttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa	13200
atgcccggaaa aaagggata agggcgacac ggaaatgtt aataactcata ctcttccttt	13260
ttcaatatttttta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat	13320
gtatttagaa aaa	13333

<210> 3
<211> 11553
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic mIL-21 and mIL-15

1400 3

taaacaata ggggttccgc gcacatttcc cggaaaagtgc ccacctgacg tcttaaagaaac 30
cattattatc atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc acgaggccct ttcgtcttca 120
attaatcgca ccggtatcta tgtcggtgc ggagaaaagag gtaatgaaat ggcagctagc 180
atcatcaata atatacccta ttttggattt aagccatat gataatgagg gggtgtggagtt 240
tgtgacgtgg cgccgggcgt gggAACGGGG cgggtgacgt agtagtgtgg cggaaagtgtg 300
atgttgcaga g tgtggcgaa cacatgttaag cgacggatgt ggcaaaaagtgc acgtttttgg 360
tgtgcgccgg tgtacacagg aagtgacaat tttcgcgcgg ttttaggcgg atgttgttagt 420

aaatttggc gtaaccgagt aagatttgc cattttcgcg ggaaaactga ataagaggaa	480
gtgaaatctg aataattttg tgttactcat agcgcgtaat atttgtctag ggagatccgg	540
taccgatatac ctagacaacg atgctgagct aactataacg gtcctaaggt agcaccgcg	600
gagactaggt gtatttatct aagcgatcgc ttaattaagg ccggccgccc caataaaata	660
tctttatctt cattacatct gtgtgttgg ttttgtgt aatcgatagt actaacatac	720
gctctccatc aaaacaaaac gaaacaaaac aaactagcaa aataggctgt ccccagtgca	780
agtgcaggtg ccagaacatt tctctatcga taatgcaggt cgaggactg tcctccgagc	840
ggagtagtgcgt cctccgagcg gagtagtgc tcggagcgg agtactgtcc tccgagcgg	900
gtactgtcct ccgagcggag tactgtcctc cgagcggaga ctcttcgaag gaagagggc	960
ggggtcgatc gaccccgccc ctcttccttc gaaggaagag gggcggggtc gaagacctag	1020
agggtatata atgggtgcct tagctgggt gtgagctcat cttccgttag atcacgcgtc	1080
gaagaagggtg agtaatctta acatgctctt ttttttttt tttgctaatc cttttgtgt	1140
gctgatgtta ggatgacatt tacaacaaat gttgttcct gacaggaaaa accttgctgg	1200
gtaccttcgt tgccggacac ttcttgcctt ctactttgga aaaaaggaat tgagagccgc	1260
taggcacc accatggatgg ccctgggtg cctgggtgtg atcttcctgg gcaccgtggc	1320
ccacaagagc agcccccagg gacccgacag gctgctgatc cggctgagac acctgatcga	1380
catcgtggag cagctgaaga tttacgagaa cgacctggac cccgagctgc tgtccgcccc	1440
ccaggacgtg aaggccact gcgagcacgc cgccctcgcc tgcttcaga aggccaagct	1500
gaagcccagc aaccccgca acaacaagac cttcatcattc gacctgggtg cccagctgag	1560
aaggaggctg cccgccagga gggcgccaa gaagcagaag cacatgcca agtgcggcag	1620
ctgcgacagc tacgagaagc ggaccccaa ggagttcctg gagaggctga agtggctgct	1680
gcaaaagatg atccaccagc acctgagctg agttggcgaa gctcgaaattt attgatcccc	1740
cgggctgcag gaattcgata tcaagctcg gatccgaatt ccgcgggggg ccccccccc	1800
cccttaacgt tactggccga agccgcttgg aataaggccg gtgtgcgttt gtctatatgt	1860
tatttccac catattgccc tctttggca atgtgagggc ccggaaacct ggccctgtct	1920
tcttgacgag cattcctagg ggtcttccc ctctcgccaa aggaatgcaa ggtctgttgaa	1980
atgtcgtaa ggaaggcgtt cctctggaaag cttcttgaag acaaacaacg tctgttagcga	2040
cccttgcag gcagcggAAC ccccccacctg gcgcacagggt cctctcgccg caaaagccac	2100
gtgtataaga tacacctgca aaggcggcac aaccccgatg ccacgttgc agttggatag	2160
ttgtggaaag agtcaaattgg ctctcctcaa gcgtattcaa caaggggctg aaggatgccc	2220
agaaggtacc ccattgtatg ggatctgatc tggggcctcg gtgcacatgc tttacatgt	2280
tttagtcgag gttaaaaaaaaa cgtctaggcc ccccgaaacca cggggacgtg gttttcctt	2340
aaaaaacacg atgataatat ggccacaacc atgaagatcc tgaagcccta catgaggaac	2400
accagcatca gctgttacct gtgcttcctg ctgaacagcc acttcctgac cgaggccgga	2460

atccacgtct tcatcctggg ctgcgtgagc gtgggcctgc ccaagaccga ggccaactgg	2520
atcgacgtga ggtacgaccc ggagaagatc gagagcctga tccagagcat ccacatcgac	2580
accaccctgt acaccgacag cgacttccac cccagctgca aggtgaccgc catgaactgc	2640
ttcctgctgg agctgcaagt gatcctgcac gagtacagca acatgaccct gaacgagacc	2700
gtgaggaacg tgctgtacct ggctaacagc accctgagca gcaacaagaa cgtggccgag	2760
agcggctgca aggagtgtga ggagctggag gagaagacct tcaccgagtt cctccagagc	2820
ttcatcagga tcgtgcagat gttcatcaac accagctgaa tcgattgcgc aaagctttcg	2880
cgataggcga gaccaatggg tgtgtacgta gcggccgctc gagaacttgt ttattgcagc	2940
ttataatggt tacaataaa gcaatagcat cacaatttc acaaataaag cattttttc	3000
actgcattct agttgtggtt tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tctcgacgg	3060
cgtggtaggt ccgaacgaat ccatggatta ccctgttatac cctatccgga gttaacctcg	3120
aggacttcgg aacttctaga accagaccgt tcagttaaa cgctttctc cccctcgagg	3180
gcctccgcgc cgggtttgg cgcctccgc gggcgcccc ctcctcacgg cgagcgctgc	3240
cacgtcagac gaagggcgca gcgagcgtcc tgcgtttcc gcccggacgc tcaggacagc	3300
ggcccgctgc tcataagact cggccttaga accccagtt cagcagaagg acattttagg	3360
acgggacttg ggtgactcta gggcactggc tttctttcca gagagcggaa caggcgagga	3420
aaagtagtcc cttctcgcg attctcgga gggatctccg tggggcggtg aacgcccgt	3480
attatataag gacgcgcgg gtgtggcaca gctagttccg tcgcagccgg gatttgggtc	3540
gcggtttttg tttgtggatc gctgtgatcg tcacttgggt agtagcggc tgctggctg	3600
ggtacgtgcg ctcgggttg gcgagtgtgt tttgtgaagt ttttaggca cttttgaaa	3660
tgtatcatt tgggtcaata tgcattttc agtgttagac tagtaaattt tccgctaaat	3720
tctggccgtt tttggcttt ttgttagacg gcatgcgggg ggggggggg gcaattggcc	3780
accatgggcc ccaagaagaa aaggaaggtg gccccccca ccgacgtgag cctggcgac	3840
gagctgcacc tggacggcga ggacgtggcc atggcccacg ccgacgcct ggacgacttc	3900
gacctggaca tgctggcga cggcgcacagc cccggccccg gttcaccccc ccacgacagc	3960
gccccctacg gcgccttggc catggccgac ttgcgtttcg agcagatgtt caccgacgac	4020
ctgggcacatcg acgagtacgg cggccatatg gagatgcccc tggacaggat tctggaggcc	4080
gaactcgccg tggagcagaa aagcgaccag ggcgtggagg gccccggcgg aaccggcgcc	4140
agcggcagca gccccaaacga ccccggtgacc aacatctgcc aggccgcccga caagcagctg	4200
ttcacccctgg tggagtggc caagaggatt ccccaacttca gcagcctgccc cctggacgac	4260
caggtgatcc tgctgagggc cggatggaac gagctgctga tcgcccgttt cagccacagg	4320
agcatcgacg tgagggacgg catcctgctg gccaccggcc tgcacgtcca taggaacagc	4380
gcccacagcg cggagtggg cgccatcttc gacagggtgc tgaccgagct ggtgagcaag	4440
atgagggaca tgaggatggc caagaccgag ctggcgtgcc tgagggccat catcctgttc	4500

aaccccgagg	tgaggggcct	gaaaagcgcc	caggaggtgg	agctgctgag	ggagaaggtg	4560
tacgccgccc	tggaggagta	caccaggacc	accaccccg	acgagcccg	cagattcgcc	4620
aagctgctgc	tgaggctgcc	cagcctgagg	agcatcgcc	tgaagtgcct	ggagcacctg	4680
ttcttcttca	ggctgtatcg	cgacgtgccc	atcgacacct	tcctgtatgga	gatgctggag	4740
agccccagcg	acagctgagc	cggcaactcg	ctgtagtaat	tccagcgaga	ggcagaggga	4800
gcgagcgggc	ggcgggctag	ggtggaggag	cccgccgagc	agagctgcgc	tgcgggcgtc	4860
ctgggaaggg	agatccggag	cgaatagggg	gcttcgcctc	tggccagcc	ctcccgtga	4920
tcccccagcc	agcggtgcc	aaccctagcc	gcatccacga	aactttgccc	atagcagcgg	4980
gcgggcactt	tgcactggaa	cttacaacac	ccgagcaagg	acgcgactct	cccgacgcgg	5040
ggaggctatt	ctgcccattt	ggggacactt	ccccgcccgt	gccaggaccc	gcttctctga	5100
aaggctctcc	ttgcagctgc	tttagacgctg	gattttttgc	ggtagtggaa	aaaccagcag	5160
cctcccgcga	ccagatctgc	caccatgaag	ctgctgagca	gcatcgagca	ggcttgcgac	5220
atctgcagggc	tgaagaagct	gaagtgcagc	aaggagaagc	ccaagtgcgc	caagtgcctg	5280
aagaacaact	gggagtgcag	atacagcccc	aagaccaaga	ggagccccct	gaccagggcc	5340
cacctgaccg	aggtggagag	caggctggag	aggctggagc	agctttcct	gctgatcttc	5400
cccagggagg	acctggacat	gatcctgaag	atggacagcc	tgcaagacat	caaggccctg	5460
ctgaccggcc	tgttcgtgca	ggacaacgtg	aacaaggacg	ccgtgaccga	caggctggcc	5520
agcgtggaga	ccgacatgcc	cctgaccctg	aggcagcaca	ggtcagcgc	caccagcagc	5580
agcgaggaga	gcagcaacaa	gggccagagg	cagctgaccg	tgagccccga	gtttcccggg	5640
atcaggcccg	agtgcgtggt	gcccagacc	cagtgcgc	tgaaaaggaa	ggagaagaag	5700
gcccagaagg	agaaggacaa	gctgcccgtg	agcaccacca	ccgtcgatga	ccacatgccc	5760
cccatcatgc	agtgcgagcc	cccccccccc	gaggccgc	ggattcacga	gtcgtgccc	5820
agttcctga	gcpacaagct	gctgggtgacc	aacaggcaga	agaacatccc	ccagctgacc	5880
gccaaccagc	agttcctgat	cgccaggctg	atctggtata	aggacggcta	cgagcagccc	5940
agcgacgagg	acctgaaaag	gatcaccac	acctggcagc	aggccgacga	cgagaacgag	6000
gagagcgaca	cccccttcag	gcagatcacc	gagatgacca	tcctgaccgt	gcagctgatc	6060
gtggagttcg	ccaagggcct	gcccggattc	gccaagatca	gccagccga	ccagatcacc	6120
ctgctgaagg	cttgcagcag	cgaggtgat	atgctgaggg	tggccaggag	gtacgacgcc	6180
gccagcgaca	gcatcctgtt	cgccaacaac	caggcttaca	ccagggacaa	ctacaggaag	6240
gctggcatgg	cgaggtgat	cgaggac	ctgcacttct	gcagatgtat	gtacagcatg	6300
gccctggaca	acatccacta	cgccctgctg	accgcccgtgg	tgatcttcag	cgacaggccc	6360
ggcctggagc	agccccagct	ggtggaggag	atccagaggt	actacctgaa	caccctgagg	6420
atctacatcc	tgaaccagct	gagcggcagc	gccaggagca	gcgtgatcta	cgccaagatc	6480
ctgagcatcc	tgagcgagct	gaggaccctg	ggaatgcaga	acagcaatat	gtgtatcagc	6540

ctgaagctga agaacaggaa gctgcccccc ttccctggagg agatttggga cgtggccgac	6600
atgagccaca cccagcccccc ccccatcctg gagagccccca ccaacctgtg aatcgattag	6660
acatgataag atacattgtat gagtttggac aaaccacaac tagaatgcag tgaaaaaaat	6720
gcttaatttgc taaaatttgc taaaatttgc taaaatttgc taaaatttgc taaaatttgc	6780
aacaagttaa taaaacattt gcattcattt tatgtttcag gttcaggggg agatgtggga	6840
ggttttttaa agcaagtaaa acctctacaa atgtggtac tagagctctt ccaaataat	6900
ctggaagggtg ctgaggtacg atgagacccg caccagggtgc agaccctgcg agtgtggcgg	6960
taaacatatt aggaaccagc ctgtgtatgc ggtatgtgacc gaggagctga ggcccgtatca	7020
cttgggtgtgc gcctgcaccc gcgcgtgatgc tggctctagc gatgaagata cagattgagg	7080
tactgaaatgtgtggcgtg gcttaagggtt gggaaagaat atataagggtt ggggtcttat	7140
gtatgtttgtt atctgtttgtt cagcagccgc cgccgcatttgc agcacaact cgtttgtatgg	7200
aagcattgttgc agctcatatt tgacaacgcgc catgccccca tgggccccccatggatgc	7260
tgtgtatggc tccagcatttgc atggtcgcgc cgtcctgcgc gcaaactcta ctaccttgc	7320
ctacgagacc gtgtctggaa cgccgttggaa gactgcagcc tccgcgcgc cttcagccgc	7380
tgcagccacc gcccgcgggaa ttgtgactga ctttgctttc ctgagccgc ttgcaagcag	7440
tgcagcttcc cggtcatccgc cccgcgtatgc caagttgcacg gctctttgg cacaattgg	7500
ttctttgacc cgggaactta atgtcgtttc tcagcagctgc ttggatctgc gccagcagg	7560
ttctgcctgc aaggcttcctt cccctcccaa tgcgggtttaa aacataaata aaaaaccaga	7620
ctctgtttgg atttggatca agcaagtgtc ttgctgtctt tatttagggg ttttgcgcgc	7680
gcggtaggccc cgggaccagc ggtctcggtc gttgagggtc ctgtgtatggatgc	7740
gtggtaaagg tgactctggaa tggtcagata catgggcata agccgcgc tgggggtggag	7800
gtagcaccac tgcagagctt catgctgcgg ggtgggttttgc tagatgtatcc agtcgtatgc	7860
ggagcgcgttgc gcgtgggtgc taaaatgtc tttcagtagc aagctgatttgc ccagggcag	7920
gcccttgggttgc taagtgttttgc caaagcgggtt aagctgggtt ggggtgcataccatgc	7980
gagatgcacatc ttggactgtatgc ttttttaggtt ggctatgttc ccagccatgc ccctccgggg	8040
attcatgttgc tgcagaacca ccagcacatgc gtatccgggtt cacttggaa atttgcgtatgc	8100
tagcttagaa ggaaatgcgtt ggaagaactt ggagacgcgc ttgtgacctc caagatgtttc	8160
catgcatttcg tccataatgc tggcaatggg cccacgggcgc gcggccgtgg cgaagatatt	8220
tctggatca ctaacgtatgc agttgtgttc caggatgaga tcgtcatagg ccatttttgc	8280
aaagcgcggg cggagggtgc cagactgcgg tataatgggtt ccattccggcc caggggcgttgc	8340
gttaccctca cagatttgc tttccacgc tttgagttca gatggggggatgc tcatgtctac	8400
ctgcggggcg atgaagaaaa cggtttccgg ggttagggggatgc tcatgtctac	8460
gttcctgagc agctgcgttgc taccgcagcc ggtggggccgc taaatcacac ctattaccgg	8520
gtgcaacttgc tagttaagag agctgcgttgc ggcgtcatcc ctgagcaggg gggccacttc	8580

gttaagcatg tccctgactc gcatgtttc cctgaccaaa tccgccagaa ggcgctcgcc	8640
gcccagcgat agcagttctt gcaaggaagc aaagttttc aacggttga gaccgtccgc	8700
cgtaggcatg ctttgagcg tttgaccaag cagttccagg cggtcccaca gctcggtcac	8760
ctgctctacg gcatctcgat ccagcataatc tcctcgttc gcgggttggg gcggcttcg	8820
ctgtacggca gtatgcggtg ctcgtccaga cgggcccagg tcatgtctt ccacgggcgc	8880
agggtcctcg tcagcgtagt ctgggtcacg gtgaagggt ggcgtccggg ctgcgcgctg	8940
gccagggtgc gcttgaggct ggtcctgctg gtgctgaagc gctgccgtc ttcgcctgc	9000
gcgtcggcca ggtagcattt gaccatggtg tcatagtcca gcccctccgc ggcgtggccc	9060
ttggcgcgca gcttgccctt ggaggaggcg ccgcacgagg ggcagtgcag actttgagg	9120
gcgttagagct tgggcgcgag aaataccgat tccggggagt aggcatccgc gccgcaggcc	9180
ccgcagacgg tctcgatttc cacgagccag gtgagctctg gccgttcggg gtcaaaaacc	9240
aggtttcccc catgctttt gatgcgtttc ttacctctgg tttccatgag ccggtgtcca	9300
cgctcggtga cgaaaaggct gtccgtgtcc ccgtatacag acttgagagg cctgtcctcg	9360
accgatgccc ttgagagcct tcaaccagt cagctccttc cgggtggcgc ggggcatgac	9420
tatcgtcgcc gcacttatga ctgtcttctt tatcatgca ctcgttaggac aggtgccggc	9480
agcgctctgg gtcattttcg gcgaggaccg cttcgctgg agcgcgacga tgatcggcct	9540
gtcgcttgcg gtattcggaa tcttgacacgc cctcgctcaa gccttcgtca ctggtcccgc	9600
caccaaacgt ttcggcgaga agcaggccat tatcgccggc atggcggccg acgcgctggg	9660
ctacgtcttgcg ctggcggttcg cgacgcgagg ctggatggcc ttccccattt tgattcttct	9720
cgcttccggc ggcacatcgga tgcccgctt gcaggccatg ctgtccaggc aggttagatga	9780
cgaccatcag ggacagcttc aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt	9840
gctggcggtt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaataatc gacgctcaag	9900
tcagaggtgg cgaaacccga caggactata aagataccag gcgttccccctt ctggaaagctc	9960
cctcggtcgc tctcctgttc cgaccctgccc gcttaccggc tacctgtccg ctttctccc	10020
ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgttagg tatctcagtt cgggttaggt	10080
cgttcgctcc aagctggct gtgtgcacga acccccccgtt cagccgcacc gctgcgcctt	10140
atccggtaac tatcgtcttgcg agtccaaaccc ggtaaagacac gacttatcgc cactggcagc	10200
agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgttaggc ggtgtcacag agttcttggaa	10260
gtgggtggcct aactacggct acactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgtcaa	10320
gccagttacc ttccggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaacaaa ccaccgctgg	10380
tagcggtggcgtt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga	10440
agatcccttgcg atctttctta cggggcttgcg cgtcgttgcg aacgaaaact cacgttaagg	10500
gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atcctttaa attaaaaatg	10560
aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaaacttgg tctgacagtt accaatgttt	10620

aatcagttag gcacccatct cagcgatctg tctatttcgt tcataccatag ttgcctgact 10680
ccccgtcgtg tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggccca gtgctgcaat 10740
gataccgcga gacccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg 10800
aagggccgag cgccagaatgt gtcctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg 10860
ttgcccggaa gctagagtaa gtatcgcc agttaatagt ttgcgcacg ttgttgcac 10920
tgctgcaggc atcgtggtgt cacgctcgac gtttggatag gcttcattca gctccgggtc 10980
ccaacgatca aggcgagttt catgatcccc catgttgc aaaaaagcgg ttagctcctt 11040
cggtccctccg atcgttgtca gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc 11100
agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgttaaga tgctttctg tgactggta 11160
gtactcaacc aagtcttttctt gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgtc cttgcccggc 11220
gtcaacacgg gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgcctca tcattggaaa 11280
acgttcttcg gggcgaaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgt 11340
acccactcgt gcacccaaact gatcttcagc atctttact ttcaccagcg tttctgggtg 11400
agcaaaaaca ggaaggcaaa atgcccggaaa aaagggaata agggcgacac ggaaatgtt 11460
aatactcata ctcttccttt ttcaatattt ttgaagcatt tattcagggtt attgtctcat 11520
gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaa 11553

<210> 4
<211> 12279
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic mIL-12

<400> 4
taaacaata gggttccgc gcacattcc ccgaaaagtgc ccacctgacg tctaagaaac 60
cattattatc atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc acgaggccct ttcgtcttca 120
attaatcgca ccgttatcta tgtcgggtgc ggagaaaagag gtaatgaaat ggcagctagc 180
atcatcaata atatacccta ttttggattt aagccaatat gataatgagg gggtggagtt 240
tgtgacgtgg cgcggggcgt gggAACgggg cgggtgacgt agtagtgtgg cgaaagtgtg 300
atgttgcagat tggcggaa cacatgttaa cgacggatgt ggcaaaagtgc acgttttgg 360
tgtgcgccgg tgtacacagg aagtgacaat tttcgccgg ttttaggcgg atgttgttagt 420
aaatttggc gtaaccgagt aagatttggc cattttcgcc ggaaaactgaa ataagagggaa 480
gtgaaatctg aataattttt tgttactcat agcgcgtaat atttgtctag ggagatccgg 540
taccgatatc ctagacaacg atgctgagct aactataacg gtcctaagg agcgaccgcg 600
gagacttaggt gtatttatct aagcgatcgc ttaattaagg ccggccgccc caataaaaata 660
tctttatccc cattacatct gtgtgtggt tttttgtgtg aatcgatagt actaacatac 720
gctctccatc aaaacaaaaac gaaacaaaaac aaactagcaa aataggctgt ccccagtgc 780

agtgcaggtg ccagaacatt tctctatcga taatgcaggt cggagtactg tcctccgagc	840
ggagtactgt cctccgagcg gagtactgtc ctccgagcgg agtactgtcc tccgagcgg	900
gtactgtcct ccgagcggag tactgtcctc cgagcggaga ctcttcgaag gaagaggggc	960
ggggtcgatc gaccccgccc ctcttccttc gaaggaagag gggcggggtc gaagacctag	1020
agggtatata atgggtgcct tagctggtgt gtgagctcat cttcctgttag atcacgcgtc	1080
gaagaaggtg agtaatctta acatgctctt tttttttttt tttgctaatc cttttgtgt	1140
gctgatgtta ggtatgacatt tacaacaaat gtttgttcct gacaggaaaa accttgctgg	1200
gtaccttcgt tgccggacac ttcttgcct ctactttgga aaaaaggaat tgagagccgc	1260
tagcgccacc atgtgccccc agaagctgac catcagctgg ttcgccccatcg tgctgctgg	1320
gagcccccctg atggccatgt gggagctgga gaaggacgtg tacgtggtgg aggtggactg	1380
gaccccccac gccccccggcg agaccgtgaa cctgacttgc gacaccccg aggaggacga	1440
catcacctgg accagcgacc agagacacgg cgtcatcgcc agcggcaaga ccctgaccat	1500
caccgtgaag gagttcctgg acgcccggaca gtacacctgt cacaagggcg gcgagaccc	1560
gagccacagc caccgttgc tgcacaagaa ggagaacggc atctggagca ccgagatcct	1620
gaagaacttc aagaacaaga ctttcctgaa gtgcgaggcc cccaaactaca gcggcagatt	1680
cacctgttagc tggctggtgc agagaaacat ggacctgaag ttcaacatca agagcagcag	1740
cagcagcccc gacagcagag ccgtgacatg cggcatggcc agcctgagcg ccgagaaggt	1800
gaccctggac cagagagact acgagaagta cagcgtgagc tgccaggagg acgtgacctg	1860
tcccaccgc gaggagaccc tgcccatcga gcttgcctg gaagccagac agcagaacaa	1920
gtacgagaac tacagcacca gcttcttcatt cagagacatc atcaagcccg acccccc	1980
gaacctccag atgaagcccc tgaagaacag ccaggtggag gtgtcctggg agtaccccga	2040
cagctggagc accccccaca gctacttcag cctgaagttc ttcgtgagaa tccagagaaa	2100
gaaggagaag atgaaggaga ccgaggaggg ctgcaaccag aagggcgctt tcctggtgga	2160
gaaaaccagc accgaggtgc agtgcacagg cggcaacgtg tgtgtgcagg cccaggacag	2220
atactacaac agcagctgct ccaagtggc ctgcgtgccc tgccgctga gaagctgagt	2280
tggcgcagct cgaattcatt gatccccgg gctgcaggaa ttgcataatca agctcgggat	2340
ccgaattccg ccccccccccc ctaacgttac tggccgaagc cgcttggaaat	2400
aaggccgtg tgcgtttgtc tatatgttat tttccaccat attgcgtct ttggcaatg	2460
tgagggcccg gaaacctggc cctgtttct tgacgagcat tcctaggggt ctttccctc	2520
tcgcacaaagg aatgcacagg ctgtgaatg tcgtgaagga agcagttcct ctggaaagctt	2580
cttgaagaca aacaacgtct gtagcgaccc tttgcaggca gcggaaacccc ccacctggcg	2640
acaggtgcct ctgcggccaa aagccacgtg tataagatac acctgcaaaag gcggcacaac	2700
cccagtgcca cgttgtgagt tggatagttg tggaaagagt caaatggctc tcctcaagcg	2760
tattcaacaa ggggctgaag gatgcccaga aggtacccca ttgtatggga tctgatctgg	2820

ggcctcggtg cacatgcttt acatgtgttt agtcgagggtt aaaaaaacgt ctaggcccccc	2880
cgaaccacgg ggacgtggtt ttcccttgaa aaacacgatg ataatatggc cacaaccatg	2940
tgccagagca gatacctgtt gttcctggct accctggccc tgctgaacca cctgagcctg	3000
gcccgcgtga tccccgtgag cggcccccgc agatgcctga gccagagcag aaacctgttgc	3060
aaaacaaccg acgacatggt gaaaaccgcc agagagaagc tgaagcacta cagctgcacc	3120
gccgaggaca tcgaccacga ggacatcacc agagaccaga ccagcaccct gaaaacctgt	3180
ctgccccctgg agctgcacaa gaacgagagc tgccctggcta ccagagagac cagcagcacc	3240
accagaggca gctgcctgcc cccccagaaa accagcctga tgatgaccct gtgcctgggc	3300
agcatctacg aggacctgaa gatgtaccag accgagttcc aggccatcaa cgccgcctg	3360
caaaaccaca accaccagca gatcatcctg gacaaggca ttttggcgc catcgacgag	3420
ctgatgcaga gcctgaacca caacggcgag accctgagac agaagcccc cgtggcgcag	3480
gccgaccctt acagagtgaa gatgaagctg tgcatcctgc tgacgcctt cagcaccaga	3540
gtggtgacca tcaacagagt gatggctac ctgagcagcg cctgaatcga ttgcgcaaag	3600
ctttcgcgtat aggcgagacc aatgggtgtg tacgtacggc cgcgtcgaga acttgtttat	3660
tgcagttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt	3720
tttttcactg cattcttagtt gtggttgtc caaactcatc aatgtatctt atcatgtctc	3780
gtacggcggtg gtaggtccga acgaatccat ggattaccct gttatcccta tccggagta	3840
acctcgagga cttcggact tctagaacca gaccgttcag tttaaacgct cttctcccc	3900
tgcagggcct cgcgcgggg tttggcgcc tcccgcgggc gccccctcc tcacggcgag	3960
cgctgccacg tcagacgaag ggccgcgcga gcgtcctgat cttccgcggc ggacgctcag	4020
gacagcggcc cgctgctcat aagactcggc cttagaaccc cagtatcagc agaaggacat	4080
tttaggacgg gacttgggtg actctagggc actggtttc tttccagaga gcggaacagg	4140
cgagggaaag tagtcccttc tcggcgattc tgccggaggga tctccgtgg gcggtaacg	4200
ccgatgatta tataaggacg cgccgggtgt ggcacagcta gttccgtcgc agccgggatt	4260
tgggtcgccg ttcttgggtg tggatcgctg tgatcgac ttggtgagta gcggctgct	4320
gggctggta cgtgcgcctcg ggggtggcga gtgtgtttt tgaagtttt taggcacctt	4380
ttgaaatgta atcatttggg tcaatatgta atttcagtg ttagactagt aaattgtccg	4440
ctaaattctg gccgttttg gctttttgt tagacggcat gcgggggggg gggggggcaa	4500
ttggccacca tggcccccaa gaagaaaagg aagggtggccc cccccaccga cgtgacgcctg	4560
ggcgcacgac tgcacctgga cggcgaggac gtggccatgg cccacgcga cgcctggac	4620
gacttcgacc tggacatgct gggcgacggc gacagccccg gccccggctt caccggccac	4680
gacagcggcc cctacggcgc cctggacatg gccgacttcg agttcgagca gatgttacc	4740
gacgcctgg gcatcgacga gtacggcggc catatggaga tgccctggaa caggattctg	4800
gaggccgaac tcgcccgtgaa gcagaaaagc gaccaggcgc tggagggccc cggcggaaacc	4860

ggcggcagcg gcagcagccc caacgacccc gtgaccaaca tctgccaggc cgccgacaag	4920
cagctgttca ccctgggtgga gtgggccaag aggattcccc acttcagcag cctgcccctg	4980
gacgaccagg tgatcctgct gagggccgga tggAACGAGC tgctgatcgc cagttcagc	5040
cacaggagca tcgacgttag ggacggcatc ctgctggca ccggcctgca cgtccatagg	5100
aacagcgccc acagcgccgg agtgggcgcc atcttcgaca gggtgctgac cgagctggtag	5160
agcaagatga gggacatgag gatggacaag accgagctgg gctgcctgag ggccatcatc	5220
ctgttcaacc ccgaggtgag gggcctgaaa agcgcCcagg aggtggagct gctgagggag	5280
aagggttacg ccgcctgga ggagtacacc aggaccaccc accccgacga gcccggcaga	5340
ttcgccaagc tgctgctgag gctgcccagc ctgaggagca tcggcctgaa gtgcctggag	5400
cacctgttct tcttcaggct gatcggcgac gtgcccattcg acacccctt gatggagatg	5460
ctggagagcc ccagcgacag ctgagccggc aactcgctgt agtaattcca gcgagaggca	5520
gagggagcga gcggggcggcg ggctagggtg gaggagcccg gcgagcagag ctgcgctg	5580
ggcgtcctgg gaagggagat ccggagcgaa tagggggctt cgcctctggc ccagccctcc	5640
cgctgatccc ccagccagcg gtgcgcaacc ctgcgcac ccacgaaact ttgcctcatag	5700
cagcgggcgg gcactttgca ctggaactta caacacccga gcaaggacgc gactctccg	5760
acgcggggag gctattctgc ccattttggg acacttcccc gccgctgcca ggacccgctt	5820
ctctgaaagg ctctccttgc agctgcttag acgctggatt tttttcgggt agtggaaaac	5880
cagcagcctc ccgcgaccag atctgccacc atgaagctgc tgagcagcat cgagcaggct	5940
tgcgacatct gcaggctgaa gaagctgaag tgccagcaagg agaagccaa gtgcgccaag	6000
tgccctgaaga acaactggga gtgcagatac agcccaaga ccaagaggag cccctgacc	6060
agggccacc tgaccgaggt ggagagcagg ctggagaggc tggagcagct gttcctgctg	6120
atcttccccca gggaggacct ggacatgatc ctgaagatgg acagcctgca agacatcaag	6180
gccctgctga ccggcctgtt cgtgcaggac aacgtgaaca aggacgcccgt gaccgacagg	6240
ctggccagcg tggagaccga catgccccctg accctgaggc agcacaggat cagcgcacc	6300
agcagcagcg aggagagcag caacaagggc cagaggcagc tgaccgtgag ccccgagtt	6360
cccgatca ggcccagtg cgtgggccc gagacccagt gcgcctgaa aaggaaggag	6420
aagaaggccc agaaggagaa ggacaagctg cccgtgagca ccaccaccgt cgatgaccac	6480
atgcccccca tcatgcagtg cgagcccccc ccccccggagg cgcgcaggat tcacgagg	6540
gtgcccaggt tcctgagcga caagctgctg gtgaccaaca ggcagaagaa catccccag	6600
ctgaccgcca accagcagtt cctgatcgcc aggctgatct ggtatcagga cggctacgag	6660
cagcccagcg acgaggacct gaaaaggatc acccagacct ggcagcaggc cgacgacgag	6720
aacgaggaga ggcacacccc cttcaggcag atcaccgaga tgaccatcct gaccgtgcag	6780
ctgatcgtgg agttcgccaa gggcctgccc ggattcgcca agatcagcca gcccggacc	6840
atcaccctgc tgaaggctt cagcagcag gtgtatgatgc tgagggtggc caggaggtac	6900

gacgcccgc	g	cgacagcat	cctgttcgc	aacaaccagg	cttacaccag	ggacaactac	6960					
aggaaggct	g	catggccg	ga	gtgatcgag	gac	ctcctgc	acttctgcag	atgtatgtac	7020			
agcatggccc	tggacaacat	ccactacg	cc	ctgctgaccg	ccgtgg	tgat	ctgcac	7080				
aggcccggcc	tggagcag	cc	agctgg	tg	gaggagat	cc	agaggta	cctgaacacc	7140			
ctgaggatct	acatc	ctgaa	cc	agctgagc	ggc	agcgc	cc	ggagcagcgt	gatctacggc	7200		
aagatc	c	ctg	g	cgagctgagg	acc	ctgg	aa	tgcagaacag	caatatgtgt	7260		
atcagc	c	ctg	g	ag	ctg	actg	ccccc	ttcc	tggaggagat	ttgggacgt	7320	
gccgacat	ga	ccacac	cc	cccccccc	atc	ctgg	aga	gcccc	accaa	cctgtgaatc	7380	
gattagacat	gataagata	ac	ttgatgag	ttgg	aca	aaac	caca	actaga	atgc	agtgt	7440	
aaaaatg	ctt	aattt	tg	gaa	attt	gtgat	ctatt	gtt	taacc	attataa	gct	7500
gcaataaaca	agttaataaa	ac	atttgc	at	cattt	at	ttc	agg	ggagat	7560		
gtgggagg	ttt	aaag	ca	ag	aaa	ac	ct	aca	at	gtt	gat	7620
atagatct	gg	aagg	gt	ta	gg	tg	ac	gt	ca	cc	gag	7680
tggcggt	aaa	catatt	tag	acc	agc	ct	gt	gg	at	gt	gg	7740
cgatc	actt	g	t	gct	gg	c	gc	ac	cc	tgg	gg	7800
ttgagg	tact	gaa	at	gt	gt	gg	tc	at	cg	at	g	7860
tcttat	gt	ttt	gt	at	ct	gt	tt	gc	ag	cc	actc	7920
tgat	gga	ac	tt	gt	gag	ct	ca	at	tg	ac	tc	7980
tcagaat	gt	gg	ct	cc	at	gg	cc	cc	cc	at	tc	8040
ctt	gac	ct	ac	cc	gt	gt	cc	ct	cc	cc	gt	8100
agcc	gct	gca	cc	acc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	8160
aagc	agt	gca	g	ctt	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	8220
attggatt	tct	tg	ac	cc	gg	gg	aa	tt	gg	cc	aca	8280
gcagg	ttt	c	cc	ct	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	8340
accagact	ct	ttt	gg	at	ttt	cc	cc	cc	cc	cc	cc	8400
g	cg	cg	cg	cc	gg	gg	gg	gg	gg	gg	gg	8460
caggac	gt	gg	taa	agg	tg	at	gg	at	gg	at	gg	8520
gtgg	agg	tg	ac	ct	tg	at	cc	tg	at	cc	tg	8580
gt	ag	tg	ca	ac	tt	ca	tc	tg	tt	cc	at	8640
ggc	cagg	cc	tt	gg	ta	aa	cc	gg	tt	cc	at	8700
ggat	at	tt	tt	ac	tt	tt	cc	gg	tt	cc	at	8760
ccgg	gg	at	tt	tg	tg	ca	cc	gg	tg	cc	at	8820
gtc	at	tt	tg	tg	gg	aa	tt	gg	tg	cc	at	8880
at	ttt	cc	at	tc	gt	cc	cc	cc	cc	cc	cc	8940

gatatttctg ggatcactaa cgtcatagtt gtgttccagg atgagatcgt cataggccat	9000
ttttacaaag cgcgggcgga gggtgccaga ctgcggtata atggttccat ccggcccagg	9060
ggcgtagtttta ccctcacaga tttgcatttc ccacgcttg agttcagatg gggggatcat	9120
gtctacctgc ggggcgatga agaaaacggt ttccgggta ggggagatca gctggaaaga	9180
aagcagggttc ctgagcagct gcgacttacc gcagccggg gccccgtaaa tcacacccat	9240
taccgggtgc aactggtagt taagagagct gcagctgccc tcatccctga gcaggggggc	9300
cacttcgtta agcatgtccc tgactcgcat gttttccctg accaaatccg ccagaaggcg	9360
ctcgccgccc agcgatagca gttcttgcaa ggaagcaaag ttttcaacg gttttagacc	9420
gtccggcgtta ggcattgttt tgagcgtttt accaaggagt tccaggcggt cccacagctc	9480
ggtcacctgc tctacggcat ctcgatccag catatctcct cgtttcgccg gttggggcgg	9540
ctttcgctgt acggcagtag tcggtgctcg tccagacggg ccagggtcat gtcttccac	9600
gggcgcaggg tcctcgtag cgtagttctgg gtcacgggtga aggggtgcgc tccggctgc	9660
gchgctggcca gggtgcgctt gaggctggc tcgctggc tgaaggcgt ccggcttcg	9720
ccctgcgcgt cggccaggta gcatttgcacc atgggtgtcat agtccagccc ctccgcggcg	9780
tggcccttgg cgccgcgtt gcccggag gaggcgccgc acgaggggca gtgcagactt	9840
ttgagggcgt agagcttggg cgcgagaaat accgattccg gggagtaggc atccgcgccc	9900
caggccccgc agacggtctc gcattccacg agccagggtga gctctggccg ttcggggtca	9960
aaaaccaggat ttccccatg cttttgatg cgttttttac ctctgggttc catgagccgg	10020
tgtccacgct cggtgacgaa aaggctgtcc gtgtccccgt atacagactt gagaggccgt	10080
tcctcgaccg atgcccattga gaggcttcaa cccagtcagc tccttccgg gggcgcgggg	10140
catgactatc gtgcggcac ttatgactgt cttttttatc atgcaactcg taggacagg	10200
gcccggcgcg ctctgggtca ttttcggcga ggaccgctt cgctggagcg cgacgatgat	10260
cggcctgtcg cttgcggtat tcggaatctt gcacgcccctc gctcaaggct tcgtcactgg	10320
tcccggcacc aaacgttcg gcgagaagca ggccattatc gcccggatgg cggccgacgc	10380
gctgggctac gtcttgctgg cggtcgac gcgaggctgg atggcattcc ccattatgat	10440
tcttcgcgt tccggcggca tcggatgcc cgccgtgcag gccatgctgt ccaggcagg	10500
agatgacgac catcaggac agcttcaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc	10560
cgcgttgctg gcgttttcc ataggctccg ccccccgtac gagcatcaca aaaatcgacg	10620
ctcaagttagt aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt ttccccctgg	10680
aagctccctc gtgcgtctc ctgttccgac cctgcccgtt accggatacc tgtccgcctt	10740
tctccctcg ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc tgttaggtatc tcagttcggt	10800
gtaggcgtt cgctccaagc tggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg	10860
cgccttatcc ggttaactatc gtcttgagtc caacccggta agacacgact tatcgccact	10920
ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggat gtaggcggcgtc tacaagat	10980

cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaaggaca gtatttggta tctgcgctct 11040
 gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac 11100
 cgctggtagc ggtgggtttt ttgttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc 11160
 tcaagaagat ccttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggAACG aaaactcACG 11220
 ttaagggatt ttggcatga gattatcaa aaggatCTTC acctagatCC tttAAATTa 11280
 aaaatgaagt ttAAATCAA tctaaagtat atatgagtaa acttggtctg acagttacca 11340
 atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta tttcgTTcat ccatagttgc 11400
 ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat acgggaggGC ttaccatctg gcccAGTgc 11460
 tgcaatgata ccgcgagacc cacgctcacc ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc 11520
 agccggaagg gccgagcgcA gaagtggtcc tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat 11580
 taattgtgc cgggaagcta gagtaagtag ttgcggcagtt aatagttgc gcaacgttgt 11640
 tgccattgct gcaggcatcg tgggtgcacg ctcgtcgTTT ggtatggcTT cattcagctc 11700
 cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg atccccatg ttgtcAAAAA aacgcggtag 11760
 ctccttcggt cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat cactcatggt 11820
 tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac 11880
 tggtagtac tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgcaccga gttgctctg 11940
 cccggcgtca acacgggata ataccgcGCC acatagcaga actttAAAAG tgctcatcat 12000
 tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc aaggatctt ccgcgttga gatccagttc 12060
 gatgtAACCC actcgtgcac ccaactgatc ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc 12120
 tgggtgagca aaaacaggaa ggcaAAATgc cgcaAAAAAAG ggaataaggg cgacacggaa 12180
 atgttgaata ctcatcttct tccttttca atattattga agcatttATC agggTTATTG 12240
 tctcatgagc ggatacatat ttGAATGTat ttGAAaaaa 12279

<210> 5
 <211> 11601
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic hIL-21 and hIL-15

<400> 5
 taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaAGTg ccacctgacg tctaAGAAAC 60
 cattattatc atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc acgaggccct ttcgtcttca 120
 attaatcgca ccggtatcta tgtcgggtgc ggagaaAGAG gtaatgAAAT ggcagctAGC 180
 atcatcaata atataccTTA tttggattt aagccaatat gataatgagg gggtggagtt 240
 tggtagtgg cgcggggcgt gggAACGGGG cgggtgacgt agtagtgtgg cggAAAGTGTG 300
 atgttgcAG tggcggaa cacatgtaag cgacggatgt ggcaAAAGTg acgttttgg 360
 tggcggccgg tggcacacagg aagtgacaat ttgcgcgg ttttaggcgg atgttgtAGT 420

aaatttggc gtaaccgagt aagatttggc catttcgcg ggaaaactga ataagaggaa	480
gtgaaatctg aataatttg tgttactcat agcgcgtaat atttgcgt tag ggagatccgg	540
taccgatatc ctagacaacg atgctgagct aactataacg gtcctaaggt agcgaccgcg	600
gagactaggt gtatttatct aagcgatcgc ttaattaagg cggccgccc caataaaata	660
tctttatctt cattacatct gtgtgttgg ttttgcgt aatcgatagt actaacatac	720
gctctccatc aaaacaaaac gaaacaaaac aaactagcaa aataggctgt ccccagtgca	780
agtgcaggtg ccagaacatt tctctatcga taatgcaggt cgaggactg tcctccgagc	840
ggagtactgt cctccgagcg gagtactgtc ctccgagcgg agtactgtcc tccgagcgg	900
gtactgtcct ccgagcggag tactgtcctc cgagcggaga ctcttcgaag gaagagggc	960
ggggtcgatc gacccgccc ctcttccttc gaaggaagag gggcggggtc gaagacctag	1020
agggtatata atgggtgcct tagctgggt gtgagctcat cttccgttag atcacgcgtc	1080
gaagaaggta agtaatctta acatgcctt ttttttttt tttgctaattc cttttgtgt	1140
gctgatgtt ggtatgacatt tacaacaaat gtttgcctt gacaggaaaa accttgctgg	1200
gtaccttcgt tgccggacac ttcttcgtt ctactttgga aaaaaggaat tgagagccgc	1260
tagcgccacc atgagaagca gccccggcaa catggagaga atcgtatct gcctgtatgt	1320
gatcttcgtt ggcaccctgg tgcataagag cagcagccag ggccaggaca gacacatgt	1380
ccgcatgaga cagctgatcg acatcggtt ccagctgaag aactacgtga acgacctgtt	1440
gcccggatcc ctgccccggcc ccgaggacgt ggagaccaac tgcgagtgga ggccttcag	1500
ctgcttcag aaggcccagc tgaagtgccgc caacaccggc aacaacgaga gaatcatcaa	1560
cgtgagcatc aagaagctga agcggaaagcc ccccagcacc aacgccggaa gaagacagaa	1620
gcacagactg acctgtccca gctgcgacag ctacgagaag aagccccca aggagttcct	1680
ggagagattc aagagcctgc tgcaaaagat gatccaccag cacctgagca gcagaaccca	1740
cggcagcggag gacagcttag ttggcggagc tcgaattcat tgcgttccgg ggctgcagga	1800
attcgatatc aagctcgaa tccgaattcc gcccccccccc ccccccccccc cctaacgtt	1860
ctggccgaag ccgcttggaa taaggccgt gtgcgtttgt ctatatgtt tttccacca	1920
tattgccgtc tttggcaat gtgagggccc ggaaacctgg ccctgtcttc ttgacgagca	1980
ttccttaggg tctttccct ctcgccaag gaatgcaagg tctgttaat gtcgtgaagg	2040
aagcagttcc tctggaaagct tcttgaagac aaacaacgtc tgcgtgcacc ctttgcaggc	2100
agcggaaaccc cccacctggc gacaggtgcc tctgcggcca aaagccacgt gtataagata	2160
cacctgaaa ggcggcacaa ccccagtgcc acgttgcgtt ttggatagtt gtggaaagag	2220
tcaaatggct ctcctcaagc gtattcaaca aggggctgaa ggatgcccag aaggtacccc	2280
attgtatggg atctgatctg gggcctcggt gcacatgctt tacatgtgtt tagtcgaggt	2340
taaaaaaaacg tctaggcccc ccgaaccacg gggacgtgg tttcccttga aaaacacgat	2400
gataatatgg ccacaaccat gagaatcagc aagccccacc tgagaagcat cagcatccag	2460

tgttacctgt	gcctgctgct	gaacagccac	ttcctgaccg	aggccggtat	ccacgtcttc	2520
atcctgggct	gcttcagcgc	cggaactgccc	aagaccgagg	ccaactgggt	gaacgtgatc	2580
tctgacctga	agaagatcga	ggacctgatc	cagtccatgc	acatcgacgc	caccctgtac	2640
accgagagcg	acggttcatcc	cagctgcaag	gtgaccgcca	tgaagtgctt	cctgctggag	2700
ctgcaagtga	tctccctgga	gagcggcgac	gccagcatcc	acgacaccgt	ggagaacctg	2760
attatcctgg	ctaaacaacag	cctgagcagc	aacggcaacg	tgaccgagag	cggctgcaag	2820
gagtgtgagg	agctggagga	gaagaacatc	aaggagttcc	tccagagctt	cgtgcataatc	2880
gtccagatgt	tcatcaacac	cagctgaatc	gattgcgcaa	agcttcgcg	ataggcgaga	2940
ccaatgggtg	tgtacgtagc	ggccgctcga	gaacttgttt	attgcagctt	ataatggta	3000
caaataaagc	aatagcatca	caaatttcac	aaataaaagca	ttttttcac	tgcattctag	3060
ttgtggtttgc	tccaaactca	tcaatgtatc	ttatcatgtc	tcgtacggcg	tggttaggtcc	3120
gaacgaatcc	atggattacc	ctgttatccc	tatccggagt	taacctcgag	gacttcggaa	3180
cttctagaac	cagaccgttc	agtttaaacg	ctcttctccc	cctcgagggc	ctccgcgcg	3240
ggttttggcg	cctcccgccg	gcgcggccct	cctcacggcg	agcgctgcca	cgtcagacga	3300
agggcgccagc	gagcgtcctg	atccttccgc	ccggacgctc	aggacagcgg	cccgctgctc	3360
ataagactcg	gccttagaac	cccagtatca	gcagaaggac	attttaggac	gggacttggg	3420
tgactctagg	gcactggttt	tctttccaga	gagcggaaaca	ggcgaggaaa	agttagtcct	3480
tctcggcgat	tctgcggagg	gatctccgtg	gggcggtgaa	cgccgatgtatataagga		3540
cgcgcgggt	gtggcacagc	tagttccgtc	gcagccggga	tttgggtcgc	ggttcttgc	3600
tgtggatcgc	tgtgatcgtc	acttggtag	tagcgggctg	ctgggctggg	tacgtgcgt	3660
cggggttggc	gagtgtgttt	tgtgaagttt	tttaggcacc	tttgaatatg	taatcatttgc	3720
ggtaaatatg	taattttcag	tgttagacta	gtaaattgtc	cgctaaattc	tggccgttt	3780
tggctttttt	gttagacggc	atgcgggggg	gggggggggc	aattggccac	catggcccc	3840
aagaagaaaa	ggaaggtggc	ccccccacc	gacgtgagcc	tggcgcacga	gctgcacctg	3900
gacggcgagg	acgtggccat	ggcccacgccc	gacgcccctgg	acgacttcga	cctggacatg	3960
ctgggcgacg	gcgcacagccc	cggcccccggc	ttcacccccc	acgacagcgc	cccctacggc	4020
gccctggaca	tggccgactt	cgagttcgag	cagatgttca	ccgacgcctt	gggcacatcgac	4080
gagtacggcg	gccatatgg	gatgcccgtg	gacaggattc	tggaggccga	actcgccgt	4140
gagcagaaaa	gcgaccaggg	cgtggagggc	ccggcggaa	ccggcggcag	cgccagcagc	4200
cccaacgacc	ccgtgaccaa	catctgccc	gccgcccaca	agcagctgtt	caccctgggt	4260
gagtggccca	agaggattcc	ccacttcagc	agcctgcccc	tggacgacca	ggtgatcctg	4320
ctgagggccg	gatggaacga	gctgctgatc	gccagcttca	gccacaggag	catcgacgt	4380
agggacggca	tcctgctggc	caccggcctg	cacgtccata	ggaacagcgc	ccacagcgcc	4440
ggagtggcg	ccatcttcga	cagggtgctg	accgagctgg	tgagcaagat	gagggacatg	4500

aggatggaca agaccgagct gggctgcctg agggccatca tcctgttcaa ccccgaggtg	4560
aggggcctga aaagcgccca ggaggtggag ctgctgaggg agaagggtgt a cgccgcccctg	4620
gaggagtaca ccaggaccac ccaccccgac gagccggca gattgcctaa gctgctgctg	4680
aggctgccc gcctgaggag catcgccctg aagtgcctgg agcacctgtt cttcttcagg	4740
ctgatcgccg acgtgccc catcgccctc ctgatggaga tgctggagag ccccagcgcac	4800
agctgagccg gcaactcgct gtagtaattc cagcgagagg cagagggagc gagcgggccc	4860
cgggctaggg tggaggagcc cggcgagcag agctgcgctg cgggcgtcct gggaaaggag	4920
atccggagcg aatagggggc ttgcctctg gcccagccct cccgctgatc ccccagccag	4980
cggtgcgcaa ccctagccgc atccacgaaa cttgcctcat agcagcgggc gggcactttg	5040
cactggaact tacaacacccc gagcaaggac gcgactctcc cgacgcgggg aggctattct	5100
gcccatattgg ggacacttcc cgcgcctgc caggacccgc ttctctgaaa ggctctcctt	5160
gcagctgctt agacgctgga ttttttcgg gtagtggaaa accagcagcc tcccgcgacc	5220
agatctgcca ccatgaagct gctgagcagc atcgagcagg cttgcacat ctgcaggctg	5280
aagaagctga agtgcagcaa ggagaagccc aagtgcgcca agtgcctgaa gaacaactgg	5340
gagtgcagat acagcccaa gaccaagagg agcccccgtga ccagggccca cctgaccgag	5400
gtggagagca ggctggagag gctggagcag ctgttcctgc ttagtctccc cagggaggac	5460
ctggacatga tcctgaagat ggacgcctg caagacatca aggccctgct gaccggcctg	5520
ttcgtgcagg acaacgtgaa caaggacgcc gtgaccgaca ggctggccag cgtggagacc	5580
gacatgcccc tgaccctgag gcagcacagg atcagcgcca ccagcagcag cgaggagagc	5640
agcaacaagg gccagaggca gctgaccgtg agcccccagt ttcccggat caggcccgag	5700
tgcgtggtgc ccgagaccca gtgcgcctatg aaaaggaagg agaagaaggc ccagaaggag	5760
aaggacaagc tgccctgag caccaccacc gtcgtatgacc acatgcccc catcatgcag	5820
tgcgagcccc cccccccga ggccgccagg attcacgagg tcgtgcctcag gttcctgagc	5880
gacaagctgc tggtgaccaa caggcagaag aacatcccc agctgaccgc caaccagcag	5940
ttcctgatcg ccaggctgat ctggtatcag gacggctacg agcagccctg cgacgaggac	6000
ctgaaaagga tcacccagac ctggcagcag gccgacgacg agaacgagga gagcgcacacc	6060
cccttcaggc agatcaccga gatgaccatc ctgaccgtgc agctgatcgt ggagttcgcc	6120
aaggcctgc ccggattcgc caagatcagc cagcccgacc agatcaccct gctgaaggct	6180
tgcagcagcg aggtgatgat gctgagggtg gccaggaggt acgacgcccgc cagcgacagc	6240
atcctgttcg ccaacaacca ggcttacacc agggacaact acaggaaggc tggcatggcc	6300
gaggtgatcg aggacctcct gcacttctgc agatgtatgt acagcatggc cctggacaac	6360
atccactacg ccctgctgac cgccgtggtg atcttcagcg acaggccgg cctggagcag	6420
ccccagctgg tggaggagat ccagaggtac tacctgaaca ccctgaggat ctacatcctg	6480
aaccagctga gcggcagcgc caggagcagc gtgatctacg gcaagatcct gaggatcctg	6540

agcgagctga ggaccctggg aatgcagaac agcaatatgt gtatcagcct gaagctgaag	6600
aacaggaagc tgccccccctt cctggaggag atttggacg tggccgacat gagccacacc	6660
cagccccccc ccatcctgga gagccccacc aacctgtcaa tcgattagac atgataagat	6720
acattgtga gtttggacaa accacaacta gaatgcagtg aaaaaaatgc ttaatttgc	6780
aaatttgc tgctattgct taatttgcgaa ccattataag ctgcaataaa caagttaata	6840
aaacatttgc attcatttta tgtttcaggt tcagggggag atgtggagg ttttttaaag	6900
caagtaaaac ctctacaaat gtggtatcta gagctttcc aaatagatct ggaaggtgct	6960
gaggtacat gagacccgca ccaggtgcag accctgcgag tgtggcgta aacatattag	7020
gaaccagcct gtgatgctgg atgtgaccga ggagctgagg cccgatcaact tggtgctggc	7080
ctgcacccgc gctgagtttgc gctctagcga tgaagataca gattgaggta ctgaaatgt	7140
tgggcgtggc ttaagggtgg gaaagaatat ataagggtgg ggtcttatgt agttttgtat	7200
ctgttttgcgca gcagccgccc ccgccccatg ggcgggggtg cgtcagaatg tgatggc	7260
ctcatatttgc acaacgcgca tgccccatg ggcgggggtg cgtcagaatg tgatggc	7320
cagcattgtat ggtcgccccg tcctgcccgc aaactctact accttgcacct acgagaccgt	7380
gtctggaaacg ccgttggaga ctgcaggctc cggccggcgt tcagccgctg cagccaccgc	7440
ccgcgggatt gtgactgact ttgccttcct gagccgcctt gcaagcagtg cagttcccg	7500
ttcatccgccc cgcgatgaca agttgacggc tctttggca caattggatt ctttgaccgc	7560
ggaacttaat gtcgtttctc agcagctgtt ggatctgcgc cagcagggtt ctgcctgaa	7620
ggcttcctcc cctcccaatg cggttaaaa cataaataaa aaaccagact ctgtttggat	7680
ttggatcaag caagtgtctt gctgtttta tttaggggtt ttgcgcgcgc ggtaggcccg	7740
ggaccagcgg tctcggtcgt tgagggtcct gtgtatttt tccaggacgt gtaaaagggt	7800
actctggatg ttcaagataca tgggcataag cccgtctctg gggtgaggt agcaccactg	7860
cagagcttca tgctgcgggg tgggtttgtat gatgatccag tcgtacgagg agcgcgtggc	7920
gtgggccta aaaatgtctt tcagtagcaa gctgattgcc aggggcaggc cttgggtgt	7980
agtgtttaca aagcggtaa gctggatgg gtgcatacgt ggggatatga gatgcattt	8040
ggactgtatt tttaggttgg ctatgttccc agccatatcc ctccggggat tcatgttgc	8100
cagaaccacc agcacagtgt atccggtgca cttggaaat ttgtcatgtat gcttagaagg	8160
aaatgcgtgg aagaacttgg agacccctt gtgcacccca agatttcca tgcattcgtc	8220
cataatgtatg gcaatgggcc cacggcggc ggcctggcg aagatatttc tggatcact	8280
aacgtcatag ttgtgttcca ggtgatggatc gtcataggcc attttacaa agcgcggcg	8340
gagggtgcca gactgcggta taatggttcc atccggccca gggcgtagt taccctcaca	8400
gatttgcat tccacgctt tgagttcaga tggggggatc atgtctacct gcgccggcgat	8460
gaagaaaaacg gtttccgggg taggggat cagctggaa gaaagcagggt tcctgagcag	8520
ctgcgactta ccgcagccgg tgggcccgtaaatcacacactt accccgggt gcaactggta	8580

gttaagagag ctgcagctgc cgtcatccct gagcaggggg gccacttcgt taagcatgtc	8640
cctgactcgc atgtttccc tgaccaaatac cgccagaagg cgctcgccgc ccagcgatag	8700
cagttcttgc aaggaagcaa agttttcaa cggttgaga ccgtccgccc taggcatgct	8760
ttttagcggtt tgaccaagca gttccaggcg gtcccacagc tcggtcaccc gctctacggc	8820
atctcgatcc agcatatctc ctcgttcgc gggttggggc ggcttcgct gtacggcagt	8880
agtcggtgct cgtccagacg ggccagggtc atgtcttcc acgggcgcag ggtcctcgtc	8940
agcgtagttt gggtcacggt gaaggggtgc gctccggct gcgcgctggc cagggtgcgc	9000
ttgaggctgg tcctgctggt gctgaagcgc tgccggctt cgccctgcgc gtcggccagg	9060
tagcatttga ccatggtgtc atagtccagc ccctccgcgg cgtggccctt ggccgcgcagc	9120
ttgcccctgg aggaggcgcc gcacgagggg cagtgcagac tttttagggc gtagagcttgc	9180
ggccgcgagaa ataccgattc cggggagtag gcatccgcgc cgcaggcccc gcagacggc	9240
tcgcatttcca cgagccaggt gagctctggc cggttcgggtt caaaaaccag gtttccccca	9300
tgcttttga tgcgtttctt acctctggtt tccatgagcc ggtgtccacg ctcggtgacg	9360
aaaaggctgt ccgtgtcccc gtatacagac tttagaggcc tgtcctcgac cgatgcctt	9420
gagagcccttc aaccctgtca gtccttcggc gtgggcgcgg ggcatgacta tcgtcgccgc	9480
acttatgact gtcttcttta tcatgcaact cgtaggacag gtgcggcag cgctctgggt	9540
cattttcggc gaggaccgct ttcgctggag cgacgtatcg atcggccctgt cgcttgcgtt	9600
attcggaaatc ttgcacgccc tcgctcaagc cttcgtaact ggtcccgcca ccaaacttt	9660
cggcgagaag caggccattt tcgcccggcat ggcggccgac ggcgtggct acgtcttgct	9720
ggcgttcgcg acgcgaggct ggtggccctt ccccattatg attcttctcg cttccggcgg	9780
catcggatg cccgcgttgc aggccatgct gtccaggcag gtagatgacg accatcagg	9840
acagcttcaa ggccagcaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgaaaa	9900
ccataggctc cgcggccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg	9960
aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gtttccccctt ggaagctccc tcgtcgctc	10020
tcctgttccg accctgcccgc ttaccggata cctgtccgccc tttctccctt cgggaagcgt	10080
ggcgctttct catagctcac gctgttaggtt ttcgttcgtt gtgttaggtcg ttgcgtccaa	10140
gctggctgt gtgcacgaac ccccccgttca gcccgcacgc tgcccttat ccggtaacta	10200
tcgtcttgag tccaacccgg taagacacga ctatcgcca ctggcagcag ccactggtaa	10260
caggattagc agagcgaggt atgttaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa	10320
ctacggctac actagaagga cagtattttg tatctcgct ctgctgaagc cagttacctt	10380
cgaaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta gcgggtggttt	10440
ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat	10500
cttttctacg gggcttgacg ctcagtgaa cgaaaaactca cgttaaggaa ttttggtcat	10560
gagattatca aaaaggatct tcacccatgat ccttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc	10620

aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagtgaggc 10680
 acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta 10740
 gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga 10800
 cccacgctca ccggctccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg 10860
 cagaagtggt cctgcaactt tatccgcctc catccagtct attaattgtt gccgggaagc 10920
 tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt gcgcaacgtt gttgccattg ctgcaggcat 10980
 cgtggtgtca cgctcgctgt ttggtatggc ttcattcagc tccgggtccc aacgatcaag 11040
 gcgagttaca tgcgtccca tgggtgtcaa aaaagcggtt agtccttcg gtcctccgat 11100
 cgttgcaga agtaagttgg ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa 11160
 ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg ctttctgtg actggtgagt actcaaccaa 11220
 gtcattctga gaatagtgtt tgcggcgacc gagttgctct tgccggcgt caacacggg 11280
 taataccgcg ccacatagca gaactttaaa agtgcctatc attggaaaac gttttcggg 11340
 gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtrc 11400
 acccaactga tcttcagcat ctttacttt caccagcggt tctgggtgag caaaaacagg 11460
 aaggcaaaat gcccggaaaaa agggataaag ggcgacacgg aaatgttcaa tactcatact 11520
 cttcctttt caatattattt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat 11580
 atttgaatgt atttagaaaaa a 11601

<210> 6
 <211> 12270
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic hIL-12

<400> 6
 taaacaaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgacg tctaagaaac 60
 cattattatc atgacattaa cctataaaaaa taggcgtatc acgaggccct ttcgtcttca 120
 attaatcgca ccggtatcta tgtcgggtgc ggagaaagag gtaatgaaat ggcagctagc 180
 atcatcaata atatacctta tttggattt aagccaatat gataatgagg gggtgagggt 240
 tgtgacgtgg cgcggggcgt gggacgggg cgggtgacgt agtagtgtgg cggaaagtgtg 300
 atgttgcag tggcggaa cacatgtaa cgacggatgt ggccaaagtg acgttttgg 360
 tgtgcggcgg tgtacacagg aagtgacaat tttcgcgcgg ttttaggcgg atgtttagt 420
 aaatttgggc gtaaccgagt aagatttggc cattttcgcg ggaaaactga ataagagggaa 480
 gtgaaatctg aataattttg tgttactcat agcgcgtaat atttgcgttag ggagatccgg 540
 taccgatatac ctagacaacg atgctgagct aactataacg gtcctaaggt agcgaccgcg 600
 gagacttaggt gtatttatct aagcgatcgc ttaattaagg ccggccgcgg caataaaaata 660
 tctttatttt cattacatct gtgtgttggt tttttgtgtg aatcgatagt actaacatac 720

gctctccatc aaaacaaaac gaaacaaaac aaactagcaa aataggctgt ccccagtgca	780
agtgcaggtg ccagaacatt tctctatcga taatgcaggt cgaggactg tcctccgagc	840
ggagttactgt cctccgagcg gагtactgtc ctccgagcgg agtactgtcc tccgagcgg	900
gtactgtcct ccgagcggag tactgtcctc cgagcggaga ctcttcgaag gaagaggggc	960
ggggtcgatc gaccccgccc ctcttccttc gaaggaagag gggcggggtc gaagacctag	1020
agggtatata atgggtgcct tagctggtgt gtgagctcat cttccctgtatc acacgcgtc	1080
gaagaaggtg agtaatctta acatgctttt tttttttt tttgctaattc ctttttgtgt	1140
gctgatgtta ggatgacatt tacaacaaat gtttggcct gacaggaaaa accttgctgg	1200
gtaccttcgt tgccggacac ttcttgcctt ctactttggaa aaaaaggaat tgagagccgc	1260
tagcgccacc atgggtcacc agcagttggt catctttgg ttttccctgg ttttctggc	1320
atctcccttc gtggccatat gggaaactgaa gaaagatgtt tatgtcgttag aattggattt	1380
gtatccggat gcccctggag aaatggtggt cctcacctgt gacaccctg aagaagatgg	1440
tatcacctgg accttggacc agagcagtga ggtcttaggc tctggaaaa ccctgaccat	1500
ccaaagtcaaa gagtttggag atgctggcca gtacacctgt cacaaggag gcgaggttct	1560
aagccattcg ctctgctgc ttcacaaaaa ggaagatggaa atttggtcca ctgatattt	1620
aaaggaccag aaagaaccca aaaataagac ctttctaaga tgcgaggcca agaattattc	1680
tggacgttcc acctgctggt ggctgacgac aatcagttact gatttgcacat tcagtgtcaa	1740
aagcagcaga ggctcttctg acccccaagg ggtgacgtgc ggagctgcta cactctctgc	1800
agagagagtc agaggggaca acaaggagta tgagtactca gtggagtgcc aggaggacag	1860
tgcctgcca gctgctgagg agagtctgcc cattgaggc atgggtggatc ccgttcacaa	1920
gctcaagtat gaaaactaca ccagcagctt ctcatcagg gacatcatca aacctgaccc	1980
acccaagaac ttgcagctga agccattaaa gaattctcgg caggtggagg tcagctggga	2040
gtaccctgac acctggagta ctccacattc ctacttctcc ctgacattct gcgttcaggt	2100
ccagggcaag agcaagagag aaaagaaaga tagagtcttc acggacaaga cctcagccac	2160
ggtcatctgc cgcaaaaatg ccagcattag cgtgcgggccc caggaccgct actatagctc	2220
atcttggagc gaatggcat ctgtccctg cagttagggtt gggcgagctc gaattcattt	2280
atccccccggg ctgcaggaat tcgatataa gctcgggatc cgaattccgc ccccccccccc	2340
cccccccccc taacgttact ggccgaagcc gcttggaaata aggccgggtgc gctttgtct	2400
atatgttatt ttccaccata ttgccgtt ttggcaatgt gagggccccc aaacctggcc	2460
ctgtcttctt gacgagcatt cctaggggtc tttccctct cggccaaagga atgcaagg	2520
tgttgaatgt cgtgaaggaa gcagttcctc tggaaagcttc ttgaagacaa acaacgtctg	2580
tagcgaccct ttgcaggcag cggaaacccc cacctggcga caggtgcctc tgcggccaaa	2640
agccacgtgt ataagataca cctgcaaagg cggcacaacc ccagtgcac gttgtgagtt	2700
ggatagttgtt ggaaagagtc aaatggctct cctcaagcgtt attcaacaag gggctgaagg	2760

atgcccagaa ggtaccccat tgtatggat ctgatctggg gcctcggtgc acatgcttta	2820
catgtgttta gtcgaggtta aaaaaacgtc taggcccccc gaaccacggg gacgtggttt	2880
tcctttgaaa aacacgtga taatatggcc acaaccatgg gtccagcgcg cagcctccctc	2940
cttgggcta ccctggcctt cctggaccac ctcagttgg ccagaaacct ccccggtggcc	3000
actccagacc caggaatgtt cccatgcctt caccactccc aaaacctgct gagggccgtc	3060
agcaacatgc tccagaaggc cagacaaact ctagaatttt acccttgcac ttctgaagag	3120
attgatcatg aagatatcac aaaagataaa accagcacag tggaggcctg tttaccattt	3180
gaatttaacca agaatgagag ttgcctaaat tccagagaga cctcttcat aactaatggg	3240
agttgcctgg cctccagaaa gaccttttt atgatggccc tgtgccttag tagtatttt	3300
gaagacttga agatgtacca ggtggagttc aagaccatga atgcaaagct tctgtatggat	3360
cctaagaggc agatctttct agatcaaaac atgctggcag ttattgtatgc gctgtatgcag	3420
gccctgaatt tcaacagtga gactgtccca caaaaatcct cccttgaaga accggatttt	3480
tataaaacta aaatcaagct ctgcatactt cttcatgctt tcagaattcg ggcagtgact	3540
attgatagag ttagttagacta tctgaatgct tcctaaatcg attgcgcaaa gctttcgca	3600
taggcgagac caatgggtgt gtacgtacg gccgctcgag aacttggta ttgcagctta	3660
taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca aataaagcat tttttcact	3720
gcattctagt tgggtttgt ccaaactcat caatgtatct tatcatgtct cgtacggcgt	3780
ggtaggtccg aacgaatcca tggattaccc tggatccct atccggagtt aacctcgagg	3840
acttcggAAC ttctagaacc agaccgttca gtttaaacgc tcttcctccc ctcgaggGCC	3900
tccgcGCCGG gtttggcgc ctccgcggg cgccccctc ctcacggcga ggcgtgccac	3960
gtcagacgaa gggcgagcg agcgtcctga tccttcgcgg cggacgctca ggacagcggc	4020
ccgctgctca taagactcgg ctttagaacc ccagtatcg cagaaggaca ttttaggacg	4080
ggacttgggt gactctaggg cactgggtt cttccagag agcggAAC ggcggggaaa	4140
gtagtccctt ctcggcgatt ctgcggaggg atctccgtgg ggcggtaac gcccgtgatt	4200
atataaggac gcgcgggtg tggcacagct agttccgtcg cagccggat ttgggtcg	4260
gttcttgggtt gtggatcgct gtatcgta ctgggtgagt agcggctgc tgggtgggt	4320
acgtgcgtc ggggtggcg agtgtttt gtgaagttt ttaggcacct tttgaaatgt	4380
aatcattgg gtcaatatgt aatttcagt gtttagactag taaattgtcc gctaaattct	4440
ggccgtttt ggctttttt ttagacggca tgcccccccc gggggggca attggccacc	4500
atggggccca agaagaaaag gaaggtggcc cccccccaccg acgtgagcct gggcgacgag	4560
ctgcacccctgg acggcgagga cgtggccatg gcccacgccc acgcccgtga cgacttcgac	4620
ctggacatgc tggcgacgg cgacagcccc ggccccggct tcacccccc cgcacagcggcc	4680
ccctacggcg ccctggacat ggccgacttc gagttcgagc agatgttcac cgacgcccgt	4740
ggcatcgacg agtacggcg ccataatggag atgcccgtgg acaggattct ggaggccgaa	4800

ctcgccgtgg	agcagaaaaag	cgaccaggc	gtggagggcc	ccggcggaaac	cggcggcagc	4860
ggcagcagcc	ccaacgaccc	cgtgaccaac	atctgccagg	ccgcccacaa	gcagctgttc	4920
accctggtgg	agtgggccaa	gaggattccc	caactcagca	gcctgcccct	ggacgaccag	4980
gtatcctgc	tgagggccgg	atggaacgag	ctgctgatcg	ccagcttcag	ccacaggagc	5040
atcgacgtga	gggacggcat	cctgctggcc	accggcctgc	acgtccatag	gaacagcgcc	5100
cacagcggcg	gagtgggcgc	catcttcgac	agggtgctga	ccgagctgg	gagcaagatg	5160
agggacatga	gatatggacaa	gaccgagctg	ggctgcctga	gggccatcat	cctgttcaac	5220
cccgaggtga	ggggcctgaa	aagcgcccag	gaggtggagc	tgctgaggga	gaaggtgtac	5280
gccgcccctgg	aggagtacac	caggaccacc	caccccgacg	agcccgccag	attcgccaag	5340
ctgctgctga	ggctgcccag	cctgaggagc	atcggcctga	agtgcctgga	gcacctgttc	5400
ttcttcaggc	tgatcggcga	cgtccccatc	gacaccttcc	tgatggagat	gctggagagc	5460
cccagcgaca	gctgagccgg	caactcgctg	tagtaattcc	agcgagaggc	agagggagcg	5520
agcgggcggc	gggcttagggt	ggaggagccc	ggcgagcaga	gctgcgctgc	gggcgtcctg	5580
ggaagggaga	tccggagcga	atagggggct	tcgcctctgg	cccagccctc	ccgctgatcc	5640
cccagccagc	ggtgcgcaac	cctagccgca	tccacgaaac	tttgccata	gcagcgggcn	5700
ggcactttgc	actggaactt	acaacacccg	agcaaggacg	cgactctccc	gacgcgggga	5760
ggctattctg	cccatttggg	gacacttccc	cgccgctgcc	aggacccgct	tctctgaaag	5820
gctctccttg	cagctgctta	gacgctggat	tttttcggg	tagtggaaaa	ccagcagcct	5880
cccgcgacca	gatctgccac	catgaagctg	ctgagcagca	tcgagcaggc	ttgcgacatc	5940
tgcaggctga	agaagctgaa	gtgcagcaag	gagaagccca	agtgcgccaa	gtgcctgaag	6000
aacaactggg	agtgcagata	cagcccaag	accaagagga	gccccctgac	cagggcccac	6060
ctgaccgagg	tggagagcag	gctggagagg	ctggagcagc	tgttcctgct	gatcttcccc	6120
agggaggacc	tggacatgat	cctgaagatg	gacagcctgc	aagacatcaa	ggccctgctg	6180
accggcctgt	tcgtgcagga	caacgtgaac	aaggacgccc	tgaccgacag	gctggccagc	6240
gtggagaccg	acatgcccct	gaccctgagg	cagcacagga	tcagcgccac	cagcagcagc	6300
gaggagagca	gcaacaaggg	ccagaggcag	ctgaccgtga	gccccgagtt	tcccgggatc	6360
aggcccgagt	gcgtggtgcc	cgagaccag	tgcgccatga	aaaggaagga	gaagaaggcc	6420
cagaaggaga	aggacaagct	gcccgtgagc	accaccaccg	tcgatgacca	catccccccc	6480
atcatgcagt	gcgagccccc	cccccccgag	gccgccagga	ttcacgaggt	cgtgcccagg	6540
ttcctgagcg	acaagctgct	ggtgaccaac	aggcagaaga	acatccccca	gctgaccgcc	6600
aaccagcagt	tcctgatcgc	caggctgatc	tggtatcagg	acggctacga	gcagcccagc	6660
gacgaggacc	tgaaaaggat	cacccagacc	tggcagcagg	ccgacgacga	gaacgaggag	6720
agcgacaccc	cttcaggca	gatcaccgag	atgaccatcc	tgaccgtgca	gctgatcgt	6780
gatTCGCCA	aggcctgccc	cgattcgcc	aagatcagcc	agcccgacca	gatcaccctg	6840

ctgaaggcgtt gcagcagcga ggtgatgatg ctgagggtgg ccaggaggta cgacgcccgc 6900
agcgacagca tcctgttcgc caacaaccag gcttacacca gggacaacta caggaaggct 6960
ggcatggccg aggtgatcga ggacctcctg cacttctgca gatgtatgta cagcatggcc 7020
ctggacaaca tccactacgc cctgctgacc gccgtggta tcttcagcga caggccggc 7080
ctggagcagc cccagctggt ggaggagatc cagaggtact acctgaacac cctgaggatc 7140
tacatcctga accagctgag cggcagcgcc aggagcagcg ttagtctacgg caagatcctg 7200
agcatcctga gcgagctgag gaccctggta atgcagaaca gcaatatgtg tatcagcctg 7260
aagctgaaga acaggaagct gcccccttc ctggaggaga tttggacgt ggccgacatg 7320
agccacaccc agccccccccc catcctggag agccccacca acctgtaat cgattagaca 7380
tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag aatgcagtga aaaaaatgct 7440
taatttgtga aatttgtat gctattgctt aatttgtaaac cattataagc tgcaataaac 7500
aagttaataa aacatttgca ttcattttat gtttcaggtt cagggggaga tgtggaggt 7560
tttttaaagc aagtaaaacc tctacaaatg tggtatctag agctcttcca aatagatctg 7620
gaaggtgctg aggtacgatg agacccgcac caggtgcaga ccctgcgagt gtggcggtaa 7680
acatattagg aaccagcctg ttagtgcgaa tggaccgag gagctgaggc ccgatcactt 7740
ggtgctggcc tgcaccccgcg ctgagttgg ctctagcgtt gaagatacag attgaggtac 7800
tgaaatgtgt gggcgtggct taaggggtgg aaagaatata taaggtgggg gtcttatgt 7860
gttttgcattc tggggcgtt cagccgcgc cgccatgagc accaactcgt ttgatggaa 7920
cattgtgagc tcataatttga caacgcgcattt gccccatgg gcccgggtgc gtcagaatgt 7980
gatgggctcc agcattgatg gtcgccccgt cctgcccgc aactctacta ccttgcacca 8040
cgagaccgtg tctggAACgc cgttggagac tgcagcctcc gccggcgctt cagccgctgc 8100
agccaccgc cgcgggattt tgactgactt tgctttcctg agcccgcttgc caagcagtgc 8160
agcttccgt tcataccgc cgcgtacaa gttgacggct ctttggcac accaacttcgtt 8220
tttgaccggg gaacttaatg tcgtttctca gcagctgtt gatctgcgc acccaggattc 8280
tgccctgaag gcttcctccc ctcccaatgc gtttaaaac ataaataaaa aaccagactc 8340
tgtttggatt tggatcaagc aagtgtcttgc ctgtctttat tttaggggtt tgccgcgcgc 8400
gtaggcccg gaccagcggt ctcggcgtt gagggtcctg tgtatTTTT ccaggacgtg 8460
gtaaagggtga ctctggatgt tcagatacat gggcataagc ccgtctctgg ggtggaggt 8520
gcaccactgc agagcttcat gctgcgggtt ggtgtttagt atgatccagt cgtacgcagg 8580
gcccgtggcg tgggcctaa aatgtctt cagtagcaag ctgattgcca gggcaggcc 8640
cttgggtgtaa gtgtttacaa agcggtaag ctgggatggg tgcatacgtg gggatatgag 8700
atgcatacttgc gactgttattt ttaggttggc tatgttccca gccatatccc tccggggatt 8760
catgttgc agaaccacca gcacagtgtt tccggcgcac ttggaaatt tgcatacgtt 8820
cttaqaagga aatgcgttgc agaacttggc gacgccttc tgaccccttgc gatTTTccat 8880

gcattcgtcc	ataatgatgg	aatgggccc	acgggcggcg	gcctggcga	agatatttct	8940
gggatcacta	acgtcatagt	tgtgttccag	gatgagatcg	tcataggcca	tttttacaaa	9000
gcgcgggccc	agggtgccag	actgcgttat	aatggttcca	tccggcccag	gggcgtagtt	9060
accctcacag	atttgcattt	cccacgctt	gagttcagat	ggggggatca	tgtctacctg	9120
cggggcgatg	aagaaaacgg	tttccgggt	aggggagatc	agctggaaag	aaagcaggtt	9180
cctgagcagc	tgcgacttac	cgcagccgtt	gggcccgtaa	atcacaccta	ttaccgggtg	9240
caactggtag	ttaagagagc	tgcagctgcc	gtcatccctg	agcagggggg	ccacttcgtt	9300
aagcatgtcc	ctgactcgca	tgtttccct	gaccaaatacc	gccagaaggc	gctcgccgcc	9360
cagcgatagc	agttcttgca	aggaagcaaa	gttttcaac	ggttttagac	cgtccgcccgt	9420
aggcatgctt	ttgagcgttt	gaccaagcag	ttccaggcgg	tcccacagct	cggtcacctg	9480
ctctacggca	tctcgatcca	gcataatctcc	tcgtttcgcg	ggttggggcg	gctttcgctg	9540
tacggcagta	gtcggtgctc	gtccagacgg	gccagggtca	tgtcttcca	cgggcgcagg	9600
gtccctcgta	gcgttagtctg	ggtcacggtg	aaggggtgcg	ctccgggctg	cgcgctggcc	9660
agggtgcgt	tgaggctggt	cctgctggtg	ctgaagcgct	gccggcttcc	gccctgcgcg	9720
tcggccaggt	agcatttgac	catggtgtca	tagtccagcc	cctccgcggc	gtggcccttg	9780
gcgcgcagct	tgcccttgga	ggaggcgccg	cacgaggggc	agtgcagact	tttgagggcg	9840
tagagcttgg	gcgcgagaaa	taccgattcc	ggggagtagg	atccgcgcc	gcaggccccg	9900
cagacggct	cgcattccac	gagccaggtg	agctctggcc	gttcggggtc	aaaaaccagg	9960
tttccccat	gcttttgcgt	gcgtttctta	cctctggttt	ccatgagccg	gtgtccacgc	10020
tcggtgacga	aaaggctgtc	cgtgtcccg	tatacagact	tgagaggcct	gtcctcgacc	10080
gatgcccttgc	agagccttca	acccagtcag	ctccttccgg	tgggcgcggg	gcatgactat	10140
cgtcgccgca	cttatgactg	tcttctttat	catgcaactc	gtaggacagg	tgccggcagc	10200
gctctgggtc	attttcggcg	aggaccgctt	tcgctggagc	gacgatga	tcggcctgtc	10260
gcttgcggta	ttcggaatct	tgcacgcctt	cgctcaagcc	ttcgtcactg	gtcccgcac	10320
caaacgtttc	ggcgagaagc	aggccattat	cgcggcatg	gcggccgacg	cgtgggcta	10380
cgtcttgctg	gcgttcgcga	cgcgaggctg	gatggccttc	cccattatga	ttcttctcgc	10440
ttccggccgc	atcgggatgc	ccgcgttgca	ggccatgctg	tccaggcagg	tagatgacga	10500
ccatcaggga	cagcttcaag	gccagaaaa	ggccaggaac	cgtaaaaagg	ccgcgttgct	10560
ggcgtttttc	cataggctcc	gcctccctga	cgagcatcac	aaaaatcgac	gctcaagtca	10620
gagggtggcga	aacccgacag	gactataaag	ataccaggcg	tttccccctg	gaagctccct	10680
cgtgcgtct	cctgttccga	ccctgcccgt	tacggatac	ctgtccgcct	ttctcccttc	10740
gggaagcgtg	gacgtttctc	atagctcagc	ctgttaggtat	ctcagttcgg	tgttaggtcgt	10800
tcgctccaag	ctgggctgtg	tgcacgaacc	ccccgttcag	cccgaccgct	gccccttac	10860
cggtaactat	cgtcttgagt	ccaacccggt	aagacacgac	ttatcgccac	tggcagcagc	10920

cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagt 10980
 gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc 11040
 agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag 11100
 cggtggtttt tttgttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaggat ctcagaaga 11160
 tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggAAC gaaaactcac gttaaggat 11220
 tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc ctttAAATT aaaaatgaag 11280
 ttttAAATCA atctaaagta tatatgagta aacttggct gacagttacc aatgcttaat 11340
 cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct attcggtca tccatagttg cctgactccc 11400
 cgtcgtgttag ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat 11460
 accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag 11520
 ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgtt 11580
 ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagttt cgcaacgttgc ttgccattgc 11640
 tgcaggcattc gtgggtgtcac gctcgtcgTT tggatggct tcattcagct ccggTTccca 11700
 acgatcaagg cgagttacat gatccccat gttgtcaaa aaagcggtt a gtccttccgg 11760
 tcctccgatc gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtt a tcactcatgg ttatggcagc 11820
 actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta 11880
 ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gcccgcaccg agttgcttcc gcccggcgtc 11940
 aacacggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaaa gtgctcatca ttggaaaaacg 12000
 ttcttcgggg cgaaaaactct caaggatctt accgctgtt agatccagtt cgatgttaacc 12060
 cactcgtgca cccaaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgTT ctgggtgagc 12120
 aaaaacagga aggcaaaaatg cgcaaaaaaaaa ggaataagg ggcacacgga aatgttgaat 12180
 actcataactc ttccTTTTc aatattattt aagcatttt cagggttatt gtctcatgag 12240
 cggatacata tttgaatgtt aatggaaaaa 12270

<210> 7
 <211> 10404
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic MIL-21

<400> 7
 taaacaata ggggttccgc gcacatttcc cggaaaaagtgc ccacctgacg tctaagaaac 60
 cattattatc atgacattaa cctataaaaaa taggcgtatc acgaggccct ttcgtcttca 120
 attaatcgca cgggtatcta tgtcgggtgc ggagaaagag gtaatgaaat ggcagctagc 180
 atcatcaata atatacctta tttggattt aagccatat gataatgagg gggtgagg 240
 tgtgacgtgg cgcggggcgt gggAACgggg cgggtgacgt agtagtgtgg cggaaagtgtg 300
 atgttgcag tggcggaa cacatgttaag cgacggatgt ggcaaaagtgc acgttttgg 360

tgtgcgcgg	tgtacacagg	aagtgacaat	tttcgcgcgg	ttttaggcgg	atgtttagt	420
aaatttggc	gtaaccgagt	aagatttggc	cattttcgcg	ggaaaactga	ataagagggaa	480
gtgaaatctg	aataatttt	tgttactcat	agcgcgtaat	atttgtctag	ggagatccgg	540
taccgatatc	ctagacaacg	atgctgagct	aactataacg	gtcctaaggt	agcgaccgcg	600
gagactaggt	gtatTTatct	aagcgatcgc	ttaattaagg	ccggccgccc	caataaaaata	660
tctttatTT	cattacatct	gtgtgttgg	tttttgtgt	aatcgatagt	actaacatAC	720
gctctccatc	aaaacaaaac	gaaacaaaac	aaactagcaa	aataggctgt	ccccagtgca	780
agtgcaggtg	ccagaacatt	tctctatcga	taatgcaggt	cgaggactg	tcctccgagc	840
ggagtaCTgt	cctccgagcg	gagtactgtc	ctccgagcgg	agtactgtcc	tccgagcgga	900
gtactgtcct	ccgagcggag	tactgtcctc	cgagcggaga	ctcttcgaag	gaagagggc	960
ggggTCgatc	gacCCGccc	ctcttccttc	gaaggaagag	gggcggggTC	gaagacctag	1020
agggtatata	atgggtgcct	tagctggTgt	gtgagctcat	cttcctgttag	atcacgcgtc	1080
gaagaaggTg	agtaatcttA	acatgctctt	ttttttttt	tttgctaATC	cTTTGTgt	1140
gctgatgttA	ggatgacatt	tacaacaat	gttTgttcct	gacaggaaaa	accttgctgg	1200
gtacCTCgt	tgcggacac	ttcttgcct	ctactttgg	aaaaaggaat	tgagagccgc	1260
tagCCcacca	tggagaggac	cctggTgtgc	ctggTggTga	tcttcctgg	caccgtggcc	1320
cacaagagca	gcccccaggg	acccgacagg	ctgctgatcc	ggctgagaca	cctgatcgac	1380
atcgtggagc	agctgaagat	ttacgagaac	gacctggacc	ccgagctgct	gtccgcccc	1440
caggacgtga	agggccactg	cgagcacGCC	gccttcgcct	gcttcagaa	ggccaagctg	1500
aagcccagca	accccggcaa	caacaagacc	ttcatcatcg	acctggTggc	ccagctgaga	1560
aggaggCTgc	ccgcccaggag	gggcggcaag	aagcagaAGC	acatcgccaa	gtgccccagc	1620
tgcgacagct	acgagaAGC	gacCCCAAG	gagttcctgg	agaggctgaa	gtggctgctg	1680
caaaagatga	tccaccagca	cctgagctga	atcgattgcg	caaagcttC	gcataggcg	1740
agaccaatgg	gtgtgtacgt	agcggccgct	cgagaacttg	tttattgcag	cttataatgg	1800
ttacaAataa	agcaatAGC	tcacAAattt	cacaataaa	gcattttttt	cactgcattc	1860
tagttgtgg	ttgtccaaac	tcatcaatgt	atcttatcat	gtctcgtaC	gcgtggtagg	1920
tccgaacgaa	tccatggatt	accctgttat	ccctatccgg	agttaacctc	gaggacttcg	1980
gaacttctag	aaccagaccg	ttcagTTaa	acgctttct	ccccctcgag	ggcctccgcg	2040
ccgggttttg	gcgcctcccg	cgggcgcccc	cctcctcacg	gcgagcgctg	ccacgtcaga	2100
cgaagggcgc	agcgagcgTC	ctgatccTTC	cgcccggacg	ctcaggacag	cgccccgctg	2160
ctcataagac	tcggccttag	aacCCAGTA	tcagcagaag	gacattttag	gacgggactt	2220
gggtgactct	agggcactgg	ttttcttcc	agagagcgga	acaggcgagg	aaaagttagtc	2280
ccttctcggc	gattctgcgg	agggatctcc	gtggggcggt	gaacGCCat	gattatataa	2340
ggacgcgcgg	ggtgtggcac	agctagttcc	gtcgCAGCCG	ggatttgggt	cgcggTTctt	2400

gtttgtggat cgctgtgatc gtcacttgtt gagtagcggg ctgctggct gggtacgtgc	2460
gctcggggtt ggcgagtgtg ttttgtaag ttttttaggc acctttgaa atgtaatcat	2520
ttgggtcaat atgtaatttt cagtgttaga ctagtaaatt gtccgctaaa ttctggccgt	2580
ttttggcttt tttgttagac ggcacgtggg gggggggggg ggcaattggc caccatggc	2640
cccaagaaga aaaggaaggt ggccccccc accgacgtga gcctggcga cgagctgcac	2700
ctggacggcg aggacgtggc catggccac gccgacgccc tggacgactt cgacctggac	2760
atgctggcgc acggcgacag ccccgcccc ggcttcaccc cccacgacag cgccccctac	2820
ggcgccctgg acatggccga cttcgagttc gaggcagatgt tcaccgacgc cctggcattc	2880
gacgagtagc gcggccatat ggagatgccc gtggacagga ttctggaggc cgaactcgcc	2940
gtggagcaga aaagcgacca gggcgtggag ggccccggcg gaaccggcgg cagcggcagc	3000
agccccaaacg accccgtgac caacatctgc caggccgccc acaaggcagct gttcaccctg	3060
gtggagtgcc ccaagaggat tccccacttc agcagcctgc ccctggacga ccaggtgatc	3120
ctgctgaggc ccggatggaa cgagctgctg atcgccagct tcagccacag gaggcatcgac	3180
gtgagggacg gcatcctgct ggccaccggc ctgcacgtcc ataggaacag cgccccacagc	3240
gccggagtgg gcgccatctt cgacagggtg ctgaccgagc tggtagcaa gatgagggac	3300
atgaggatgg acaagaccga gctggctgc ctgagggcca tcatcctgtt caaccccgag	3360
gtgaggggcc tgaaaagcgc ccaggaggtg gagctgctga gggagaaggt gtacgcccgc	3420
ctggaggagt acaccaggac caccacccc gacgagcccgc gcatattcgc caagctgctg	3480
ctgaggctgc ccagcctgag gagcatcgcc ctgaagtgcc tggagcacct gttcttcttc	3540
aggctgatcg gcgacgtgcc catcgacacc ttccctgatgg agatgctgga gagccccagc	3600
gacagctgag ccggcaactc gctgtagtaa ttccagcgag aggtagggg agcgagcggg	3660
cggcgggcta gggtagga gcccggcgag cagagctgctg ctgcggcggt cctggaaagg	3720
gagatccgga gcgaataggg ggcttcgcct ctggcccagc cctcccgctg atccccagc	3780
cagcgggtgcg caaccctagc cgcatccacg aaactttgcc catagcagcg ggcgggcaact	3840
ttgcactgga acttacaaca cccgagcaag gacgcaactc tcccacgctg gggaggctat	3900
tctgcccatt tggggacact tccccggcgc tgccaggacc cgcttctctg aaaggctctc	3960
cttgcagctg cttagacgct ggatTTTTT cgggtagtgg aaaaccagca gcctcccgcg	4020
accagatctg ccaccatgaa gctgctgagc agcatcgagc aggctgctg catctgcagg	4080
ctgaagaagc tgaagtgcag caaggagaag ccaagtgcgc ccaagtgcct gaagaacaac	4140
tgggagtgca gatacagccc caagaccaag aggagcccc tgaccaggc ccacctgacc	4200
gaggtggaga gcaggctgga gaggctggag cagctgttcc tgctgatctt ccccagggag	4260
gacctggaca tgatcctgaa gatggacagc ctgcaagaca tcaaggccct gctgaccggc	4320
ctgttcgtgc aggacaacgt gaacaaggac gccgtgaccg acaggctggc cagcgtggag	4380
accgacatgc ccctgaccct gaggcagcac aggtcagcg ccaccagcag cagcggaggag	4440

agcagcaaca	agggccagag	gcagctgacc	gtgagccccc	agtttcccg	gatcaggccc	4500
gagtgcgtgg	tgcccagac	ccagtgcgcc	atgaaaagga	aggagaagaa	ggcccagaag	4560
gagaaggaca	agctgcccgt	gagcaccacc	accgtcgatg	accacatgcc	ccccatcatg	4620
cagtgcgagc	cccccccccc	cgaggccgccc	aggattcacg	aggtcgtgcc	caggttcctg	4680
agcgacaagc	tgctggtgac	caacaggcag	aagaacatcc	cccagctgac	cgc当地accag	4740
cagttcctga	tcgccaggct	gatctggtat	caggacggct	acgagcagcc	cagc当地gag	4800
gacctgaaaa	ggatcaccac	gacctggcag	caggccgacg	acgagaacga	ggagagcgcac	4860
accccccac	ggcagatcac	cgagatgacc	atcctgaccg	tgcagctgat	cgtggagttc	4920
gccaagggcc	tgcccggatt	cgccaagatc	agccagcccg	accagatcac	cctgctgaag	4980
gcttgcagca	gc当地gggtat	gatgctgagg	gtggccagga	ggtacgacgc	cgc当地gcac	5040
agcatcctgt	tcgccaacaa	ccaggcttac	accaggacca	actacaggaa	ggctggcatg	5100
gccgaggtga	tcgaggacct	cctgcacttc	tgcagatgta	tgtacagcat	ggccctggac	5160
aacatccact	acgc当地ctgt	gaccgc当地	gtgatcttca	gc当地aggcc	cggc当地ggag	5220
cagccccagc	tggggagga	gatccagagg	tactacctga	acaccctgag	gatctacatc	5280
ctgaaccagc	tgagcggcag	cgc当地ggagc	agcgtgatct	acggcaagat	cctgagcatc	5340
ctgagcagc	tgaggaccc	ggaaatgcag	aacagcaata	tgtgtatcag	cctgaagctg	5400
aagaacagga	agctgcccc	cttccctggag	gagatttggg	acgtggccga	catgagccac	5460
acccagcccc	ccccccatcct	ggagagcccc	accaacctgt	gaatcgatta	gacatgataa	5520
gatacattga	ttagtttgg	caaaccacaa	ctagaatgca	gtgaaaaaaaa	tgcttaattt	5580
gtgaaatttgc	ttagtgcatt	gtttaatttgc	taaccattat	aagctgcaat	aaacaagttt	5640
ataaaaacatt	tgcatttcatt	ttatgtttca	ggttcagggg	gagatgtggg	aggtttttta	5700
aagcaagtaa	aacctctaca	aatgtggat	ctagagctct	tccaaataga	tctgaaaggt	5760
gctgaggtac	gatgagaccc	gc当地agggt	cagaccctgc	gagtgtggcg	gtaaacatata	5820
taggaaccag	cctgtgatgc	tggatgtgac	cgaggagctg	aggcccgatc	acttgggtct	5880
ggcctgcacc	cgc当地gtgat	ttggctctag	cgatgaagat	acagattgag	gtactgaaat	5940
gtgtggcg	ggcttaagg	tggaaagaa	tatataaggt	gggggtctt	tgtgttttgc	6000
tatctgtttt	gcagcagccg	ccgccc当地	gagcaccac	tcgtttgatg	gaagcattgt	6060
gagctcatat	ttgacaacgc	gcatgcccc	atggggccgg	gtgc当地caga	atgtgtatgg	6120
ctccagcatt	gatggtcgccc	ccgtccctgccc	cgcaaactct	actacccctga	cctacgagac	6180
cgtgtctgga	acgccgttgg	agactgcagc	ctccgccc	gcttcagccg	ctgc当地ccac	6240
cgc当地ccgg	attgtgactg	actttgcctt	cctgagcccg	cttgc当地agca	gtgc当地cttc	6300
ccgttcatcc	gccc当地cgat	acaagttgac	ggcttccccc	gcacaattgg	attctttgac	6360
ccggaaactt	aatgtcg	ctc当地cagct	gttggatctg	cgccagcagg	tttctgc当地	6420
gaaggcttcc	tccccc当地ccca	atgc当地gttta	aaacataaaat	aaaaaaccag	actctgtttg	6480

gatttggatc aagcaagtgt cttgctgtct ttat taggg gtttgcgcg cgccgtaggc	6540
ccgggaccag cggctcggc cggtgagggt cctgtgtatt tttccagga cgtggtaaag	6600
gtgactctgg atgttcagat acatggcat aagcccgctc ctgggggatc ggttagcacca	6660
ctgcagagct tcatacgctcg ggggtgggtt gtatgtatc cagtcgtac aggagcgctg	6720
ggcgtggtgc ctaaaaatgt ctttcagtag caagctgatt gccaggggca ggcccttgg	6780
gtaagtgttt acaaagcggt taagctggga tgggtgcata cgtggggata tgagatgcat	6840
cttggactgt attttaggt tggctatgtt cccagccata tccctccggg gattcatgtt	6900
gtgcagaacc accagcacag tgtatccggt gcacttggga aatttgcatt gtatgtt	6960
aggaaatgcg tggagaact tggagacgcc cttgtgaccc ccaagatttt ccatgcattc	7020
gtccataatg atggcaatgg gcccacgggc ggcggcctgg gcgaagatat ttctggatc	7080
actaacgtca tagttgtgtt ccaggatgag atcgtcatag gccatttta caaagcgcgg	7140
gcggagggtg ccagactgcg gtataatgg tccatccggc ccagggcgt agttaccctc	7200
acagatttgc atttcccacg ctttgagttc agatgggggg atcatgtcta cctgcggg	7260
gatgaagaaa acggtttccg gggtagggga gatcagctgg gaagaaagca gtttcctgag	7320
cagctgcac ttaccgcagc cgggtggccccc gtaaatcaca cctattaccg ggtcaactg	7380
gtatgttgcgagc tgccgtcatc cctgagcagg gggccactt cgttaagcat	7440
gtccctgact cgcatgtttt ccctgaccaaa atccgcaga aggcgcgc cgcggcgg	7500
tagcagtct tgcaaggaag caaagttttt caacggttt agaccgtccg ccgtaggcat	7560
gctttgagc gtttgcacca gcaagttccag gcggtcccac agctcggtca cctgctctac	7620
ggcatctcga tccagcatat ctcctcggtt cgcgggttgg ggcggcttgc gctgtacggc	7680
agtagtcggt gctcgccag acggccagg gtcatgtctt tccacggcgt cagggtccctc	7740
gtcagcgtac tctgggtcac ggtgaagggg tgcgtccgg gctgcgcgc ggccagggtg	7800
cgcttggggc tggccctgct ggtgctgaag cgctgcccgt cttcgccctg cgcgtcggcc	7860
aggttagcatt tgaccatggt gtcatagtcc agccctccg cggcgtggcc cttggcgcgc	7920
agcttgcct tggaggaggc gccgcacgag gggcagtgc gactttttag ggcgttagagc	7980
ttggcgcga gaaataccga ttccggggag taggcattccg cggcgcaggc cccgcagacg	8040
gtctcgatt ccacgagcca ggtgagctct ggccgttcgg ggtcaaaaac cagtttccc	8100
ccatgctttt tgatgcgttt cttacctctg gtttccatga gccgggtgtcc acgctcggt	8160
acgaaaaggc tgcgtgttc cccgtataca gacttgagag gcctgtcctc gaccgatgcc	8220
cttgagagcc ttcaacccag tcagctcctt cgggtggcg cggggcatga ctatcgatc	8280
cgcacttatg actgtcttct ttatcatgca actcgtagga caggtgccgg cagcgctctg	8340
ggtcattttc ggcgaggacc gcttcgtcg gagcgcgcacg atgatcgcc tgcgtttgc	8400
ggtattcggatc ttcacccatc ccctcgatc agccttcgtc actggccccc ccaccaaacg	8460
tttcggcgag aagcaggcca ttatcgccgg catggcggcc gacgcgttgc gctacgtctt	8520

gctggcgttc	gcgacgcgag	gctggatggc	cttccccatt	atgattcttc	tcgcttccgg	8580
cggcatcggg	atgcccgcgt	tgcagggccat	gctgtccagg	caggtagatg	acgaccatca	8640
gggacagctt	caaggccagc	aaaaggccag	gaaccgtaaa	aaggccgcgt	tgctggcggt	8700
tttccatagg	ctccgcccccc	ctgacgagca	tcacaaaaat	cgacgctcaa	gtcagaggtg	8760
gcgaaacccg	acaggactat	aaagatacca	ggcggttccc	cctggaagct	ccctcgtgcg	8820
ctctcctgtt	ccgaccctgc	cgcttaccgg	atacctgtcc	gccttctcc	cttcgggaag	8880
cgtggcgctt	tctcatagct	cacgctgttag	gtatctcagt	tcgggttagg	tcgttcgctc	8940
caagctggc	tgtgtgcacg	aaccccccgt	tcagccgcac	cgctgcgcct	tatccggtaa	9000
ctatcgctt	gagtccaacc	cggtaagaca	cgacttatcg	ccactggcag	cagccactgg	9060
taacaggatt	agcagagcga	ggtatgttagg	cggtgctaca	gagttttga	agtggtggcc	9120
taactacggc	tacactagaa	ggacagtatt	tggtatctgc	gctctgctga	agccagttac	9180
cttcggaaaa	agagttggta	gctcttgatc	cggcaaacaa	accaccgtg	gtagcgggtgg	9240
ttttttgtt	tgcaagcagc	agattacgcg	cagaaaaaaaaa	ggatctcaag	aagatccttt	9300
gatctttct	acggggtctg	acgctcagt	gaacgaaaac	tcacgttaag	ggattttgtt	9360
catgagatta	tcaaaaagga	tcttcaccta	gatcctttta	aattaaaaat	gaagttttaa	9420
atcaatctaa	agtatatatg	agtaaacttgc	gtctgacagt	taccaatgct	taatcagtga	9480
ggcacctatc	tcagcgatct	gtctatttcg	ttcatccata	gttgccgtac	tccccgtcgt	9540
gtagataact	acgatacggg	agggcttacc	atctggccccc	agtgctgcaa	tgataccgcg	9600
agacccacgc	tcaccggctc	cagatttac	agcaataaac	cagccagccg	gaagggccga	9660
gcbcagaagt	ggtcctgcaa	ctttatccgc	ctccatccag	tctattaatt	gttgcgggaa	9720
agctagagta	agtagttcgc	cagttaatag	tttgcgcaac	gttggccca	ttgctgcagg	9780
catcgtggtg	tcacgctcgt	cgtttggtat	ggtttcatttc	agctccgggt	cccaacgatc	9840
aaggcgagtt	acatgatccc	ccatgttgtg	caaaaaagcg	gttagctcct	tcggtcctcc	9900
gatcgttgc	agaagtaagt	tggccgcagt	gttatcactc	atggttatgg	cagcactgca	9960
taattctctt	actgtcatgc	catccgtaa	atgctttct	gtgactggtg	agtactcaac	10020
caagtcattc	tgagaatagt	gtatgcggcg	accgagttgc	tcttgcggg	cgtcaacacg	10080
ggataatacc	gcgccacata	gcagaacttt	aaaagtgctc	atcattggaa	aacgttcttc	10140
ggggcgaaaa	ctctcaagga	tcttaccgct	gttggatcc	agttcgatgt	aacccactcg	10200
tgccaccaac	tcatcttcag	catctttac	tttcaccagc	gtttctgggt	gagaaaaaac	10260
aggaaggcaa	aatgccgcaa	aaaagggaaat	aagggcgaca	cggaaatgtt	gaatactcat	10320
actcttcctt	tttcaatatt	attgaagcat	ttatcagggt	tattgtctca	tgagcggata	10380
catattgaa	tgtatTTAGA	aaaa				10404

<210> 8
 <211> 10452
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic hIL-21

<400> 8			
taaacaaata gggttccgc gcacattcc	ccgaaaagtgc	ccacctgacg tctaagaaac	60
cattattatc atgacattaa cctataaaaa	taggcgtatc	acgaggccct ttcgtcttca	120
attaatcgca ccgttatcta	tgtcgggtgc	ggagaaagag gtaatgaaat ggcagctagc	180
atcatcaata atatacctta	ttttggattt	aagccatat gataatgagg gggtgagtt	240
tgtgacgtgg cgcggggcgt	gggaacgggg	cgggtgacgt agtagtgtgg cggaaagtgtg	300
atgttgcag tggcggaa	cacatgtaa	cgacggatgt ggcaaaagtgc acgttttgg	360
tgtgcgcgg tgtacacagg	aagtgacaat	tttcgcgcgg ttttaggcgg atgttgttagt	420
aaatttggc gtaaccgagt	aagatttggc	cattttcgcg ggaaaactga ataagagggaa	480
gtgaaatctg aataattttg	tgttactcat	agcgcgtaat atttgtctag ggagatccgg	540
taccgatatac ctagacaacg	atgctgagct	aactataacg gtcctaaggt agcgaccgcg	600
gagactaggt gtatattatct	aagcgatcgc	ttaattaagg ccggccgccc caataaaaata	660
tctttatccc cattacatct	gtgtgttgg	ttttgtgtg aatcgatagt actaacatac	720
gctctccatc aaaacaaaac	gaaacaaaac	aaactagcaa aataggctgt ccccagtgc	780
agtgcagggtg ccagaacatt	tctctatcga	taatgcaggt cggagtactg tcctccgagc	840
ggagtagctgt cctccgagcg	gagtactgtc	ctccgagcgg agtactgtcc tccgagcgg	900
gtactgtcct ccgagcggag	tactgtcctc	cgagcggaga ctcttcgaag gaagaggggc	960
ggggtcgatc gaccccgccc	ctcttccttc	gaaggaagag gggcggggtc gaagacctag	1020
agggtatata atgggtgcct	tagctgggt	gtgagctcat cttcctgttag atcacgcgtc	1080
gaagaagggtg agtaatctta	acatgctctt	ttttttttt tttgctaatc cttttgtgt	1140
gctgatgtta ggatgacatt	tacaacaaat	gttgttcct gacaggaaaa accttgctgg	1200
gtaccttcgt tgccggacac	ttcttgcct	ctactttgaa aaaaaggaat tgagagccgc	1260
tagccacca tgagaaggcag	ccccggcaac	atggagagaa tcgtgatctg cctgatggtg	1320
atcttcctgg gcacccctggt	gcataagagc	agcagccagg gccaggacag acacatgatc	1380
cgcacatgagac agctgatcga	catcggttgc	cagctgaaga actacgtgaa cgacctgg	1440
cccgagttcc tgcccgcccc	cgaggacgtg	gagaccaact gcgagtggag cgccttcagc	1500
tgcttccaga aggcccagct	gaagtccgccc	aacaccggca acaacgagag aatcatcaac	1560
gtgagcatca agaagctgaa	gcggaagccc	cccagcacca acgcccggaa aagacagaag	1620
cacagactga cctgtcccag	ctgcgcacagc	tacgagaaga agcccccaa ggagttcctg	1680
gagagattca agagcctgct	gcaaaagatg	atccaccagc acctgagcag cagaacccac	1740
ggcagcggagg acagctgaat	cgattgcgc	aagcttgcg gataggcgg accaatgggt	1800
gtgtacgttag cggccgctcg	agaacttg	tattgcagct tataatgggt acaaataaaag	1860

caatagcatc acaaatttca caaataaagc attttttca ctgcattcta gttgtggtt	1920
gtccaaactc atcaatgtat cttatcatgt ctcgtacggc gtggtaggtc cgaacgaatc	1980
catggattac cctgttatcc ctatccggag ttaacctcga ggacttcgga acttctagaa	2040
ccagaccgtt cagttaaac gctcttctcc ccctcgaggg cctccgcgcc gggttttggc	2100
gcctcccgcg ggcgcggggc tcctcacggc gagcgctgcc acgtcagacg aaggcgccag	2160
cgagcgtcct gatccttccg cccggacgct caggacagcg gcccgctgct cataagactc	2220
ggccttagaa ccccagtatc agcagaagga catttttagga cgggacttgg gtgactctag	2280
ggcactgggtt ttcttccag agagcggAAC aggcgaggaa aagttagtccc ttctcggcga	2340
ttctgcggag ggatctccgt ggggcgggtga acgcccgtatga ttatataagg acgcgcgggg	2400
tgtggcacag ctagttccgt cgccagccggg atttgggtcg cggttcttgc ttgtggatcg	2460
ctgtgatcgt cacttggtga gtagcgggct gctgggctgg gtacgtgcgc tcggggttgg	2520
cgagtgtgtt ttgtgaagtt ttttaggcac ctttgaaat gtaatcattt gggtaat	2580
gtaatttca gtgttagact agtaaattgt ccgctaaatt ctggccgttt ttggctttt	2640
tgttagacgg catgcggggg gggggggggg caattggcca ccatggccc caagaagaaa	2700
aggaagggtgg cccccccac cgacgtgagc ctgggcgacg agctgcaccc ggacggcgag	2760
gacgtggcca tggcccacgc cgacgcctg gacgacttcg acctggacat gctgggcgac	2820
ggcgacagcc cggccccggg cttcaccccc cacgacagcg cccctacgg cgccctggac	2880
atggccgact tcgagttcga gcagatgttc accgacgccc tggcatcga cgagtacggc	2940
ggccatatgg agatgcccgt ggacaggatt ctggaggccg aactcgccgt ggagcagaaa	3000
agcgaccagg gcgtggaggg cccggcgga accggcgca gcggcagcag ccccaacgac	3060
cccggtacca acatctgcca ggccgcgcac aagcagctgt tcaccctgggt ggagtggcc	3120
aagaggattc cccacttcag cagcctgccc ctggacgacc aggtgatcct gctgagggcc	3180
ggatggaacg agctgctgat cgccagcttc agccacagga gcatcgacgt gaggacggc	3240
atcctgctgg ccaccggcct gcacgtccat aggaacagcg cccacagcgc cggagtggc	3300
gccatcttcg acagggtgct gaccgagctg gtgagcaaga tgagggacat gaggatggac	3360
aagaccgagc tggctgcct gagggccatc atcctgttca accccgaggt gaggggcctg	3420
aaaagcgccc aggaggtgga gctgctgagg gagaagggtgt acgcccctt ggaggagttac	3480
accaggacca cccacccga cgagccggc agattcgcca agctgctgct gaggctgccc	3540
agcctgagga gcatcggcct gaagtgcctg gacgacccgt tcttcttcag gctgatcggc	3600
gacgtgccc tcgacacctt cctgatggag atgctggaga gccccagcga cagctgagcc	3660
ggcaactcgc tgttagtaatt ccagcgagag gcagagggag cgagcggcg gcgggctagg	3720
gtggaggagc cggcgagca gagctgcgt gcgggcgtcc tggaaaggga gatccggagc	3780
gaataggggg cttcgccctt ggcccagccc tcccgctgat ccccaagcca gcgggtgcga	3840
accctagccg catccacgaa actttgccc tagcagcgaa cgggcacttt gcactggAAC	3900

ttacaacacc	cgagcaagga	cgcgactctc	ccgacgcggg	gaggctattc	tgcccatttg	3960
gggacacttc	cccgccgctg	ccaggaccccg	cttctctgaa	aggctctcct	tgcagctgct	4020
tagacgctgg	attttttcg	ggttagtgaa	aaccagcagc	ctcccgac	cagatctgcc	4080
accatgaagc	tgctgagcag	catcgagcag	gcttgcgaca	tctgcaggct	gaagaagctg	4140
aagtgcagca	aggagaagcc	caagtgcgcc	aagtgcctga	agaacaactg	ggagtgcaga	4200
tacagccccca	agaccaagag	gagccccctg	accagggccc	acctgaccga	ggtggagagc	4260
aggctggaga	ggctggagca	gctgttcctg	ctgatcttcc	ccagggagga	cctggacatg	4320
atcctgaaga	tggacagcct	gcaagacatc	aaggccctgc	tgaccggcct	gttcgtgcag	4380
gacaacgtga	acaaggacgc	cgtgaccgac	aggctggcca	gcgtggagac	cgacatgccc	4440
ctgaccctga	ggcagcacag	gatcagcgcc	accagcagca	gcgaggagag	cagcaacaag	4500
ggccagagggc	agctgaccgt	gagccccgag	tttcccggga	tcagggccga	gtgcgtggtg	4560
cccgagaccc	agtgcgccat	gaaaaggaag	gagaagaagg	cccagaagga	gaaggacaag	4620
ctgcccgtga	gcaccaccac	cgtcgatgac	cacatcccc	ccatcatgca	gtgcgagccc	4680
ccccccccc	aggccgcccag	gattcacgag	gtcgtgccc	ggttcctgag	cgacaagctg	4740
ctggtgacca	acaggcagaa	gaacatcccc	cagctgaccg	ccaaccagca	gttcctgatc	4800
gccaggctga	tctggtatca	ggacggctac	gagcagccc	gcgacgagga	cctgaaaagg	4860
atcaccnaga	cctggcagca	ggccgacgac	gagaacgagg	agagcgacac	ccccttcagg	4920
cagatcaccg	agatgaccat	cctgaccgtg	cagctgatcg	tggagttcgc	caagggcctg	4980
cccgaggatcg	ccaagatcag	ccagccgac	cagatcaccc	tgctgaaggc	ttgcagcagc	5040
gaggtgatga	tgctgagggt	ggccaggagg	tacgacgccc	ccagcgacag	catcctgttc	5100
gccaacaacc	aggcttacac	cagggacaac	tacaggaagg	ctggcatggc	cgaggtgatc	5160
gaggacctcc	tgcacttctg	cagatgtatg	tacagcatgg	ccctggacaa	catccactac	5220
gccctgctga	ccgcccgttgt	gatcttcagc	gacaggccc	gcctggagca	gccccagctg	5280
gtggaggaga	tccagaggt	ctacctgaac	accctgagga	tctacatcct	gaaccagctg	5340
agcggcagcg	ccaggagcag	cgtgatctac	ggcaagatcc	tgagcatcct	gagcgagctg	5400
aggaccctgg	aatgcagaa	cagcaatatg	tgtatcagcc	tgaagctgaa	gaacaggaag	5460
ctgccccct	tcctggagga	gatttggac	gtggccgaca	tgagccacac	ccagcccccc	5520
cccatcctgg	agagccccac	caacctgtga	atcgattaga	catgataaga	tacattgatg	5580
agtttggaca	aaccacaact	agaatgcagt	aaaaaaaatg	cttaatttgc	gaaatttgc	5640
atgctattgc	ttaatttgc	accattataa	gctgcaataa	acaagttaat	aaaacattg	5700
cattcatttt	atgtttcagg	ttcaggggga	gatgtggag	gtttttaaa	gcaagtaaaa	5760
cctctacaaa	tgtggtatct	agagctttc	caaataagatc	tggaagggtc	tgaggtacga	5820
tgagaccgc	accaggtgca	gaccctgcga	gtgtggcggt	aaacatatta	ggaaccagcc	5880
tgtgatgctg	gatgtgaccg	aggagctgag	gcccgatcac	ttggtgctgg	cctgcacccg	5940

cgctgagtt ggctctagcg atgaagatac agattgaggt actgaaatgt gtgggcgtgg 6000
cttaagggtg gaaaagaata tataaggtgg gggcttatg tagttttaa tctgtttgc 6060
agcagccgcc gccgccatga gcaccaactc gtttgcgaa agcattgtga gctcatattt 6120
gacaacgcgc atgccccat gggccgggt gcgtcagaat gtgatggct ccagcattga 6180
tggtcgcccc gtcctgccc caaactctac taccttgc tacgagaccg tgcgtggaa 6240
gccgttggag actgcagcct ccgcccgc ttcagccgt gcagccaccg cccgcggat 6300
tgtgactgac ttgtttcc tgagccgct tgcaagcagt gcagcttccc gttcatccgc 6360
ccgcgatgac aagttgacgg ctctttggc acaattggat tcttgaccc gggacttaa 6420
tgtcgttct cagcagctgt tggatctgc ccagcagggt tctggctga aggcttcctc 6480
ccctcccaat gcggttaaa acataaataa aaaaccagac tctgtttggaa ttggatcaa 6540
gcaagtgtct tgctgtctt atttaggggt ttgcgcgcg cggtaggccc gggaccagcg 6600
gtctcggtcg ttgagggtcc tgtgtatccc ttccaggacg tggtaaagggt gactctggat 6660
gttcagatac atggcataa gcccgtctt ggggtggagg tagcaccact gcagagcttc 6720
atgctgcggg gtgggtttgt agatgatcca gtcgttagcag gagcgtggg cgtggcct 6780
aaaaatgtct ttcaagtagca agctgattgc cagggcagg ccctgggtgt aagtgtttac 6840
aaagcggta agctggatg ggtcatacg tggggatatg agatgatct tggactgtat 6900
tttaggttgc gctatgttcc cagccatatc cctccgggaa ttcatgttgc gcaaccac 6960
cagcacagtg tatccggcgc acttggaaa ttgtcatgt agcttagaag gaaatgcgtg 7020
gaagaacttgc gagacgccc tttgtaccc aagatttcc atgcattcgt ccataatgtat 7080
ggcaatggc ccacggcgg cggcctggc gaagatattt ctggatcac taacgtcata 7140
gttgtttcc agatgagat cgtcataggc cattttaca aagcgcggc ggagggtgcc 7200
agactgcgtt ataatggttc catccggccc aggggcgttag ttaccctcac agatggcat 7260
ttcccacgtt tttagttcag atggggat catgtctacc tgcggggcga tgaagaaaac 7320
ggttccggg gttagggaga tcagctggaa agaaagcagg ttccctgagca gctgcactt 7380
accgcagccg gtgggcccgt aaatcacacc tattaccggg tgcaactgggt agttaagaga 7440
gctgcagctg ccgtcatccc tgagcagggg ggccacttcg ttaagcatgt ccctgactcg 7500
catgtttcc ctgaccaaattt ccgcagaag gcgcgtcgccg cccagcgata gcagttcttgc 7560
caaggaagca aagttttca acggttgcg accgtccgcg ttaggcattgc ttttgcgt 7620
ttgaccaagc agttccaggc ggtcccacag ctcggtcacc tgctctacgg catctcgatc 7680
cagcatatct cctcggttcg cgggttgggg cggcttcgc tgcgtggcag tagtcggcgc 7740
tcgtccagac gggccagggt catgttttc cacgggcgcg gggcctcgatc cagcgtatc 7800
tgggtcacgg tgaagggtg cgctccggc tgcgcgtgg ccagggtgcg cttgaggctg 7860
gtcctgctgg tgctgaagcg ctgcccgtt tcgcgcgtgg cgtccggccag gtagcatttgc 7920
accatgggtt catagtcccg cccctccgcg gcgtggccct tggcgcgcag cttgcccgttgc 7980

gaggaggcgc	cgcacgaggg	gcagtgcaga	ctttgaggg	cgttagagctt	gggcgcgaga	8040
aataccgatt	ccggggagta	ggcatcccg	ccgcaggccc	cgcagacggt	ctcgcat	8100
acgagccagg	tgagctctgg	ccgttcgggg	tcaaaaacca	ggttccccc	atgcttttgc	8160
atgcgtttct	tacctctgg	ttccatgagc	cggtgtccac	gctcggtgac	gaaaaggctg	8220
tccgtgtccc	cgtatacaga	cttgagaggc	ctgtcctcga	ccgatgcct	tgagagcctt	8280
caacccagtc	agtccttcc	ggtggcg	ggcatgact	atcg	tcgccc	8340
tgtcttctt	atcatgcaac	tcgttaggaca	ggtgcggca	gcgc	tgcgg	8400
cgaggaccgc	tttcgctgga	gcgcgacgat	gatcg	ccgt	tgcgg	8460
cttgcacgcc	ctcgctcaag	ccttcgtcac	tgg	cccgcc	accaa	8520
gcaggccatt	atcgccggca	tggcggccga	cgcg	ctgggc	tacgt	8580
gacgcgaggc	tggatggcct	tcccattat	gatt	cttctc	gcttcggc	8640
gcccgcgtt	caggccatgc	tgtccaggca	ggtagatgac	gaccatcagg	gacag	8700
aggccagcaa	aaggccagga	accgtaaaaa	ggccgcgtt	ctggcgtt	tccataggt	8760
ccgccccct	gacgagcatc	acaaaaatcg	acg	ctcaagt	cagagg	8820
aggactataa	agataccagg	cg	tttcccc	tggaa	agctcc	8880
gaccctgccc	tttaccggat	acctgtccgc	ctt	tccct	tcggaa	8940
tcatagctca	cgtgttaggt	atctcagttc	gg	tgttaggtc	gttc	9000
tgtgcacgaa	ccccccgttc	agccc	gaccg	ctgc	ctta	9060
gtccaacccg	gtaagacacg	acttatcgcc	actgg	cagca	tggta	9120
cagagcgagg	tatgttaggcg	gtg	ctacaga	gtt	cttgaag	9180
cactagaagg	acagtatttgc	gtat	ctgcgc	tct	gtgta	9240
agttggtagc	tcttgcgtcc	gcaaa	acaac	cacc	gcgtgg	9300
caagcagcag	attacgcgca	gaaaaaaagg	atctcaagaa	gatc	cttgc	9360
ggggtctgac	gctcagtgg	acgaaaactc	acg	ttaagg	at	9420
aaaaaggatc	ttcacctaga	tc	ctttt	aaat	gtttaa	9480
tatatatgag	taaaacttgg	ctgacagtt	ccaa	tgcgtt	atcgtgagg	9540
agcgatctgt	ctat	ttcg	ccat	atgt	gagg	9600
gatacggag	gg	cttaccat	ctgg	cccc	atacc	9660
accggctcca	gat	ttatcag	caata	aaacca	gccag	9720
tcctgcaact	ttat	ccatccagtc	tat	aaattgt	tgcc	9780
tagttcgcca	gttaatagtt	tg	cgcaacgt	tgttgc	ccatt	9840
acgctcg	tttgg	ttatcag	ctcc	gggttcc	caac	9900
atgatcccc	atgttgc	aaaa	agcggt	tagt	ccttc	9960
aagtaagtt	gccgc	agtgt	tat	cactcat	ggtt	at
					at	10020

tgtcatgcca tccgtaagat gctttctgt gactggtag tactcaacca agtcattctg 10080
 agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc ttgcccggcg tcaacacggg ataataccgc 10140
 gcccacatagc agaactttaa aagtgctcat cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact 10200
 ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcatgtaa cccactcgtg cacccaaactg 10260
 atcttcagca tctttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa 10320
 tgccgcaaaa aagggataa gggcacacg gaaatgttga atactcatac ttttccttt 10380
 tcaatattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg 10440
 tatttagaaa aa 10452

<210> 9
 <211> 489
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic mIL-21

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(489)

<400> 9
 atg aag atc ctg aag ccc tac atg agg aac acc agc atc agc tgt tac 48
 Met Lys Ile Leu Lys Pro Tyr Met Arg Asn Thr Ser Ile Ser Cys Tyr
 1 5 10 15

ctg tgc ttc ctg ctg aac agc cac ttc ctg acc gag gcc gga atc cac 96
 Leu Cys Phe Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His
 20 25 30

gtc ttc atc ctg ggc tgc gtg agc gtg ggc ctg ccc aag acc gag gcc 144
 Val Phe Ile Leu Gly Cys Val Ser Val Gly Leu Pro Lys Thr Glu Ala
 35 40 45

aac tgg atc gac gtg agg tac gac ctg gag aag atc gag agc ctg atc 192
 Asn Trp Ile Asp Val Arg Tyr Asp Leu Glu Lys Ile Glu Ser Leu Ile
 50 55 60

cag agc atc cac atc gac acc acc ctg tac acc gac agc gac ttc cac 240
 Gln Ser Ile His Ile Asp Thr Leu Tyr Asp Ser Asp Phe His
 65 70 75 80

ccc agc tgc aag gtg acc gcc atg aac tgc ttc ctg ctg gag ctg caa 288
 Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Asn Cys Phe Leu Glu Leu Gln
 85 90 95

gtg atc ctg cac gag tac agc aac atg acc ctg aac gag acc gtg agg 336
 Val Ile Leu His Glu Tyr Ser Asn Met Thr Leu Asn Glu Thr Val Arg
 100 105 110

aac gtg ctg tac ctg gct aac agc acc ctg agc agc aac aag aac gtg 384
 Asn Val Leu Tyr Leu Ala Asn Ser Thr Leu Ser Ser Asn Lys Asn Val
 115 120 125

gcc gag agc ggc tgc aag gag tgt gag gag ctg gag gag aag acc ttc 432
 Ala Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Lys Thr Phe
 130 135 140

acc gag ttc ctc cag agc ttc atc agg atc gtg cag atg ttc atc aac 480

Thr Glu Phe Leu Gln Ser Phe Ile Arg Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
 145 150 155 160
 acc agc tga
 Thr Ser

489

<210> 10
 <211> 162
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 10

Met Lys Ile Leu Lys Pro Tyr Met Arg Asn Thr Ser Ile Ser Cys Tyr
 1 5 10 15

Leu Cys Phe Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His
 20 25 30

Val Phe Ile Leu Gly Cys Val Ser Val Gly Leu Pro Lys Thr Glu Ala
 35 40 45

Asn Trp Ile Asp Val Arg Tyr Asp Leu Glu Lys Ile Glu Ser Leu Ile
 50 55 60

Gln Ser Ile His Ile Asp Thr Thr Leu Tyr Thr Asp Ser Asp Phe His
 65 70 75 80

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Asn Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
 85 90 95

Val Ile Leu His Glu Tyr Ser Asn Met Thr Leu Asn Glu Thr Val Arg
 100 105 110

Asn Val Leu Tyr Leu Ala Asn Ser Thr Leu Ser Ser Asn Lys Asn Val
 115 120 125

Ala Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Thr Phe
 130 135 140

Thr Glu Phe Leu Gln Ser Phe Ile Arg Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
 145 150 155 160

Thr Ser

<210> 11
 <211> 489
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic MIL-15

<220>	CDS																	
<221>	(1)..(489)																	
<400>	11																	
atg aag atc ctg aag ccc tac atg agg aac acc agc atc agc tgt tac																		48
Met Lys Ile Leu Lys Pro Tyr Met Arg Asn Thr Ser Ile Ser Cys Tyr																		
1 5 10 15																		
ctg tgc ttc ctg ctg aac agc cac ttc ctg acc gag gcc gga atc cac																		96
Leu Cys Phe Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His																		
20 25 30																		
gtc ttc atc ctg ggc tgc gtg agc gtg ggc ctg ccc aag acc gag gcc																		144
Val Phe Ile Leu Gly Cys Val Ser Val Gly Leu Pro Lys Thr Glu Ala																		
35 40 45																		
aac tgg atc gac gtg agg tac gac ctg gag aag atc gag agc ctg atc																		192
Asn Trp Ile Asp Val Arg Tyr Asp Leu Glu Lys Ile Glu Ser Leu Ile																		
50 55 60																		
cag agc atc cac atc gac acc acc ctg tac acc gac agc gac ttc cac																		240
Gln Ser Ile His Ile Asp Thr Thr Leu Tyr Thr Asp Ser Asp Phe His																		
65 70 75 80																		
ccc agc tgc aag gtg acc gcc atg aac tgc ttc ctg ctg gag ctg caa																		288
Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Asn Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln																		
85 90 95																		
gtg atc ctg cac gag tac agc aac atg acc ctg aac gag acc gtg agg																		336
Val Ile Leu His Glu Tyr Ser Asn Met Thr Leu Asn Glu Thr Val Arg																		
100 105 110																		
aac gtg ctg tac ctg gct aac agc acc ctg agc agc aac aag aac gtg																		384
Asn Val Leu Tyr Leu Ala Asn Ser Thr Leu Ser Ser Asn Lys Asn Val																		
115 120 125																		
gcc gag agc ggc tgc aag gag tgt gag gag ctg gag gag aag acc ttc																		432
Ala Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Thr Phe																		
130 135 140																		
acc gag ttc ctc cag agc ttc atc agg atc gtg cag atg ttc atc aac																		480
Thr Glu Phe Leu Gln Ser Phe Ile Arg Ile Val Gln Met Phe Ile Asn																		
145 150 155 160																		
acc agc tga																		489
Thr Ser																		

<210> 12
<211> 162
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 12

Met Lys Ile Leu Lys Pro Tyr Met Arg Asn Thr Ser Ile Ser Cys Tyr
1 5 10 15

Leu Cys Phe Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His

20

25

30

Val Phe Ile Leu Gly Cys Val Ser Val Gly Leu Pro Lys Thr Glu Ala
 35 40 45

Asn Trp Ile Asp Val Arg Tyr Asp Leu Glu Lys Ile Glu Ser Leu Ile
 50 55 60

Gln Ser Ile His Ile Asp Thr Thr Leu Tyr Thr Asp Ser Asp Phe His
 65 70 75 80

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Asn Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
 85 90 95

Val Ile Leu His Glu Tyr Ser Asn Met Thr Leu Asn Glu Thr Val Arg
 100 105 110

Asn Val Leu Tyr Leu Ala Asn Ser Thr Leu Ser Ser Asn Lys Asn Val
 115 120 125

Ala Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Thr Phe
 130 135 140

Thr Glu Phe Leu Gln Ser Phe Ile Arg Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
 145 150 155 160

Thr Ser

<210> 13

<211> 1008

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic mIL-12, mp40

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1008)

<400> 13

atg tgc ccc cag aag ctg acc atc agc tgg ttc gcc atc gtg ctg ctg
 Met Cys Pro Gln Lys Leu Thr Ile Ser Trp Phe Ala Ile Val Leu Leu
 1 5 10 15

48

gtg agc ccc ctg atg gcc atg tgg gag ctg gag aag gac gtg tac gtg
 Val Ser Pro Leu Met Ala Met Trp Glu Leu Glu Lys Asp Val Tyr Val
 20 25 30

96

gtg gag gtg gac tgg acc ccc gac gcc ccc ggc gag acc gtg aac ctg
 Val Glu Val Asp Trp Thr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Thr Val Asn Leu
 35 40 45

144

act tgc gac acc ccc gag gag gac gac atc acc tgg acc agc gac cag
 Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Asp Ile Thr Trp Thr Ser Asp Gln
 50 55 60

192

aga cac ggc gtc atc ggc agc ggc aag acc ctg acc atc acc acc gtg aag	Arg His Gly Val Ile Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Thr Val Lys	240
65 70 75 80		
gag ttc ctg gac gcc gga cag tac acc tgt cac aag ggc ggc gag acc	Glu Phe Leu Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Thr	288
85 90 95		
ctg agc cac agc cac ctg ttg ctg cac aag aag gag aac ggc atc tgg	Leu Ser His Ser His Leu Leu His Lys Lys Glu Asn Gly Ile Trp	336
100 105 110		
agc acc gag atc ctg aag aac ttc aag aac aag acc ttc ctg aag tgc	Ser Thr Glu Ile Leu Lys Asn Phe Lys Asn Lys Thr Phe Leu Lys Cys	384
115 120 125		
gag gcc ccc aac tac agc ggc aga ttc acc tgt agc tgg ctg gtg cag	Glu Ala Pro Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Ser Trp Leu Val Gln	432
130 135 140		
aga aac atg gac ctg aag ttc aac atc aag agc agc agc agc ccc	Arg Asn Met Asp Leu Lys Phe Asn Ile Lys Ser Ser Ser Ser Pro	480
145 150 155 160		
gac agc aga gcc gtg aca tgc ggc atg gcc agc ctg agc gcc gag aag	Asp Ser Arg Ala Val Thr Cys Gly Met Ala Ser Leu Ser Ala Glu Lys	528
165 170 175		
gtg acc ctg gac cag aga gac tac gag aag tac agc gtg agc tgc cag	Val Thr Leu Asp Gln Arg Asp Tyr Glu Lys Tyr Ser Val Ser Cys Gln	576
180 185 190		
gag gac gtg acc tgt ccc acc gcc gag gag acc ctg ccc atc gag ctt	Glu Asp Val Thr Cys Pro Thr Ala Glu Glu Thr Leu Pro Ile Glu Leu	624
195 200 205		
gcc ctg gaa gcc aga cag cag aac aag tac gag aac tac agc acc agc	Ala Leu Ala Arg Gln Gln Asn Lys Tyr Glu Asn Tyr Ser Thr Ser	672
210 215 220		
ttc ttc atc aga gac atc atc aag ccc gac ccc ccc aag aac ctc cag	Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn Leu Gln	720
225 230 235 240		
atg aag ccc ctg aag aac agc cag gtg gag gtg tcc tgg gag tac ccc	Met Lys Pro Leu Lys Asn Ser Gln Val Glu Val Ser Trp Glu Tyr Pro	768
245 250 255		
gac agc tgg agc acc ccc cac agc tac ttc agc ctg aag ttc ttc gtg	Asp Ser Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Lys Phe Phe Val	816
260 265 270		
aga atc cag aga aag aag gag aag atg aag gag acc gag gag ggc tgc	Arg Ile Gln Arg Lys Lys Glu Lys Met Lys Glu Thr Glu Glu Gly Cys	864
275 280 285		
aac cag aag ggc gct ttc ctg gtg gag aaa acc agc acc gag gtg cag	Asn Gln Lys Gly Ala Phe Leu Val Glu Lys Thr Ser Thr Glu Val Gln	912
290 295 300		
tgc aag ggc ggc aac gtg tgt gtg cag gcc cag gac aga tac tac aac	Cys Lys Gly Gly Asn Val Cys Val Gln Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Asn	960
305 310 315 320		
agc agc tgc tcc aag tgg gcc tgc gtg ccc tgc cgc gtg aga agc tga	Ser Ser Cys Ser Lys Trp Ala Cys Val Pro Cys Arg Val Arg Ser	1008
325 330 335		

<210> 14
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct
 <400> 14

Met Cys Pro Gln Lys Leu Thr Ile Ser Trp Phe Ala Ile Val Leu Leu
 1 5 10 15

Val Ser Pro Leu Met Ala Met Trp Glu Leu Glu Lys Asp Val Tyr Val
 20 25 30

Val Glu Val Asp Trp Thr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Thr Val Asn Leu
 35 40 45

Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Asp Ile Thr Trp Thr Ser Asp Gln
 50 55 60

Arg His Gly Val Ile Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Thr Val Lys
 65 70 75 80

Glu Phe Leu Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Thr
 85 90 95

Leu Ser His Ser His Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asn Gly Ile Trp
 100 105 110

Ser Thr Glu Ile Leu Lys Asn Phe Lys Asn Lys Thr Phe Leu Lys Cys
 115 120 125

Glu Ala Pro Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Ser Trp Leu Val Gln
 130 135 140

Arg Asn Met Asp Leu Lys Phe Asn Ile Lys Ser Ser Ser Ser Pro
 145 150 155 160

Asp Ser Arg Ala Val Thr Cys Gly Met Ala Ser Leu Ser Ala Glu Lys
 165 170 175

Val Thr Leu Asp Gln Arg Asp Tyr Glu Lys Tyr Ser Val Ser Cys Gln
 180 185 190

Glu Asp Val Thr Cys Pro Thr Ala Glu Glu Thr Leu Pro Ile Glu Leu
 195 200 205

Ala Leu Glu Ala Arg Gln Gln Asn Lys Tyr Glu Asn Tyr Ser Thr Ser
 210 215 220

Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn Leu Gln
225 230 235 240

Met Lys Pro Leu Lys Asn Ser Gln Val Glu Val Ser Trp Glu Tyr Pro
245 250 255

Asp Ser Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Lys Phe Phe Val
260 265 270

Arg Ile Gln Arg Lys Lys Glu Lys Met Lys Glu Thr Glu Glu Gly Cys
275 280 285

Asn Gln Lys Gly Ala Phe Leu Val Glu Lys Thr Ser Thr Glu Val Gln
290 295 300

Cys 305 Lys 310 Gly 310 Gly 310 Asn 310 Val 310 Cys 315 Val 315 Gln 315 Ala 315 Gln 315 Asp 320 Arg 320 Tyr 320 Tyr 320 Asn 320

Ser Ser Cys Ser Lys Trp Ala Cys Val Pro Cys Arg Val Arg Ser
325 330 335

<210> 15
<211> 648
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic mIL-12, mp35

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(648)

```

<400> 15
atg tgc cag agc aga tac ctg ttg ttc ctg gct acc ctg gcc ctg ctg
Met Cys Gln Ser Arg Tyr Leu Leu Phe Leu Ala Thr Leu Ala Leu Leu
1          5          10          15

```

aac cac ctg agc ctg gcc cgc gtg atc ccc gtg agc ggc ccc gcc aga
 Asn His Leu Ser Leu Ala Arg Val Ile Pro Val Ser Gly Pro Ala Arg
 20 25 30 96

tgc	ctg	agc	cag	agc	aga	aac	ctg	ttg	aaa	aca	acc	gac	gac	atg	gtg	144
Cys	Leu	Ser	Gln	Ser	Arg	Asn	Leu	Leu	Lys	Thr	Thr	Asp	Asp	Met	Val	
35							40					45				

aaa acc gcc aga gag aag ctg aag cac tac agc tgc acc gcc gag gac 192
 Lys Thr Ala Arg Glu Lys Leu Lys His Tyr Ser Cys Thr Ala Glu Asp
 50 55 60

atc gac cac gag gac atc acc aga gac cag acc agc acc ctg aaa acc 240
 Ile Asp His Glu Asp Ile Thr Arg Asp Gln Thr Ser Thr Leu Lys Thr
 65 70 75 80

tgt	ctg	ccc	ctg	gag	ctg	cac	aag	aac	gag	agc	tgc	ctg	gct	acc	aga	288
Cys	Leu	Pro	Leu	Glu	Leu	His	Lys	Asn	Glu	Ser	Cys	Leu	Ala	Thr	Arg	
				85					90					95		

gag acc agc agc acc acc aga ggc agc tgc ctg ccc ccc cag aaa acc 336
Glu Thr Ser Ser Thr Thr Arg Gly Ser Cys Leu Pro Pro Gln Lys Thr

100	105	110	
agc ctg atg atg acc ctg tgc ctg ggc agc atc tac gag gac ctg aag			384
Ser Leu Met Met Thr Leu Cys Leu Gly Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys			
115	120	125	
atg tac cag acc gag ttc cag gcc atc aac gcc gcc ctg caa aac cac			432
Met Tyr Gln Thr Glu Phe Gln Ala Ile Asn Ala Ala Leu Gln Asn His			
130	135	140	
aac cac cag cag atc atc ctg gac aag ggc atg ttg gtg gcc atc gac			480
Asn His Gln Gln Ile Ile Leu Asp Lys Gly Met Leu Val Ala Ile Asp			
145	150	155	
gag ctg atg cag agc ctg aac cac aac ggc gag acc ctg aga cag aag			528
Glu Leu Met Gln Ser Leu Asn His Asn Gly Glu Thr Leu Arg Gln Lys			
165	170	175	
ccc ccc gtg ggc gag gcc gac ccc tac aga gtg aag atg aag ctg tgc			576
Pro Pro Val Gly Glu Ala Asp Pro Tyr Arg Val Lys Met Lys Leu Cys			
180	185	190	
atc ctg ctg cac gcc ttc agc acc aga gtg gtg acc atc aac aga gtg			624
Ile Leu Leu His Ala Phe Ser Thr Arg Val Val Thr Ile Asn Arg Val			
195	200	205	
atg ggc tac ctg agc agc gcc tga			648
Met Gly Tyr Leu Ser Ser Ala			
210	215		

<210> 16

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 16

Met Cys Gln Ser Arg Tyr Leu Leu Phe Leu Ala Thr Leu Ala Leu Leu			
1	5	10	15

Asn His Leu Ser Leu Ala Arg Val Ile Pro Val Ser Gly Pro Ala Arg		
20	25	30

Cys Leu Ser Gln Ser Arg Asn Leu Leu Lys Thr Thr Asp Asp Met Val		
35	40	45

Lys Thr Ala Arg Glu Lys Leu Lys His Tyr Ser Cys Thr Ala Glu Asp		
50	55	60

Ile Asp His Glu Asp Ile Thr Arg Asp Gln Thr Ser Thr Leu Lys Thr			
65	70	75	80

Cys Leu Pro Leu Glu Leu His Lys Asn Glu Ser Cys Leu Ala Thr Arg		
85	90	95

Glu Thr Ser Ser Thr Thr Arg Gly Ser Cys Leu Pro Pro Gln Lys Thr		
100	105	110

Ser Leu Met Met Thr Leu Cys Leu Gly Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys
 115 120 125

Met Tyr Gln Thr Glu Phe Gln Ala Ile Asn Ala Ala Leu Gln Asn His
 130 135 140

Asn His Gln Gln Ile Ile Leu Asp Lys Gly Met Leu Val Ala Ile Asp
 145 150 155 160

Glu Leu Met Gln Ser Leu Asn His Asn Gly Glu Thr Leu Arg Gln Lys
 165 170 175

Pro Pro Val Gly Glu Ala Asp Pro Tyr Arg Val Lys Met Lys Leu Cys
 180 185 190

Ile Leu Leu His Ala Phe Ser Thr Arg Val Val Thr Ile Asn Arg Val
 195 200 205

Met Gly Tyr Leu Ser Ser Ala
 210 215

<210> 17

<211> 489

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic hIL-21

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(489)

<400> 17

atg aga agc agc ccc ggc aac atg gag aga atc gtg atc tgc ctg atg
 Met Arg Ser Ser Pro Gly Asn Met Glu Arg Ile Val Ile Cys Leu Met
 1 5 10 15

48

gtg atc ttc ctg ggc acc ctg gtg cat aag agc agc agc cag ggc cag
 Val Ile Phe Leu Gly Thr Leu Val His Lys Ser Ser Ser Gln Gly Gln
 20 25 30

96

gac aga cac atg atc cgc atg aga cag ctg atc gac atc gtg gac cag
 Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp Gln
 35 40 45

144

ctg aag aac tac gtg aac gac ctg gtg ccc gag ttc ctg ccc gcc ccc
 Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala Pro
 50 55 60

192

gag gac gtg gag acc aac tgc gag tgg agc gcc ttc agc tgc ttc cag
 Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys Phe Gln
 65 70 75 80

240

aag gcc cag ctg aag tcc gcc aac acc ggc aac aac gag aga atc atc
 Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile Ile
 85 90 95

288

aac gtg agc atc aag aag ctg aag cgg aag ccc ccc agc acc aac gcc

336

Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr Asn Ala			
100	105	110	
gga aga aga cag aag cac aga ctg acc tgt ccc agc tgc gac agc tac			384
Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr			
115	120	125	
gag aag aag ccc ccc aag gag ttc ctg gag aga ttc aag agc ctg ctg			432
Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu			
130	135	140	
caa aag atg atc cac cag cac ctg agc agc aga acc cac ggc agc gag			480
Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu			
145	150	155	160
gac agc tga			489
Asp Ser			

<210> 18

<211> 162

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 18

Met Arg Ser Ser Pro Gly Asn Met Glu Arg Ile Val Ile Cys Leu Met			
1	5	10	15

Val Ile Phe Leu Gly Thr Leu Val His Lys Ser Ser Ser Gln Gly Gln		
20	25	30

Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp Gln		
35	40	45

Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala Pro		
50	55	60

Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys Phe Gln			
65	70	75	80

Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile Ile		
85	90	95

Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr Asn Ala			
100	105	110	

Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr			
115	120	125	

Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu			
130	135	140	

Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu			
145	150	155	160

Asp Ser

<210> 19
 <211> 489
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic hIL-15

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(489)

 <400> 19
 atg aga atc agc aag ccc cac ctg aga agc atc agc atc cag tgt tac 48
 Met Arg Ile Ser Lys Pro His Leu Arg Ser Ile Ser Ile Gln Cys Tyr
 1 5 10 15

 ctg tgc ctg ctg aac agc cac ttc ctg acc gag gcc ggt atc cac 96
 Leu Cys Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His
 20 25 30

 gtc ttc atc ctg ggc tgc ttc agc gcc gga ctg ccc aag acc gag gcc 144
 Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu Pro Lys Thr Glu Ala
 35 40 45

 aac tgg gtg aac gtg atc tct gac ctg aag aag atc gag gac ctg atc 192
 Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Ile Glu Asp Leu Ile
 50 55 60

 cag tcc atg cac atc gac gcc acc ctg tac acc gag agc gac gtt cat 240
 Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
 65 70 75 80

 ccc agc tgc aag gtg acc gcc atg aag tgc ttc ctg ctg gag ctg caa 288
 Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
 85 90 95

 gtg atc tcc ctg gag agc ggc gac gcc agc atc cac gac acc gtg gag 336
 Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
 100 105 110

 aac ctg att atc ctg gct aac aac agc ctg agc agc aac ggc aac gtg 384
 Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
 115 120 125

 acc gag agc ggc tgc aag gag tgt gag gag ctg gag gag aag aac atc 432
 Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
 130 135 140

 aag gag ttc ctc cag agc ttc gtg cat atc gtc cag atg ttc atc aac 480
 Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
 145 150 155 160

 acc agc tga 489
 Thr Ser

<210> 20
 <211> 162
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 20

Met Arg Ile Ser Lys Pro His Leu Arg Ser Ile Ser Ile Gln Cys Tyr
 1 5 10 15

Leu Cys Leu Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His
 20 25 30

Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu Pro Lys Thr Glu Ala
 35 40 45

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
 50 55 60

Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
 65 70 75 80

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
 85 90 95

Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
 100 105 110

Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
 115 120 125

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
 130 135 140

Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
 145 150 155 160

Thr Ser

<210> 21

<211> 987

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic hIL-12, p40

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(987)

<400> 21

atg ggt cac cag cag ttg gtc atc tct tgg ttt tcc ctg gtt ttt ctg
 Met Gly His Gln Gln Leu Val Ile Ser Trp Phe Ser Leu Val Phe Leu
 1 5 10 15

gca tct ccc ctc gtg gcc ata tgg gaa ctg aag aaa gat gtt tat gtc Ala Ser Pro Leu Val Ala Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val 20 25 30	96
gta gaa ttg gat tgg tat ccg gat gcc cct gga gaa atg gtc gtc ctc Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu 35 40 45	144
acc tgt gac acc cct gaa gaa gat ggt atc acc tgg acc ttg gac cag Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln 50 55 60	192
agc agt gag gtc tta ggc tct ggc aaa acc ctg acc atc caa gtc aaa Ser Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys 65 70 75 80	240
gag ttt gga gat gct ggc cag tac acc tgt cac aaa gga ggc gag gtt Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val 85 90 95	288
cta agc cat tcg ctc ctg ctg ctt cac aaa aag gaa gat gga att tgg Leu Ser His Ser Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp 100 105 110	336
tcc act gat att tta aag gac cag aaa gaa ccc aaa aat aag acc ttt Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe 115 120 125	384
cta aga tgc gag gcc aag aat tat tct gga cgt ttc acc tgc tgg tgg Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp 130 135 140	432
ctg acg aca atc agt act gat ttg aca ttc agt gtc aaa agc agc aga Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg 145 150 155 160	480
ggc tct tct gac ccc caa ggg gtg acg tgc gga gct gct aca ctc tct Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser 165 170 175	528
gca gag aga gtc aga ggg gac aac aag gag tat gag tac tca tgc gag Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu 180 185 190	576
tgc cag gag gac agt gcc tgc cca gct gct gag gag agt ctg ccc att Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile 195 200 205	624
gag gtc atg gtg gat gcc gtt cac aag ctc aag tat gaa aac tac acc Glu Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr 210 215 220	672
agc agc ttc ttc atc agg gac atc atc aaa cct gac cca ccc aag aac Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn 225 230 235 240	720
ttg cag ctg aag cca tta aag aat tct cgg cag gtg gag gtc agc tgg Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp 245 250 255	768
gag tac cct gac acc tgg agt act cca cat tcc tac ttc tcc ctg aca Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr 260 265 270	816
ttc tgc gtt cag gtc cag ggc aag agc aag aga gaa aag aaa gat aga Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg 275 280 285	864

gtc ttc acg gac aag acc tca gcc acg gtc atc tgc cgc aaa aat gcc 912
 Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala
 290 295 300

agc att agc gtg cg^g gcc cag gac cgc tac tat agc tca tct tgg agc 960
 Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser
 305 310 315 320

gaa tgg gca tct gtg ccc tgc agt tag 987
 Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser
 325

<210> 22

<211> 328

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 22

Met Gly His Gln Gln Leu Val Ile Ser Trp Phe Ser Leu Val Phe Leu
 1 5 10 15

Ala Ser Pro Leu Val Ala Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val
 20 25 30 .

Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu
 35 40 45

Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln
 50 55 60

Ser Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys
 65 70 75 80

Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val
 85 90 95

Leu Ser His Ser Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp
 100 105 110

Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe
 115 120 125

Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp
 130 135 140

Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg
 145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser
 165 170 175

Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu
 180 185 190
 Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile
 195 200 205
 Glu Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr
 210 215 220
 Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn
 225 230 235 240
 Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp
 245 250 255
 Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr
 260 265 270
 Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg
 275 280 285
 Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala
 290 295 300
 Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser
 305 310 315 320
 Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser
 325

<210> 23
 <211> 660
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic hIL-12, p35

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(660)
 <400> 23

atg ggt cca gca cgc agc ctc ctc ctt gtg gct acc ctc gtc ctc ctg	48
Met Gly Pro Ala Arg Ser Leu Leu Leu Val Ala Thr Leu Val Leu Leu	
1 5 10 15	
gac cac ctc agt ttg gcc aga aac ctc ccc gtg gcc act cca gac cca	96
Asp His Leu Ser Leu Ala Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro	
20 25 30	
gga atg ttc cca tgc ctt cac cac tcc caa aac ctc ctg agg gcc gtc	144
Gly Met Phe Pro Cys Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val	
35 40 45	
agc aac atg ctc cag aag gcc aga caa act cta gaa ttt tac cct tgc	192
Ser Asn Met Leu Gln Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys	

50	55	60	
act tct gaa gag att gat cat gaa gat atc aca aaa gat aaa acc agc Thr Ser Glu Glu Ile Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser			240
65 70 75 80			
aca gtg gag gcc tgc tta cca ttg gaa tta acc aag aat gag agt tgc Thr Val Glu Ala Cys Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys			288
85 90 95			
cta aat tcc aga gag acc tct ttc ata act aat ggg agt tgc ctg gcc Leu Asn Ser Arg Glu Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala			336
100 105 110			
tcc aga aag acc tct ttt atg atg gcc ctg tgc ctt agt agt att tat Ser Arg Lys Thr Ser Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr			384
115 120 125			
gaa gac ttg aag atg tac cag gtg gag ttc aag acc atg aat gca aag Glu Asp Leu Lys Met Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys			432
130 135 140			
ctt ctg atg gat cct aag agg cag atc ttt cta gat caa aac atg ctg Leu Leu Met Asp Pro Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu			480
145 150 155 160			
gca gtt att gat gag ctg atg cag gcc ctg aat ttc aac agt gag act Ala Val Ile Asp Glu Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr			528
165 170 175			
gtg cca caa aaa tcc tcc ctt gaa gaa ccg gat ttt tat aaa act aaa Val Pro Gln Lys Ser Ser Leu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys			576
180 185 190			
atc aag ctc tgc ata ctt ctt cat gct ttc aga att ccg gca gtg act Ile Lys Leu Cys Ile Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr			624
195 200 205			
att gat aga gtg atg agc tat ctg aat gct tcc taa Ile Asp Arg Val Met Ser Tyr Leu Asn Ala Ser			660
210 215			
<p><210> 24 <211> 219 <212> PRT <213> Artificial Sequence</p> <p><220> <223> Synthetic Construct</p> <p><400> 24</p>			
<p>Met Gly Pro Ala Arg Ser Leu Leu Leu Val Ala Thr Leu Val Leu Leu 1 5 10 15</p>			
<p>Asp His Leu Ser Leu Ala Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro 20 25 30</p>			
<p>Gly Met Phe Pro Cys Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val 35 40 45</p>			
<p>Ser Asn Met Leu Gln Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys 50 55 60</p>			

Thr Ser Glu Glu Ile Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser
 65 70 75 80

Thr Val Glu Ala Cys Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys
 85 90 95

Leu Asn Ser Arg Glu Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala
 100 105 110

Ser Arg Lys Thr Ser Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr
 115 120 125

Glu Asp Leu Lys Met Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys
 130 135 140

Leu Leu Met Asp Pro Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu
 145 150 155 160

Ala Val Ile Asp Glu Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr
 165 170 175

Val Pro Gln Lys Ser Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys
 180 185 190

Ile Lys Leu Cys Ile Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr
 195 200 205

Ile Asp Arg Val Met Ser Tyr Leu Asn Ala Ser
 210 215

<210> 25
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Drosophila melanogaster*

<400> 25

Arg Arg Gly Gly Thr Thr Cys Ala Asn Thr Gly Ala Cys Ala Cys Tyr
 1 5 10 15

Tyr

<210> 26
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> *Drosophila melanogaster*

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 26

aggtc	canagg	tca	13				
<210>	27						
<211>	15						
<212>	DNA						
<213>	Drosophila melanogaster						
<400>	27						
gggtt	gaatg	aattt	15				
<210>	28						
<211>	18						
<212>	DNA						
<213>	Artificial Sequence						
<220>							
<223>	Synthetic homing endonuclease (HE) enzyme (I-SceI)						
<400>	28						
tagggataac	aggtaat		18				
<210>	29						
<211>	37323						
<212>	DNA						
<213>	Artificial Sequence						
<220>							
<223>	Synthetic Ad-RTS-hIL-12 (SP1-RheoIL-12)						
<400>	29						
catcatcaat	aatatacctt	attttggatt	gaagccaata	tgataatgag	gggggtggagt	60	
tttgacgtg	gcgcggggcg	tgggaacggg	gcgggtgacg	tagtagtgtg	gcggaagtgt	120	
gatgttgc	aa	gtgtggcgga	acacatgtaa	gcgacggatg	tggcaaaagt	gacgtttttg	180
gtgtgc	cc	gtgtacacag	gaagtgacaa	tttgcgcg	gttttagg	cg gatgtttag	240
taaatttgg	cg	taagatttg	ccat	tttcgc	ggaaaactg	aataagagga	300
agtgaaatct	gaataat	ttt	gtgttactca	tagcgcgtaa	tatttgc	ggagatccg	360
gtaccggcgc	gc	ttt	tagcgtaa	tatttgc	ggagatccg	gtttaggc	420
gcaccagg	cc	ttt	atgcgtt	tttgcattaca	tctgtgtt	gttttttgt	480
gtgaatcgat	at	ttt	atgcgtt	tttgcattaca	tctgtgtt	gttttttgt	540
caaaataggc	ttt	ttt	atgcgtt	tttgcattaca	tctgtgtt	gttttttgt	600
ggtcggagta	ttt	ttt	atgcgtt	tttgcattaca	tctgtgtt	gttttttgt	660
cggagtactg	ttt	ttt	atgcgtt	tttgcattaca	tctgtgtt	gttttttgt	720
agactcttcg	ttt	ttt	atgcgtt	tttgcattaca	tctgtgtt	gttttttgt	780
aaggaagagg	ttt	ttt	atgcgtt	tttgcattaca	tctgtgtt	gttttttgt	840
gaggggcggg	ttt	ttt	atgcgtt	tttgcattaca	tctgtgtt	gttttttgt	900
gtcgaagacc	ttt	ttt	atgcgtt	tttgcattaca	tctgtgtt	gttttttgt	960
tagatcacgc	ttt	ttt	atgcgtt	tttgcattaca	tctgtgtt	gttttttgt	1020
gtgcgt	ttt	ttt	atgcgtt	tttgcattaca	tctgtgtt	gttttttgt	1080
ttggatttgtt	ttt	ttt	atgcgtt	tttgcattaca	tctgtgtt	gttttttgt	
atccggatgc	ttt	ttt	atgcgtt	tttgcattaca	tctgtgtt	gttttttgt	
ccctggagaa	ttt	ttt	atgcgtt	tttgcattaca	tctgtgtt	gttttttgt	
atgggtgtcc	ttt	ttt	atgcgtt	tttgcattaca	tctgtgtt	gttttttgt	
tcacctgtga	ttt	ttt	atgcgtt	tttgcattaca	tctgtgtt	gttttttgt	
caccctgaa	ttt	ttt	atgcgtt	tttgcattaca	tctgtgtt	gttttttgt	
gaagatggta	ttt	ttt	atgcgtt	tttgcattaca	tctgtgtt	gttttttgt	
tcacctggac	ttt	ttt	atgcgtt	tttgcattaca	tctgtgtt	gttttttgt	
cttggaccag	ttt	ttt	atgcgtt	tttgcattaca	tctgtgtt	gttttttgt	
agcagtgagg	ttt	ttt	atgcgtt	tttgcattaca	tctgtgtt	gttttttgt	
tcttaggctc	ttt	ttt	atgcgtt	tttgcattaca	tctgtgtt	gttttttgt	

tggcaaaacc	ctgaccatcc	aagtcaaaga	gtttggagat	gctggccagt	acacctgtca	1140
caaaggaggc	gaggttctaa	gccattcgct	cctgctgctt	cacaaaaagg	aagatggaat	1200
ttggtccact	gatattttaa	aggaccagaa	agaacccaaa	aataagacct	ttctaagatg	1260
cgaggccaag	aattattctg	gacgttcac	ctgctggtgg	ctgacgacaa	tcaagtactga	1320
tttgacattc	agtgtcaaaa	gcagcagagg	ctcttctgac	ccccaaagggg	tgacgtgcgg	1380
agctgctaca	ctctctgcag	agagagtcag	aggggacaac	aaggagtatg	agtactcagt	1440
ggagtgccag	gaggacagtg	cctgcccagc	tgctgaggag	agtctgccc	ttgaggtcat	1500
ggtggatgcc	gttcacaagc	tcaagtatga	aaactacacc	agcagttct	tcatcaggg	1560
catcatcaaa	cctgacccac	ccaagaactt	gcagctgaag	ccattaaaga	attctcgca	1620
ggtggaggtc	agctggagt	accctgacac	ctggagtaact	ccacattcct	acttctccct	1680
gacattctgc	gttcaggtcc	agggcaagag	caagagagaa	aagaaagata	gagtcttac	1740
ggacaagacc	tccacccacgg	tcatctgccc	caaaaatgcc	agcattagcg	tgcgggccc	1800
ggaccgctac	tatagctcat	cttggagcga	atggcatct	gtgcctgca	gttaggttg	1860
gcgagctcg	attcattgat	ccccccggct	gcaggaattc	gatatacg	tcgggatccg	1920
aattccgccc	cccccccccc	ccccccctta	acgttactgg	ccgaagccgc	ttggaataag	1980
gccggtgtgc	gtttgtctat	atgttatttt	ccaccatatt	gccgtcttt	ggcaatgtga	2040
gggccccgaa	acctggccct	gtcttctga	cgagcattcc	tagggtctt	tccctctcg	2100
ccaaaggaat	gcaaggtctg	ttgaatgtcg	tgaaggaagc	agttcctctg	gaagcttctt	2160
gaagacaaac	aacgtctgta	gcgaccctt	gcaggcagcg	gaacccccc	cctggcgaca	2220
ggtgcctctg	cggccaaaag	ccacgtgtat	aagatacacc	tgcaaaggcg	gcacaacccc	2280
agtgccacgt	tgtgagttgg	atagttgtgg	aaagagtcaa	atggctctcc	tcaagcgtat	2340
tcaacaaggg	gctgaaggat	gcccagaagg	tacccattg	tatggatct	gatctgggc	2400
ctcggtgtcac	atgcttaca	tgtgttagt	cgaggttaaa	aaaacgtcta	ggccccccga	2460
accacgggga	cgtggtttc	cttgaaaaaa	cacgatgata	atatggccac	aaccatgggt	2520
ccagcgcgca	gcctcctcct	tgtggctacc	ctggcctcc	tggaccacct	cagttggcc	2580
agaaacctcc	ccgtggccac	tccagaccca	ggaatgttcc	catgccttca	ccactccaa	2640
aacctgctga	gggcccgtcag	caacatgctc	cagaaggcca	gacaaactct	agaattttac	2700
cttgcactt	ctgaagagat	tgatcatgaa	gatatacaca	aagataaaac	cagcacagt	2760
gaggcctgtt	taccattgga	attaaccaag	aatgagagtt	gcctaaattc	cagagagacc	2820
tctttcataa	ctaattggag	ttgcctggcc	tccagaaaga	ccttttat	gatggccctg	2880
tgccttagta	gtatttatga	agacttgaag	atgtaccagg	tggagttcaa	gaccatgaat	2940
gcaaagcttc	tgtggatcc	taagaggcag	atctttctag	atcaaaacat	gctggcagtt	3000
attgatgagc	tgtgcaggc	cctgaatttc	aacagtgaga	ctgtgccaca	aaaatcctcc	3060
cttgaagaac	cggattttta	taaaactaaa	atcaagctct	gcatacttct	tcatgcttc	3120

agaattcggg cagtgactat tgatagagtg atgagctatc tgaatgcttc ctaacgtacg	3180
tcgacatcga gaacttgttt attgcagctt ataatggtta caaataaagc aatagcatca	3240
caaatttcac aaataaaagca ttttttcac tgcattctag ttgtggtttg tccaaactca	3300
tcaatgtatc ttatcatgtc tgggcgcgcc ggcctccgcg cgggttttgcgcctcccg	3360
cgggcgcgcc cctcctcactg gcgagcgctg ccacgtcaga cgaaggcgac agcgagcg	3420
ctgatccttc cgcccgacg ctcaggacag cgcccgctg ctcataagac tcggccttag	3480
aacccagta tcagcagaag gacatttttag gacgggactt gggtaactct agggcactgg	3540
ttttcttcc agagagcgga acaggcgagg aaaagtagtc cttctcgac gattctgcgg	3600
agggatctcc gtggggcggt gaacgcgcgat gattatataa ggacgcgcgc ggtgtggcac	3660
agctagttcc gtcgcagccg ggattttgggt cgcgggtctt gtttggat cgctgtgatc	3720
gtcacttggt gagtagcgccg ctgctggct gggtaactgc gctcgggtt ggcaactgtg	3780
ttttgtgaag ttttttaggc acctttgaa atgtaatcat ttgggtcaat atgtaattt	3840
cagtgttaga cttagaaatt gtccgcataa ttctggccgt tttggcttt tttgttagac	3900
gagctagcgc cgccaccatg ggccctaaaa agaagcgtaa agtcgcgcgc ccgaccgatg	3960
tcagcctggg ggacgagctc cacttagacg gcgaggacgt ggcaatggcg catgccgacg	4020
cgctagacga ttccgatctg gacatgttgg gggacggggta ttcccggtt ccggattta	4080
ccccccacga ctccgcgcgc tacggcgctc tggatatggc cgacttcgag tttgagcaga	4140
tgtttaccga tgcccttgaa attgacgagt acgggtggggta attcgagatg cctgtggaca	4200
ggatccttggaa ggcagagctt gctgtggaaac agaagagtga ccagggcggtt gagggtcctg	4260
ggggaaaccgg gggtagcgcc agcagccaa atgaccctgt gactaacatc tgtcaggcag	4320
ctgacaaaca gctattcactg cttgtttagt gggcgaagag gatccacac tttcctcct	4380
tgcctcttggaa tgatcaggcgc atattgctgc gggcaggctg gaatgaactc ctcattgcct	4440
ccttttcaca ccgatccatt gatgttcgag atggcatcct ctttgccaca ggtcttcacg	4500
tgcaccgcaa ctcagcccat tcagcaggag taggagccat ctttgatcgg gtgctgacag	4560
agctagtgatc caaaatgcgt gacatgagga tggacaagac agagcttggc tgcctgaggg	4620
caatcattct gtttaatcca gaggtgaggg gtttgaatc cgcccaaggaa gttgaacttc	4680
tacgtaaaa agtataatgcc gctttggaaatg aatataactag aacaacacat cccgatgaac	4740
caggaagatt tgcaaaaactt ttgcggcgc tgccttcttt acgttccata ggccttaagt	4800
gtttggagca tttgtttttc tttcgcccttta ttggagatgt tccaattgtat acgttccctga	4860
tggagatgt tgaatcactt tctgattcat aatctagcct agccccctc tccctcccc	4920
cccccttaacg ttactggccg aagccgcttgcg gaataaggcc ggtgtgcgtt tgtctatatg	4980
ttatatttcca ccatattgcc gtcggggc aatgtgaggg cccggaaacc tggccctgtc	5040
ttcttgacga gcattccttag gggtctttcc cctctcgcca aaggaatgca aggtctgttg	5100
aatgtcgtga aggaagcgtt tcctctggaa gcttcttgaa gacaaacaac gtctgtacg	5160

accctttgca ggcagcggaa ccccccacct ggcgacaggt gcctctgcgg caaaaagcca 5220
 cgtgtataag atacacacctc aaaggcggca caaccccagt gccacgttgt gagttggata 5280
 gttgtggaaa gagtcaaatg gctctcctca agcgtattca acaaggggct gaaggatgcc 5340
 cagaaggtac cccattgtat gggatctgat ctggggcctc ggtgcacatg ctttacatgt 5400
 gtttagtcga ggtaaaaaaaaa cgtctaggcc ccccgaacca cggggacgtg gtttcctt 5460
 gaaaaacacg atctctaggc gccaccatga agctactgtc ttctatcgaa caagcatgct 5520
 atatttgcg actaaaaaag ctcaagtgtc ccaaagaaaa accgaagtgc gccaagtgtc 5580
 tgaagaacaa ctgggagtgt cgctactctc cccaaaccaa aaggtctccg ctgacttaggg 5640
 cacatctgac agaagtggaa tcaaggctag aaagactgga acagctattt ctactgattt 5700
 ttcctcgaga agaccttgac atgatttga aaatggattt tttacaggat ataaaagcat 5760
 tgttaacagg attatttgcgta caagataatg tgaataaaga tgccgtcaca gatagattgg 5820
 cttcagtggaa gactgatatg cctctaatac tgagacagca tagaataagt ggcacatcat 5880
 catcggaga gagtagtaac aaaggtcaaa gacagttgac tgtatcgccg gaattcccg 5940
 ggtatccggcc tgagtgcgta gtacccgaga ctcagtgcgc catgaagcgg aaagagaaga 6000
 aagcacagaa ggagaaggac aaactgcctg tcagcacgac gacggtggac gaccacatgc 6060
 cgcccattat gcagtgtgaa cctccacctc ctgaaggcgc aaggattcac gaagtggtcc 6120
 caaggttct ctccgacaag ctgttggta caaacccggca gaaaaacatc ccccagttga 6180
 cagccaaacca gcagttcctt atcgccaggc tcatactggta ccaggacggg tacgagcgc 6240
 cttctgtatga agatttgcgta aggattacgc agacgtggca gcaagcggac gatgaaaacg 6300
 aagagtcgga cactcccttc cgccagatca cagagatgac tatcctcactg gtccaaactta 6360
 tcgtggagtt cgcaaggaa ttgccagggt tcgccaagat ctcgcagcct gatcaaattt 6420
 cgctgcttaa ggcttgctca agtgaggtaa tgatgctccg agtcgcgcga cgatacgatg 6480
 cggcctcaga cagtattctg ttgcgcaaca accaagcgtc cactcgac aactaccgca 6540
 aggctggcat ggccgaggc atcgaggatc tactgcactt ctgcccgtgc atgtactcta 6600
 tggcgttggaa caacatccat tacgcgtgc tcacggctgt cgtcatctt tctgaccggc 6660
 cagggttggaa gcagccgca ctgggtggaa agatccagcg gtactacctg aatacgctcc 6720
 gcatctatat cctgaaccag ctgagcgggt cggcgcgttc gtccgtcata tacggcaaga 6780
 tcctctcaat cctctctgag ctacgcacgc tcggcatgca aaactccaac atgtgcattt 6840
 ccctcaagct caagaacaga aagctgccgc ctttcctcga ggagatctgg gatgtggcgg 6900
 acatgtcgca caccgaaccg cccgcctatcc tcgagtcggc cacgaatctc taggcggcct 6960
 ctagagcggc cgccaccgcg gggagatcca gacatgataa gatacattga tgagtttggaa 7020
 caaaccacaa ctagaatgca gtaaaaaaaaa tgctttatgtt gtgaaatttg tgatgctatt 7080
 gctttatgtttaaaccattt aagctgcaat aaacaagtta acaacaacaa ttgcattcat 7140
 tttatgtttc aggttcaggg ggaggtgtgg gaggtttttt aaagcaagta aaacctctac 7200

aaatgtggta tggctgatta tgatccggct gcctcgcgcg tttcggtgat gacggtgaaa	7260
acctctgaca catcgagctc ccggagacgg tcacagctt tctgttaagcg gatgccggga	7320
gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg gtgttggcgg gtgtcggggc gcagccatga	7380
ggtcgactct agtccccgca gtggcagatc tggaagggtgc tgaggtacga tgagacccgc	7440
accaggtgca gaccctgcga gtgtggcggt aaacatatta ggaaccagcc tgtgatgctg	7500
gatgtgaccg aggagctgag gcccgatcac ttggtgctgg cctgcacccg cgctgagtt	7560
ggctctagcg atgaagatac agattgaggt actgaaatgt gtggcgtgg cttaagggtg	7620
ggaaagaata tataaggtgg gggcttatg tagtttgta tctgtttgc agcagccgcc	7680
gccgccccatga gcaccaactc gtttgcgttga agcattgtga gctcatattt gacaacgcgc	7740
atgccccat gggccggggt gcgtcagaat gtgatgggct ccagcattga tggtcgcccc	7800
gtcctgccccg caaactctac taccttgcacc tacgagaccg tgtctggAAC gccgttggag	7860
actgcagcct ccggccggc ttcagccgct gcagccaccg cccgcgggat tgtgactgac	7920
tttgcttcc tgagcccgct tgcaagcagt gcagcttccc gttcatccgc ccgcgatgac	7980
aagttgacgg ctctttggc acaattggat tctttgaccc gggaaactaa tgtcgtttct	8040
cagcagctgt tggatctgca ccagcagggt tctgccttgc aggcttcctc ccctcccaat	8100
gcggtttaaa acataaataa aaaaccagac tctgtttggta tttggatcaa gcaagtgtct	8160
tgctgtctt atttaggggt tttgcgcgcg cggtaggccc gggaccagcg gtctcggtcg	8220
ttgagggtcc tgtgtatTTT ttccaggacg tggtaaaggt gactctggat gttcagatac	8280
atgggcataa gcccgtctct ggggtggagg tagcaccact gcagagcttc atgctgcggg	8340
gtgggtttgt agatgatcca gtcgtacgag gagcgttggg cgtgggtcct aaaaatgtct	8400
ttcagtagca agctgattgc cagggcagg cccttgggtgt aagtgtttac aaagcggtta	8460
agctggatg ggtgcatacg tggggatatg agatgcacatct tggactgtat ttttaggttg	8520
gctatgttcc cagccatatac cctccgggaa ttcatgttgc gcagaaccac cagcacagtg	8580
tatccggtgc acttggaaa tttgtcatgt agcttagaag gaaatgcgtg gaagaacttg	8640
gagacgcctc tgtgacctcc aagattttcc atgcattcgt ccataatgtat ggcaatggc	8700
ccacggcgg cggcctggc gaagatattt ctgggatcac taacgtcata gttgtttcc	8760
aggatgagat cgtcataggc cattttaca aagcgcgggc ggagggtgcc agactgcgg	8820
ataatggttc catccggccc aggggcgttag ttaccctcac agattgcacat ttcccacgt	8880
ttgagttcag atggggggat catgtctacc tgcggggcga tgaagaaaac ggtttccggg	8940
gtagggaga tcagctggaa agaaagcagg ttcctgagca gctgcgtactt accgcagccg	9000
gtggggccgt aaatcacacc tattaccggc tgcaactgggt agttaagaga gctgcagctg	9060
ccgtcatccc tgacgcgggg ggccacttcg ttaagcatgt ccctgactcg catgtttcc	9120
ctgaccaaat ccgcccagaag gcgctcgccg cccagcgata gcagttcttgc caaggaagca	9180
aagttttca acgggtttag accgtccgccc gttaggcgttgc ttttaggttgatgc	9240

agttccaggc ggtcccacag ctcggtcacc tgctctacgg catctcgatc cagcatatct 9300
 cctcgttcg cgggttgggg cggcttcgc tgtacggcag tagtcggtgc tcgtccagac 9360
 gggccagggt catgtcttc cacggcgca gggcctcgt cagcgtagtc tgggtcacgg 9420
 tgaaggggtg cgctccgggc tgcgcgctgg ccagggtgcg cttgaggctg gtcctgctgg 9480
 tgctgaagcg ctgcccgtct tcgcccgtcg cgtcggccag gtagcatttgc accatggtgt 9540
 catagtccag cccctcccgcg gcgtggccct tggcgcgca gttgccttg gaggaggcgc 9600
 cgcacgaggg gcagtgcaga ctttgaggg cgtagagctt gggcgcgaga aataccgatt 9660
 ccggggagta ggcatcccgcg ccgcaggccc cgcagacggt ctcgcattcc acgagccagg 9720
 tgagctctgg ccgttcgggg tcaaaaacca gtttcccccc atgcttttg atgcgtttct 9780
 tacctcttgtt ttccatgagc cggtgtccac gctcggtgac gaaaaggctg tccgtgtccc 9840
 cgtatacaga cttgagaggc ctgtcccgca gcgggttcc gcggcctcc tcgtatagaa 9900
 actcggacca ctctgagaca aaggctcgca tccaggccag cacgaaggag gctaagtggg 9960
 agggtagcg gtcgttgcc actaggggtt ccactcgctc cagggtgtga agacacatgt 10020
 cgcctcttc ggcatcaagg aaggtgattt gttgttaggt gtaggccacg tgaccgggtg 10080
 ttccctgaagg gggctataa aagggggtgg gggcgcgttc gtcctcaactc tcttccgcat 10140
 cgctgtctgc gaggggccagc tgggggttg agtactccct ctgaaaagcg ggcatgactt 10200
 ctgcgctaag attgtcagtt tccaaaaacg aggaggattt gatattcacc tggcccgccg 10260
 ttagtgcctt gagggtggcc gcatccatct ggtcagaaaa gacaatctt ttgttgtcaa 10320
 gcttggtggc aaacgaccccg tagagggcgt tggacagcaa cttggcgatg gagcgcaggg 10380
 tttggttttt gtcgcgatcg gcgcgctcct tggccgcgt gtttagctgc acgtattcgc 10440
 gcgcacgcg cccgcattcg ggaaagacgg tggcgctc gcgggcacc aggtgcacgc 10500
 gccaaccgcg gttgtgcagg gtgacaaggt caacgctggt ggctacctct ccgcgttaggc 10560
 gctcggttgtt ccagcagagg cggccgcct tgcgcgagca gaatggcggt agggggtcta 10620
 gctgcgtctc gtccgggggg tctgcgtcca cggtaaagac cccgggcagc aggcgcgcgt 10680
 cgaagtagtc tatcttgcattt ctttgcattt ctgcgcctt ctgcgcgtt cggcgccaa 10740
 gcgcgcgttc gtatgggttg agtggggac cccatggcat ggggtgggtg agcgcggagg 10800
 cgtacatgcc gcaaattgtcg taaacgtaga gggctctctt ggttattcca agatatgtag 10860
 ggttagcatct tccaccgcgg atgctggcgc gcacgtatc gtatagttcg tgcgaggagg 10920
 cgaggaggtc gggaccgagg ttgctacggg cgggctgctc tgctcggaaag actatctgcc 10980
 tgaagatggc atgtgagttt gatgatatgg ttggacgctg gaagacgttg aagctggcgt 11040
 ctgtgagacc taccgcgtca cgcacgaagg aggcgttagga gtcgcgcagc ttgttgacca 11100
 gctcggcggtt gacctgcacg tctaggcgac agtagtccag gtttccctt atgatgtcat 11160
 actttatccctt tccctttttt ttccacagct cgcgggtttag gacaaactct tcgcggctt 11220
 tccagtagtc ttggatcgaa aaccgcgttgcgg cctccgaacg gtaagagcctt agcatgttaga 11280

actggttgac ggcctggtag gcgcagcatc cctttctac gggtagcgcg tatgcctgcg 11340
 cggccttccg gagcgaggtg tgggtgagcg caaagggtgtc cctgaccatg actttgaggt 11400
 actggtattt gaagtcagtg tcgtcgcatc cgcctgctc ccagagcaaa aagtccgtgc 11460
 gcttttggc acgcggattt ggcagggcga aggtgacatc gttgaagagt atcttcccg 11520
 cgcgaggcat aaagttgcgt gtgatgcgga agggtcccgg cacctcgaa cggttggtaa 11580
 ttacctggc ggcgagcacg atctcgtaa agccgttcat gttgtggccc acaatgtaaa 11640
 gttccaagaa gcgcggatg cccttcatgg aaggcaattt tttaagttcc tcgttaggtga 11700
 gctcttcagg ggagctgagc ccgtgctctg aaagggccca gtctgcaaga tgagggttgg 11760
 aagcgacgaa tgagctccac aggtcacggg ccattagcat ttgcaggtgg tcgcgaaagg 11820
 tcctaaactg gcgacctatg gccattttt ctgggtgtat gcagtagaag gtaagcgggt 11880
 cttgttccca gcggtcccat ccaaggttcg cgcttaggtc tcgcgcccga gtcactagag 11940
 gctcatctcc gccgaacttc atgaccagca tgaagggcac gagctgcttc ccaaaggccc 12000
 ccatccaagt ataggtctct acatcgtagg tgacaaagag acgctcggtg cgaggatgcg 12060
 agccgatcgg gaagaactgg atctccgccc accaatttggaa ggagtggcta ttgatgtgg 12120
 gaaagtagaa gtccctgcga cgggccgaac actcgtgctg gctttgtaa aaacgtgcgc 12180
 agtactggca gcgggtgcacg ggctgtacat cctgcacgag gttgacactga cgaccgcgc 12240
 caaggaagca gagtggaaat ttgagccctt cgcctggcgg gtttggctgg tggctttcta 12300
 cttcggctgc ttgtccttga ccgtctggct gctcgagggg agttacgggt gatcgacca 12360
 ccacgcccgcg cgagcccaa gtccagatgt ccgcgcgcgg cggtcggagc ttgatgacaa 12420
 catcgccgacg atgggagctg tccatggtct ggagctcccg cggcgtcagg tcaggcggga 12480
 gctcctgcag gtttacctcg catagacggg tcagggcgcg ggctagatcc aggtgataacc 12540
 taatttccag gggctggttg gtggcggcgt cgatggcttg caagaggccg catccccgcg 12600
 gcgcgactac ggtaccgcgc ggcggcggt gggccgcggg ggtgtccttg gatgatgcat 12660
 ctaaaagcgg tgacgcgggc gagccccgg aggtaggggg ggctccggac ccgcgggag 12720
 agggggcagg ggcacgtcgg cgccgcgcgc gggcaggagc tggtgctgcg cgcgttaggt 12780
 gctggcgaac gcgcacgcgc ggcgggtat ctcctgaatc tggcgcctct gcgtgaagac 12840
 gacggcccg gtgagcttga acctgaaaga gagttcgaca gaatcaattt cgggtgcgtt 12900
 gagccgcggcc tggcgaaaa tctcctgcac gtctcctgag ttgtcttcat aggcgatctc 12960
 ggccatgaac tgctcgatct cttcctcctg gagatctccg cgtccggctc gctccacgg 13020
 ggcggcgagg tcgttggaaa tgcggccat gagctgcgag aaggcgttga ggcctccctc 13080
 gttccagacg cggctgtaga ccacgcccc ttcggcatcg cgggcgcgc tgaccacctg 13140
 cgcgagattt agctccacgt gccggcgaa gacggcgtag tttcgcaggc gctgaaagag 13200
 gtagttgagg gtggtggcggt tttgttctgc cacgaagaag tacataaccc agcgtcgaa 13260
 cgtggattcg ttgtatccc ccaaggcctc aaggcgtcc atggcctcgta agaagtccac 13320

ggcgaagttg aaaaactggg agttgcgcgc cgacacgggt aactcctcct ccagaagacg 13380
 gatgagctcg ggcacagtgt cgccacaccc gctacagggg ccttcttc 13440
 ttcttcaatc tcctcttcca taagggcctc cccttcttct tcttctggcg gcgggtgggg 13500
 aggggggaca cggcggcgac gacggcgcac cgggaggcgg tcgacaaagc gtcgatcat 13560
 ctccccgcgg cgacggcgca tggtctcggt gacggcgcgg ccgttctgc gggggcgcag 13620
 ttggaagacg ccgcccgtca tgtcccggtt atgggttggc gggggctgc catgcggcag 13680
 ggatacggcg ctaacgatgc atctcaacaa ttgttgtta ggtactccgc cgccgaggga 13740
 cctgagcgag tccgcacatcgccgatcgaa aacacctctcg agaaaggcgt ctaaccagtc 13800
 acagtcgcaa ggtaggctga gcaccgtggc gggcggcagc gggcggcggt cggggttgtt 13860
 tctggcggag gtgctgctga ttagttaatt aaagttaggcg gtctttagac ggcggatggt 13920
 cgacagaagc accatgtcct tgggtccggc ctgctgaatg cgccaggcggt cggccatgcc 13980
 ccaggcttcg ttttgcacatc ggccgcaggc ttttgcacatc tcttgcacatc gcctttctac 14040
 cggcacttct tcttctcctt cctttgtcc tgcacatctt gcatctatcg ctgcggcg 14100
 ggcggagttt ggccgttaggt ggccgcctct tcctcccatg cgtgtgaccc cgaagccct 14160
 catcggctga agcagggcta ggtcggcgac aacgcgcctcg gctaataatgg cctgcgtc 14220
 ctgcgtgagg gtagacttgg agtcatccat gtccacaaag cggtggtatg cggccgtgtt 14280
 gatggtgtaa gtgcagttgg ccataacggc ccagttaaacg gtctggtgac cggcgtc 14340
 gagctcggtg tacctgagac gcgagtaagc cctcgagtca aatacgtatg ctttgcaagt 14400
 ccgcaccagg tactggtatac ccacaaaaaa gtgcggcgcc ggctggcggt agaggggcca 14460
 gcgttagggtg gccggggctc cggggcgag atcttccaac ataaggcgat gatatccgt 14520
 gatgtacctg gacatccagg ttagtgcggc ggccgtgggt gaggcgcgcg gaaagtcgc 14580
 gacgcggttc cagatgtgc gcagcggcaa aaagtgcctt atggcgggaa cgctctggcc 14640
 ggtcaggcgc gcgcaatcgt tgacgcctta gctgtcaaaa ggagagcctg taagcggca 14700
 ctcttcgtg gtctggtgaa taaattcgca agggtatcat ggccgacgcac cggggttcga 14760
 gccccgtatc cggccgtccg ccgtgatcca tgcggttacc gcccgcgtgt cgaacccagg 14820
 tgtgcacgt cagacaacgg gggagtgctc cttttggctt cttccaggc gcggcggctg 14880
 ctgcgttagc tttttggcc actggccgcg cgcacgtaa gcggtaggc tggaaagcga 14940
 aacattaaag tggctcgctc cctgttagccg gagggttatt ttccaagggt tgagtgcgg 15000
 gaccccccgt tcgagtctcg gaccggccgg actgcggcga acgggggtt gcctccccgt 15060
 catgcaagac cccgcttgca aattccctcg gaaacaggga cgagccctt ttttgccttt 15120
 cccagatgca tccgggtctg cggcagatgc gccccctcc tcagcagcgg caagagcaag 15180
 agcagcggca gacatgcagg gcacccctccc ctcctcttac cgcgtcagga gggggcgcac 15240
 cccgggttga cgcggcagca gatggtgatt acgaaccccc gcggcgcgg gcccggcact 15300
 acctggactt ggaggaggc gagggcctgg cgcggctagg agcgccctct cctgagcggc 15360

acccaagggt gcagctgaag cgtgatacgc gtgaggcgta cgtgccgcgg cagaacctgt 15420
 ttcgcgaccg cgagggagag gagcccgagg agatgcggga tcgaaagttc cacgcaggc 15480
 gcgagctcg gcatggcctg aatcgcgagc gttgctgcg cgaggaggac tttgagcccg 15540
 acgcgcgaac cgggattagt cccgcgcgcg cacacgtggc ggccgccgac ctggtaaccg 15600
 catacgagca gacggtgaac caggagatta actttcaaaa aagcttaac aaccacgtgc 15660
 gtacgcttgt ggcgcgcgag gaggtggcta taggactgat gcatctgtgg gactttgtaa 15720
 gcgcgctgga gcaaaaccca aatagcaagc cgctcatggc gcagctgttc cttatagtgc 15780
 agcacagcag ggacaacgag gcattcaggg atgcgctgct aaacatagta gagcccgagg 15840
 gccgctggct gctcgatttg ataaacatcc tgcaagagcat agtggtgcag gagcgcagct 15900
 tgagcctggc tgacaagggt gccgccatca actattccat gcttagcctg ggcaagttt 15960
 acgcccgc当地 gatataccat accccttacg ttcccataga caaggaggt aagatcgagg 16020
 gtttctacat ggcgcattgc ctgaagggtc ttacctttag cgacgacctg ggcgtttatc 16080
 gcaacgagcg catccacaag gccgtgagcg ttagccggcg ggcgcagctc agcgcaccgc 16140
 agctgatgca cagcctgcaa agggccctgg ctggcacggg cagcggcgat agagaggccg 16200
 agtcctactt tgacgcgggc gctgacctgc gctggggcccc aagccgacgc gcccctggagg 16260
 cagctggggc cggacctggg ctggcgggtgg cacccgcgcg cgctggcaac gtcggcggcg 16320
 tggaggaata tgacgaggac gatgagttacg agccagagga cggcgagtac taagcgggtga 16380
 tggggatc cagatgatgc aagacgcaac ggacccggcg gtgcgggcgg cgctgcagag 16440
 ccagccgtcc ggccttaact ccacggacga ctggcgccag gtcatggacc gcatcatgtc 16500
 gctgactgcg cgcaatcctg acgcgttccg gcagcagccg caggccaacc ggctctccgc 16560
 aattctggaa gcgggtgtcc cggcgccgcg aaaccccacg cacgagaagg tgctggcgat 16620
 cgtaaacgcg ctggccgaaa acagggccat cccggccgcg gaggccggcc tggtctacga 16680
 cgcgcgtctt cagcgcgtgg ctcgttacaa cagcggcaac gtgcagacca acctggaccg 16740
 gctgggtgggg gatgtgcgcg aggccgtggc gcagcgttag cgccgcgcg agcaggccaa 16800
 cctggctcc atggttgcac taaacgcctt cctgagtaca cagccgc当地 acgtgccgcg 16860
 gggacaggag gactacacca actttgttag cgcaactgc当地 ctaatgtga ctgagacacc 16920
 gcaaagttagt gtgtaccagt ctggccaga ctattttc cagaccatgta gacaaggcct 16980
 gcagaccgtta aacctgagcc aggcttcaa aaacttgcag gggctgtggg ggggtgcgggc 17040
 tcccacaggc gaccgcgc当地 ccgtgtcttag cttgctgacg cccaaactcgc gcctgttgct 17100
 gctgctaata gcgccttca cggacagtgg cagcgtgtcc cgggacacat accttaggtca 17160
 cttgctgaca ctgtaccgcg aggccatagg tcaggcgcat gtggacgagc atactttcca 17220
 ggagattaca agtgtcagcc gcgcgc当地 ggagggaggac acgggc当地 tggaggccaa 17280
 cctaaactac ctgctgacca accggccggca gaagatcccc tcgttgcaca gtttaaacag 17340
 cgaggaggag cgcatggc gctacgtgca gcagagcgtag agccttaacc tgatgcgc当地 17400

cggggtaacg cccagcgtgg cgctggacat gaccgcgcg aacatggaac cgggcatgta 17460
 tgcctcaaac cggccgttta tcaaccgcct aatggactac ttgcatcgcg cggccgcccgt 17520
 gaaccccgag tatttcacca atgccatctt gaacccgcac tggctaccgc cccctggtt 17580
 ctacaccggg ggattcgagg tgcccggaggg taacgatgga ttcctctggg acgacataga 17640
 cgacagcgtg tttccccgc aaccgcagac cctgctagag ttgcaacagc gcgagcaggc 17700
 agaggcggcg ctgcgaaagg aaagcttccg caggccaagc agcttgtccg atctaggcgc 17760
 tgcggccccg cggtcagatg ctagtagccc atttccaagc ttgatagggt ctcttaccag 17820
 cactcgacc acccgccccgc gcctgctggg cgaggaggag tacctaaaca actcgctgct 17880
 gcagccgcag cgcaaaaaaa acctgcctcc ggcatttccc aacaacggga tagagagcct 17940
 agtggacaag atgagtagat ggaagacgta cgcgcaggag cacaggacg tgccaggccc 18000
 gcgccgccc acccgtcgtc aaaggcacga ccgtcagcgg ggtctgggtgt gggaggacga 18060
 tgactcggca gacgacagca gcgtcctgga tttgggaggg agtggcaacc cgtttgcgca 18120
 cttcgcccc aggtgggaa gaatgttta aaaaaaaaaa aagcatgatg caaaataaaa 18180
 aactcaccaa ggccatggca ccgagcgttg gtttcttgc attccctta gtatgcggcg 18240
 cgccggcgatg tatgaggaag gtcctcctcc ctcttacgag agtgtggta ggcggcgcc 18300
 agtggcggcg ggcgtgggtt ctcccttcga tgctccctg gacccgcccgt ttgtgcctcc 18360
 gcggtacctg cggcctaccg gggggagaaa cagcatccgt tactctgagt tggcacccct 18420
 attcgacacc acccggtgt acctgggtaa caacaagtca acggatgtgg catccctgaa 18480
 ctaccagaac gaccacagca actttctgac cacggtcatt caaaacaatg actacagccc 18540
 gggggaggca agcacacaga ccatcaatct tgacgaccgg tcgcactggg gcccgcacct 18600
 gaaaaccatc ctgcatacca acatgccaaa tgtgaacgag ttcatgttta ccaataagtt 18660
 taaggcgcgg gtgatgggtgt cgcgcttgcc tactaaggac aatcaggtgg agctgaaata 18720
 cgagtgggtg gagttcacgc tgcccggaggg caactactcc gagaccatga ccatagacct 18780
 tatgaacaac gcgatcgtgg agcactactt gaaagtgggc agacagaacg gggttctgga 18840
 aagcgacatc gggtaaaat ttgacaccccg caacttcaga ctggggtttgc accccgtcac 18900
 tggctttgtc atgcctgggg tatataaaaa cgaagccttc catccagaca tcattttgtc 18960
 gccaggatgc ggggtggact tcacccacag ccgcctgagc aacttgggg gcatccgcaa 19020
 gcggcaaccc ttccaggagg gctttaggat cacctacgat gatctggagg gtggtaacat 19080
 tcccgactg ttggatgtgg acgcctacca ggcgagcttgc aaagatgaca ccgaacaggg 19140
 cgggggtggc gcaggcggca gcaacagcag tggcagcggc gcggaaagaga actccaacgc 19200
 ggcagccgcg gcaatgcagc cggtggagga catgaacgat catgccattc gcggcgacac 19260
 ctttgccaca cgggctgagg agaagcgcgc tgaggccgaa gcagcggccg aagctgcccgc 19320
 ccccgctgcg caaccccgagg tcgagaagcc tcagaagaaa ccggtgatca aaccctgac 19380
 agaggacagc aagaaacgca gttacaacct aataagcaat gacagcacct tcacccagta 19440

ccgcagctgg taccttgcataacaactacgg cgaccctcag accggaatcc gctcatggac 19500
 cctgcttgc actcctgacg taacctgcgg ctcggagcag gtctactggt cgttgccaga 19560
 catgatgcaa gaccccgta cttccgctc cacgcgccag atcagcaact ttccgggtgt 19620
 gggcgccgag ctgttgcgg tgcaactccaa gagttctac aacgaccagg cctgtactc 19680
 ccaactcatc cgccagttta cctctctgac ccacgtttc aatcgcttc ccgagaacca 19740
 gattttggcg cgcccgccag ccccccacat caccaccgtc agtaaaaacg ttccctgctct 19800
 cacagatcac gggacgctac cgctgcgcaa cagcatcgga ggagtccagc gagtgaccat 19860
 tactgacgcc agacgcccga cctgccccta cgtttacaag gcccctggca tagtctcgcc 19920
 gcgcgtccta tcgagccgca ctttttggc aagcatgtcc atccttatat cgcccgacaa 19980
 taacacaggc tggggcctgc gtttccaaag caagatgttt ggcggggcca agaagcgctc 20040
 cgaccaacac ccagtgcgcg tgcgccggca ctaccgcgcg ccctggggcg cgccacaaacg 20100
 cggccgcact gggcgccacca ccgtcgatga cgccatcgac gcgggtggtgg aggaggcg 20160
 caactacacg cccacgcccgc caccagtgtc cacagtggac gcggccattc agaccgtgt 20220
 gcgcggagcc cggcgctatg ctaaaatgaa gagacggcgg aggcgcttag cacgtcgcca 20280
 cccgcgcga cccggcactg ccgcccacg cgccggccgg gcccctgctta accgcgcacg 20340
 tcgcaccggc cgacgggcgg ccatgcgggc cgctcgaaagg ctggccgcgg gtattgtcac 20400
 tgtgcccccc aggtccaggc gacgagccgc cgccgcagca gccgcggcca tttagtgcata 20460
 gactcagggt cgcaaggca acgtgtattt ggtgcgcgac tcggtagcg gcctgcgcgt 20520
 gcccgtgcgc acccgcccccc cgcgcaacta gattgcaaga aaaaactact tagactcgta 20580
 ctgttgtatg tatccagcgg cggccggcgca caacgaagct atgtccaagc gcaaaatcaa 20640
 agaagagatg ctccaggta tcgcgcgggaa gatctatggc ccccgaaaga aggaagagca 20700
 ggattacaag ccccgaaagc taaagcggt caaaaagaaa aagaaagatg atgatgatga 20760
 acttgacgac gaggtggaaac tgctgcacgc taccgcgcgg aggacgacggg tacagtggaa 20820
 aggtcgacgc gtaaaacgtg ttttgcacc cggcaccacc gtagtcttta cgcccggtga 20880
 gcgctccacc cgccacccata agcgctgtta ttagtggatg tacggcgacg aggacctgct 20940
 tgagcaggcc aacgagccgc tcggggagtt tgccctacgg aagcggcata aggacatgct 21000
 ggcgttgcgc ctggacgagg gcaacccaaac acctagccta aagcccgtaa cactgcagca 21060
 ggtgctgcgc ggcgttgcac cgtccgaaga aaagcgccgc ctaaagcgcg agtctggta 21120
 cttggcaccc accgtgcacgc ttagtggatc caagcgccag cgactggaaag atgtcttgg 21180
 aaaaatgacc gtggAACCTG ggctggagcc cgagggtccgc gtgcggccaa tcaaggcagg 21240
 ggcgcgggaa ctggcggtgc agaccgtgga cgttcagata cccactacca gtagcaccag 21300
 tattgcccacc gccacagagg gcatggagac acaaacgtcc cccgttgcct cagcggtggc 21360
 ggatgcccgc gtgcaggcgg tcgctgcggc cgcgccaaag acctctacgg aggtgcaaac 21420
 ggacccgtgg atgtttcgcg tttcagcccc cccgcggcccg cgccgttcga ggaagtacgg 21480

cgccgccagc gcgctactgc ccgaatatgc cctacatcct tccattgcgc ctaccccccgg 21540
 ctatgtggc tacacctacc gccccagaag acgagcaact acccgacgcc gaaccaccac 21600
 tggAACCCGC cgccgccgtc gccgtcgcca gcccgtgctg gccccgattt ccgtgcgcag 21660
 ggtggctcgc gaaggaggca ggaccctggt gctgccaaca gcgcgttacc accccagcat 21720
 cgtttaaaag ccggtctttg tggttcttgc agatatggcc ctcacccgtcc gcctccgtt 21780
 cccgggtgccg ggattccgag gaagaatgca ccgttaggagg ggcattggccg gccacggcct 21840
 gacgggcggc atgcgtcggt cgaccacccg gcggcggcgc gcgtgcacc gtcgcattgcg 21900
 cggcggtatc ctgccccctcc ttattccact gatcgccgcg gcatgtggcg ccgtgcccgg 21960
 aattgcattcc gtggccttgc aggcgacag acaactgatta aaaacaagtt gcatgtggaa 22020
 aaatcaaaat aaaaagtctg gactctcact ctcgttggt cctgttaacta tttttagaa 22080
 tggaaagacat caactttgcg tctctggccc cgacacacgg ctcgcgcgg ttcattggaa 22140
 actggcaaga tatcgccacc agcaatatga gcggtggcgc cttcagctgg ggctcgctgt 22200
 ggagcggcat taaaaatttc ggttccacccg ttaagaacta tggcagcaag gcctggaaaca 22260
 gcagcacagg ccagatgctg agggataagt taaaagagca aaatttccaa caaaagggtgg 22320
 tagatggcct ggccctctggc attagcgggg tgggtggaccc gccaaccagg gcagtgc当地 22380
 ataagattaa cagtaagctt gatccccggcc ctcccgtaga ggacccctcca ccggccgtgg 22440
 agacagtgtc tccagagggg cgtggcggaa agcgtccgcg cccgcacagg gaagaaaactc 22500
 tggtgacgca aatagacgag ctccttcgt acgaggaggc actaaagcaa ggctgc当地 22560
 ccacccgtcc catcgccccc atggctaccg gagtgttggg ccagcacaca cccgttaacgc 22620
 tggacctgccc tccccccggcc gacacccaggc agaaacctgt gctgccaggc ccgaccggccg 22680
 ttgttgtaac ccgtccttagc cgccgtccc tgccgtccgcg cgccagcggt ccgtgatcgt 22740
 tgcggccgt agccagtggc aactggcaaa gcacactgaa cagcatcggt ggtctggggg 22800
 tgcaatccct gaagcgccga cgatgcttct gatagctaact gtgtgtatg tgtgtcatgt 22860
 atgcgtccat gtcggcccca gaggagctgc tgagccggcc cgcccccgtt ttccaaagatg 22920
 gctacccctt cgatgtatgcc gcagtggct tacatgcaca tctcggggccca ggacgcctcg 22980
 gagtacctga gccccggct ggtcagttt gcccggccca ccgagacgta cttcagcctg 23040
 aataacaagt ttagaaaccc cacggtggcg cctacgcacg acgtgaccac agacccggtcc 23100
 cagcgtttga cgctcggtt catccctgtg gaccgtgagg atactgcgtta ctcgtacaag 23160
 gcgccgttca ccctagctgt ggggtataac cgtgtgttgg acatggcttc cacgtacttt 23220
 gacatcccgcg gcgtgttggc cagggggccct acttttaagc cctactctgg cactgcctac 23280
 aacgccttgg ctccccaaagg tgccccaaat ctttgcgtat gggatgttggc tgctactgt 23340
 cttgaaataa acctagaaga agaggacgt gacaacgaag acgaagttaga cgagcaagct 23400
 gagcagcaaa aaactcacgt atttggcgtt ggccttatt ctggatataaa tattacaaag 23460
 gagggtattc aaatagggtgt cgaaggtaaa acacctaaat atgcccataa aacatttcaa 23520

cctgaacctc aaataggaga atctcagtgg tacgaaacag aaattaatca tgcagctggg 23580
 agagtcctaa aaaagactac cccaatgaaa ccatgttacg gttcatatgc aaaacccaca 23640
 aatgaaaatg gagggcaagg cattcttgc aagcaacaaa atggaaagct agaaagtcaa 23700
 gtggaaatgc aattttctc aactactgag gcagccgcag gcaatggtga taacttgact 23760
 cctaaagtgg tattgtacag tgaagatgta gatatagaaa ccccagacac tcataattct 23820
 tacatgccc ctattaagga aggttaactca cgagaactaa tgggccaaca atctatgccc 23880
 aacaggccta attacattgc ttttagggac aattttatttgc gtaatgta ttacaacagc 23940
 acgggtaata tgggtttctt ggcgggccaa gcatcgagt tgaatgctgt ttagattttg 24000
 caagacagaa acacagagct ttcataccag ctttgcttgc attccattgg tgatagaacc 24060
 aggtactttt ctatgtggaa tcaggctgtt gacagctatg atccagatgt tagaatttt 24120
 gaaaatcatg gaactgaaga tgaacttcca aattactgct ttccactggg aggtgtgatt 24180
 aatacagaga ctcttaccaa ggtaaaacct aaaacaggc aggaaaatgg atggaaaaaa 24240
 gatgctacag aattttcaga taaaaatgaa ataagagttt gaaataattt tgccatggaa 24300
 atcaatctaa atgccaacct gtggagaaat ttccctgtact ccaacatagc gctgtatttgc 24360
 cccgacaagc taaagtacag tccttccaac gtaaaaaattt ctgataaccc aaacacctac 24420
 gactacatga acaagcgagt ggtggctccc gggctagtgg actgctacat taaccttgg 24480
 gcacgctggc cccttacta tatggacaac gtcaacccat ttaaccacca cgcacatgct 24540
 ggcctgcgtt accgctcaat gttgctggc aatggtcgtt atgtgcctt ccacatccag 24600
 gtgcctcaga agttcttgc cattaaaaac ctccctctcc tgccggctc atacacctac 24660
 gagtttgcact tcaggaagga ttttaacatg gttctgcaga gctccctagg aatgaccta 24720
 agggtttgcact gagccagcat taagtttgcact agcatttgc tttacgcccac cttcttcccc 24780
 atggcccaca acaccgcctc cacgcttgcact gccatgctt gaaacgacac caacgaccag 24840
 tcctttaacg actatctctc cgccgccaac atgctctacc ctataccgc caacgctacc 24900
 aacgtgcccata tatccatccc ctcccgcaac tggcgccctt tccgcccgtt ggccttcacg 24960
 cgccttaaga ctaaggaaac cccatcaactg ggctcggcgtt acgacccttta ttacacctac 25020
 tctggctcta taccctacca agatggaaacc ttttacctca accacacccat taagaagggt 25080
 gccattacca ttgactcttc ttttcgttgc cctggcaatg accgcctgtt tacccttccac 25140
 gagtttggaaa ttaagcgctc agttgacggg gagggttaca acgttgccttca gtgttaacatg 25200
 accaaagact ggttcctggc acaaatgcta gctaactata acattggcta ccagggttc 25260
 tataatccacg agagctacaa ggaccgcacg tactccttctt ttagaaactt ccagcccatg 25320
 agccgtcagg tgggtggatga tactaaatac aaggactacc aacaggtggg catcctacac 25380
 caacacaaca actctggatt ttttcgttgc cttggcccttca ccatgcgcga aggacaggcc 25440
 taccctgcta acttccctta tccgcttata ggcaagacccg cagttgacag cattacccat 25500
 aaaaagtttc tttgcgttgc cacccttgg cgcacccat tctccagtaa ctttatgtcc 25560

atgggcgcac tcacagaccc gggccaaaac cttctctacg ccaactccgc ccacgcgcta 25620
 gacatgactt ttgaggtgga tcccatggac gagcccaccc ttctttatgt tttgtttgaa 25680
 gtcttgacg tggccgtgt gcaccagccg caccgcggcg tcatgaaac cgtgtacctg 25740
 cgcacgcctc tctcggccgg caacgcccaca acataaagaa gcaagcaaca tcaacaacag 25800
 ctgccgcctat gggctccagt gagcaggaac taaaagccat tgtcaaagat cttggttgtg 25860
 ggccatattt tttggcacc tatgacaagc gcttccagg ctttgttct ccacacaagc 25920
 tcgcctgcgc catagtcaat acggccggtc gcgagactgg gggcgtacac tggatggcct 25980
 ttgcctggaa cccgcactca aaaacatgct acctcttga gcccttggc ttttctgacc 26040
 agcgactcaa gcaggtttac cagttgagt acgagtcact cctgcgccgt agcgccattg 26100
 cttcttcccc cgaccgctgt ataacgctgg aaaagtccac ccaaagcgta caggggccc 26160
 actcggccgc ctgtggacta ttctgctgca tggcttccca cgccttgc aactggcccc 26220
 aaactcccat ggatcacaac cccaccatga accttattac cgggttaccc aactccatgc 26280
 tcaacagtcc ccaggtacag cccaccctgc gtcgcaacca ggaacagctc tacagcttcc 26340
 tggagcgcca ctcgcctac ttccgcagcc acagtgcgca gattaggagc gccacttctt 26400
 tttgtcactt gaaaaacatg taaaaataat gtactagaga cacttcaat aaaggcaat 26460
 gcttttattt gtacactctc gggtgattat ttacccac cttgcgcgtc tgccgcgtt 26520
 aaaaatcaaa ggggttctgc cgcgcatcgc tatgcgccac tggcagggac acgttgcgt 26580
 actgggtttt agtgcctccac taaaactcag gcacaaccat ccgcggcagc tcggtaagt 26640
 tttcactcca caggctgcgc accatcacca acgcgtttag caggtcggc gccgatatct 26700
 tgaagtgcga gttggggcct ccgcctgcg cgccgcgtt gcgatacaca gggttgcagc 26760
 actggaacac tatcagcgcc gggtggtgca cgctggccag cacgctcttgc tcggagatca 26820
 gatccgcgtc caggctctcc gcgttgctca gggcgaacgg agtcaactt ggtagctgcc 26880
 ttcccaaaaa gggcgcgtgc ccaggcttgc agttgcactc gcaccgtgt ggcataaaaa 26940
 ggtgaccgtg cccggcttgg gcgttaggat acagcgcctg cataaaagcc ttgatctgct 27000
 taaaagccac ctgagccttgc gcgccttcag agaagaacat gccgcaagac ttgcccggaaa 27060
 actgattggc cggacaggcc gcgtcgtgca cgcagcaccc tgcgtcgggtt ttggagatct 27120
 gcaccacatt tcggccccac cggttcttca cgatcttggc cttgcttagac tgctccttca 27180
 gcgcgcgtc cccgtttcg ctcgtcacat ccatttcaat cacgtcgtcc ttatattatca 27240
 taatgcttcc gtgtagacac ttaagctcgc ctgcgttgc agcgcagcgg tgcagccaca 27300
 acgcgcagcc cgtgggtcg tgcgttgc aggtcaccc tgcgttgc tgcaggtacg 27360
 cctgcaggaa tcggccatc atcgtcacaa aggtcttgc gctggtaag gtcagctgca 27420
 accccgggtg ctccctgttc agccaggtct tgcatacggc cgccagagct tccacttgg 27480
 caggcagtag tttgaagttc gcctttagat cgttatccac gtggtaacttgc tccatcagcg 27540
 cgcgccgcgc ctcctatgcggcc ttctccacg cagacacgtt cggcacactc agcgggttca 27600

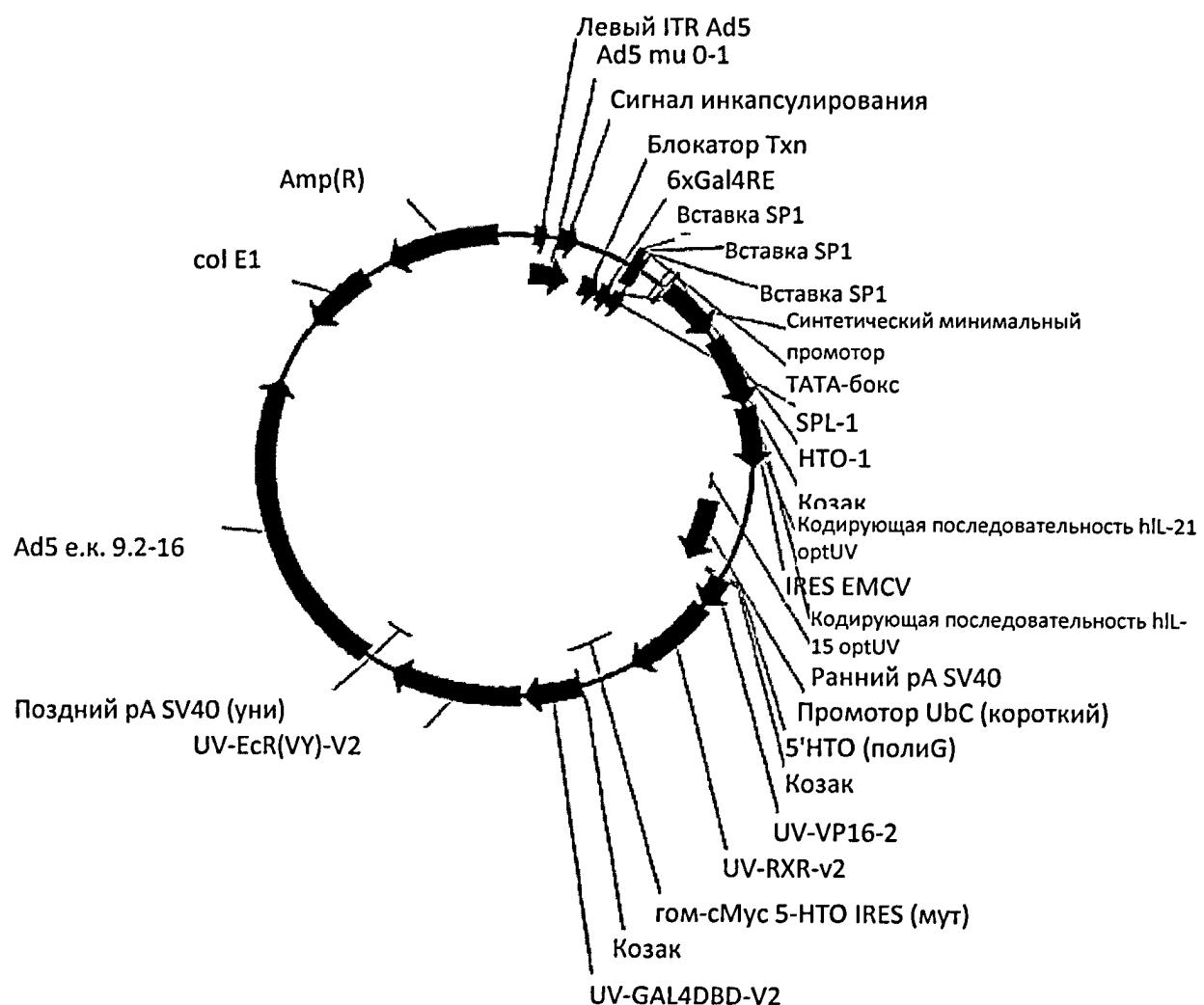
tcaccgtaat ttcactttcc	gcttcgctgg	gctcttcctc	ttcctcttgc	gtccgcatac	27660
cacgcgccac tgggtcgctc	tcattcagcc	gccgcactgt	gcgcttacct	cctttgccc	27720
gcttattttt caccgggtgg	ttgctgaaac	ccaccattt	taggcacaca	tcttcctt	27780
tttcctcgct	gtccacgatt	acctctggtg	atggcggcg	ctcgggctt	27840
gcttctttt cttcttggc	gcaatggcca	aatccgcgc	cgaggtcgat	ggccgcggc	27900
tgggtgtgcg	cggcaccagc	gcgtctgt	atgagtcttc	ctcgtcctcg	27960
gccgcctcat	ccgc	gggggcgc	ggggaggcgg	cggcacggg	28020
acacgtcctc	catggttgg	ggacgtcg	ccgcacccgc	tccgcgtcg	28080
cgcgctgctc	ctcttcccga	ctggccattt	ccttctccta	taggcagaaa	28140
agtcagtcga	gaagaaggac	agcctaaccg	ccccctctga	gttcgccacc	28200
ccgatgcgc	caacgcgc	accaccc	ccgtcgaggc	acccccc	28260
aagtgattat	cgagcaggac	ccaggtttt	taagcgaaga	cgacgaggac	28320
caacagagga	taaaaagcaa	gaccaggaca	acgcagaggc	aaacgaggaa	28380
ggggggacga	aaggcatggc	gactaccc	atgtggaga	cgacgtgctg	28440
tgcagcgcca	gtgcgc	cattt	atctgcacg	cggtcaaga	28500
ccatagcgga	tgtcagc	ttt	gcctacgaac	gccacctatt	28560
aacgccaaga	aaacggcaca	tgcgagcc	acccgcgc	caacttctac	28620
ccgtgcccaga	ggtgcttgc	acccatcaca	tcttttcc	aaactgcaag	28680
cctgcccgtc	caaccgc	cgagcggaca	agcagctggc	cttgcggcag	28740
tacctgat	cgc	ccgc	tttgcacg	ggcgcgtgtc	28800
agaagcgcgc	ggcaa	acgc	tttgcacg	tttgcacg	28860
tgttggtgg	actcgagg	gtacaacgc	gcctagcc	actaaacgc	28920
tcacccactt	tgc	cttaccc	gcacttaacc	tacccccc	28980
gtgagctgat	cgtgcgc	ccgt	gcgcagcccc	tggagagg	29040
cagaggaggg	cctaccc	gttggc	gacg	tgcaaaattt	29100
agcctgcga	cttggagg	gacg	caac	caagaacaaa	29160
agcttgat	catgc	tttgc	ccgc	tttgcacg	29220
cattgcacta	cac	tttgc	tttgc	tttgcacg	29280
agctctgcaa	cctgg	tttgc	tttgc	tttgcacg	29340
tgcttcattc	cac	tttgc	tttgc	tttgcacg	29400
tatttctatg	ctacac	tttgc	tttgc	tttgcacg	29460
gcaacctcaa	ggag	tttgc	tttgc	tttgcacg	29520
tcaacgagcg	ctcc	tttgc	tttgc	tttgcacg	29580
aaaccctgca	acagg	tttgc	tttgc	tttgcacg	29640

actttatcct	agagcgctca	ggaatcttgc	ccgccacctg	ctgtgcactt	cctagcgact	29700
ttgtccccat	taagtaccgc	aatgccttc	cgccgctttg	gggccactgc	taccttctgc	29760
agctagccaa	ctaccttgcc	taccactctg	acataatgga	agacgtgagc	gtgtacggtc	29820
tactggagtg	tcactgtcgc	tgcaacctat	gcaccccgca	ccgctccctg	gtttgcaatt	29880
cgcagctgct	taacgaaagt	caaattatcg	gtaccttga	gctgcagggt	ccctcgccctg	29940
acgaaaagtc	cgcggctccg	gggttcaaac	tcactccggg	gctgtggacg	tcggcttacc	30000
ttcgcaaatt	tgtacctgag	gactaccacg	cccacgagat	taggttctac	gaagaccaat	30060
cccgcccccc	taatgcggag	cttaccgcct	gcgtcattac	ccagggccac	attcttggcc	30120
aattgcaagc	catcaacaaa	gcccgc当地	agtttctgct	acgaaaggga	cgggggggtt	30180
acttggaccc	ccagtc当地	gaggagctca	acccaatccc	cccgcc当地	cagccctatc	30240
agcagcagcc	gcgggccc当地	gcttccc当地	atggcaccca	aaaagaagct	gcagctgccc	30300
ccgccc当地	cgacgagga	ggaatactgg	gacagtcagg	cagaggaggt	tttggacgag	30360
gaggaggagg	acatgatgga	agactgggag	agcctagacg	aggaagcttc	cgaggtcgaa	30420
gaggtgtcag	acgaaacacc	gtcaccctcg	gtcgcattcc	cctcgcc当地	gccccagaaa	30480
tcggcaaccg	gttccagcat	ggctacaacc	tccgctc当地	aggcgcc当地	ggcactgccc	30540
gttcgccc当地	ccaaccgtag	atgggacacc	actggAACCA	gggccc当地	gtccaagcag	30600
ccgccc当地	tagcccaaga	gcaacaacag	cgccaaggct	accgctcatg	gcgc当地	30660
aagaacgcca	tagttgctt	cttgc当地	tgtggggca	acatctc当地	cgccc当地	30720
tttcttctct	accatcacgg	cgtggc当地	ccccgttaaca	tcctgc当地	ctaccgtcat	30780
ctctacagcc	catactgcac	cggc当地	ggcagcaaca	gcagc当地	cacagaagca	30840
aaggcgaccg	gatagcaaga	ctctgacaaa	gcccaagaaa	tccacagc当地	cggc当地	30900
aggaggagga	gc当地	tggc当地	cgaacccgta	tc当地	agcttagaaa	30960
caggattttt	cccactctgt	atgctatatt	tcaacagagc	agggcc当地	aacaagagct	31020
gaaaataaaa	aacaggtctc	tgcgatccct	cacccgc当地	tgc当地	acaaaagcga	31080
agatcagctt	cggc当地	tggaagacgc	ggaggctctc	ttc当地	actgc当地	31140
gactcttaag	gactagttc	gc当地	tcaaattt当地	gc当地	tacgtcatct	31200
ccagcggcca	cacccggc当地	cagcacctgt	tgc当地	attatgagca	aggaaattcc	31260
cacgc当地	atgtggagtt	accagccaca	aatgggactt	gc当地	ctgccc当地	31320
ctactcaacc	c当地	acatgagc当地	gggacccc当地	atgatatccc	gggtcaacgg	31380
aatacgc当地	caccgaaacc	gaattctc当地	ggaacaggcg	gctattacca	ccacacctcg	31440
taataacctt	aatccccgt	gttggccc当地	tgccctgggt	taccaggaaa	gtccc当地	31500
caccactgt	gtacttccca	gagacgccc当地	ggccgaagtt	cagatgacta	actcaggggc	31560
gcagcttgc当地	ggc当地	gtc当地	gagggt	gccc当地	ggc当地	31620
gacaatcaga	ggcgaggt	ttc当地	cgacgagtc当地	gtgagctc当地	cgcttggt当地	31680

ccgtccggac gggacatttc agatcggcgg cgccggccgc tcttcattca cgcctcgta 31740
 ggcaatccta actctgcaga cctcgtcctc tgagccgcgc tctggaggca ttggaaactct 31800
 gcaatttatt gaggagtttg tgccatcggt ctactttaac cccttctcg gacctcccg 31860
 ccactatccg gatcaattta ttccctaactt tgacgcggta aaggactcg cgacggcta 31920
 cgactgaatg ttaagtggag aggcagagca actgcgcctg aaacacctgg tccactgtcg 31980
 ccgccacaag tgcttgccc gcgactccgg tagtggatc tactttgaat tgcccggagga 32040
 tcatatcgag ggcccggcgc acggcgtccg gcttaccgccc cagggagagc ttgcccgtag 32100
 cctgattcgg gagtttaccc agcgccccct gctagtttag cggacaggg gaccctgtgt 32160
 tctcactgtg atttgcact gtcctaaccct tggttacat caagatctta ttccctttaa 32220
 ctaataaaaaaaa aaaataataa agcatcaattt actttaaaatc agtttagcaaa tttctgtcca 32280
 gtttattcag cagcacctcc ttgcccctcc cccagctctg gtattgcagc ttccctcctgg 32340
 ctgcaaactt tctccacaat ctaaatggaa tgtcagttt ctcctgttcc tgtccatccg 32400
 caccactat cttcatgttg ttgcagatga agcgcgcag accgtctgaa gataccttca 32460
 accccgtgta tccatatgac acggaaaccg gtcctccaac tgtgccttt cttactcctc 32520
 cctttgtatc ccccaatggg tttcaagaga gtccttgg ggtactctt ttgcgcctat 32580
 ccgaacctct agttacctcc aatggcatgc ttgcgtcaa aatggcaac ggcctctctc 32640
 tggacgaggc cggcaacctt acctccaaa atgttaaccac tgtgagccca cctctcaaaa 32700
 aaaccaagtc aaacataaaac ctggaaatat ctgcacccct cacagttacc tcagaagccc 32760
 taactgtggc tgccgcccga cctctaattgg tcgcgggcaa cacactcacc atgcaatcac 32820
 aggccccgct aaccgtgcac gactccaaac tttagcattgc caccaagga cccctcacag 32880
 tgtcagaagg aaagcttagcc ctgcaaacat caggccccctt caccaccacc gatagcagta 32940
 cccttactat cactgcctca cccctctaa ctactgccac tggtagctt ggcattgact 33000
 tgaaagagcc catttataca caaaatggaa aactaggact aaagtacggg gtcctttgc 33060
 atgttaacaga cgacctaaac actttgaccg tagcaactgg tccaggtgtg actattaata 33120
 atacttcctt gcaaactaaa gttactggag ctttgggttt tgattcacaa ggcaatatgc 33180
 aacttaatgt agcaggagga ctaaggattt attctcaaaa cagacgcctt atacttgatg 33240
 ttagttatcc gttttagtgc caaaaccaac taaaatctaag actaggacag ggcctcttt 33300
 ttataaaactc agcccacaac ttggatatta actacaacaa aggcctttac ttgtttacag 33360
 cttcaaacaa ttccaaaaag cttgaggtta acctaagcac tgccaagggg ttgtattttg 33420
 acgctacagc catagccatt aatgcaggag atgggcttga atttggttca cctaattgcac 33480
 caaacacaaa tcccctcaaa acaaaaattt gccatggcct agaatttgat tcaaacaagg 33540
 ctatggttcc taaaacttagga actggcctta gttttgacag cacaggtgcc attacagttag 33600
 gaaacaaaaaa taatgataag ctaactttgt ggaccacacc agctccatct cctaactgtta 33660
 gactaaatgc agagaaagat gctaaactca ctttggtctt aacaaaatgt ggcagtcaaa 33720

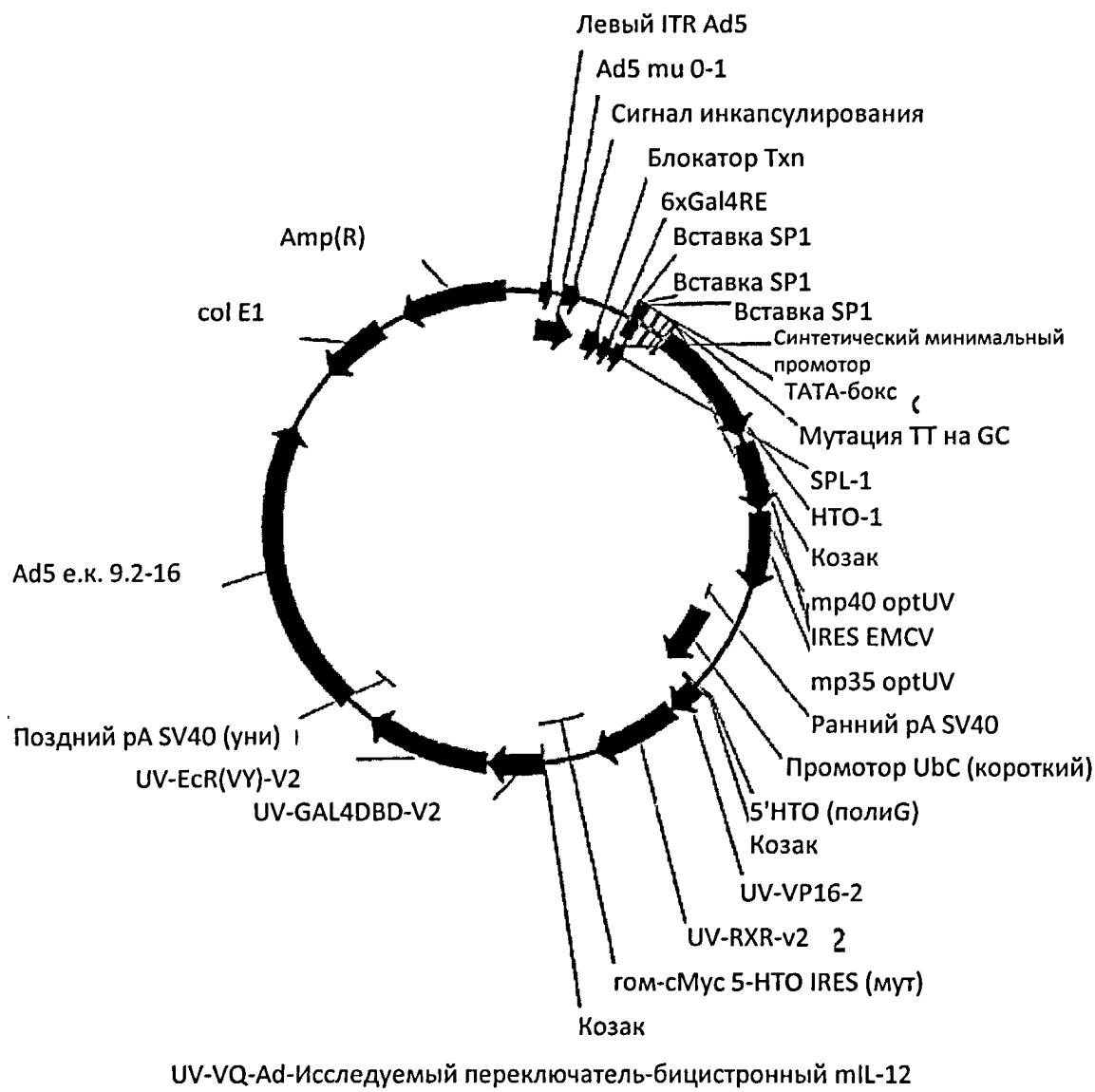
tacttgctac agttcagtt ttggctgtta aaggcagttt ggctccaata tctggAACAG	33780
ttcaaaAGTGC tcatcttatt ataagatttg acaaaaatgg agtgctacta aacaattcct	33840
tcctggaccc agaatattgg aactttAGAA atggagatct tactgaaggc acagcctata	33900
caaACGCTGT tggatttatg cctaacctat cagcttatcc aaaatctcac gtaaaaACTG	33960
ccaaaAGTAA cattgtcagt caagttact taaacggaga caaaaactaaa cctgtAACAC	34020
taaccattac actaaACGGT acacaggAAA caggagACAC aactccaAGT gcataCTCA	34080
tgtcatttc atgggactgg tctggccaca actacattaa tgaatattt gccacatcct	34140
cttacacttt ttcatacatt gcccAAGAAT aaagaatcgt ttgtgttatg tttcaacgtg	34200
tttattttc aattgcagaa aatttcaagt cattttcat tcagtagtat agccccacca	34260
ccacatAGCT tatacagATC accgtacCTT aatcaaACTC acagaACCTC agtattcaAC	34320
ctgccacCTC cctcccaACA cacagAGTAC acagtccTT ctccccGGCT ggccttaAAA	34380
agcatcatat catgggtaac agacatattc ttaggtgtta tattccacac ggTTTcCTGT	34440
cgagccAAAC gctcatcagt gatattaata aactccccgg gcagctcact taagttcatg	34500
tcgctgtCCA gctgctgAGC cacaggCTGC tgtCCAactt gcggTTgCtt aacgggCGGc	34560
gaaggagaag tccacgccta catggggta gagtcataat cgtcatcag gatagggcgg	34620
tggTgCTgCA gcagcgcgCG aataaaACTGC tgccgCCGCC gctccgtcCT gcaggaatac	34680
aacatggcag tggTCTCCTC agcgatgatt cgcaccGCC gcagcataag gcgcCTTgTC	34740
ctccgggcAC agcagcgcAC cctgatCTCA cttaaaATCAG cacAGTAact gcagcacAGC	34800
accacaatAT tggTCAAAT CCCACAGTGC aaggcGCTGT atccaaAGCT catggcgggg	34860
accacagaAC ccacgtggCC atcataACCAC aagcgcAGGT agattaAGTg ggcACCCCTC	34920
ataaaACACGC tggacataAA cattacCTt tttggcatgt tgtaattcAC cacCTCCGG	34980
taccatataa acctCTgatt aaacatggcg ccatCCACCA ccATCCTAAA ccagCTggCC	35040
aaaacCTGCC cgccggCTAT acactgcagg gaaccgggac tggaacaatg acagtggaga	35100
gcccaggact cgtaaccatg gatcatcatg ctcgtcatga tatcaatgtt ggcacaACAC	35160
aggcacacGT gcatacactt cctcaggatt acaagCTCCT cccgcgttag aaccatATCC	35220
cagggAACAA cccattCCTG aatcagcgtA aatcccACAC tgcaggGAAG acctcgcACG	35280
taactcacGT tgtcattgt caaagtgtt cattcggca gcagcggatg atcCTCCAGT	35340
atggtagCgC gggTTCTGT ctAAAAGGA ggtagacgt ccctactgtA cggagtgcgc	35400
cgagacaACC gagatcgtgt tggtcgtAGT gtcATGCCAA atggAACGCC ggacgtAGTC	35460
atatttCCTG aagcaAAACC aggtgcgggc gtgacAAACA gatctcgTC tccggTCTCG	35520
ccgCTTAGAT cgctCTGTGT agtagttgtA gtatATCCAC tctCTCAAAG catccaggCG	35580
ccccCTggCT tcgggTTCTA tggAAACTCC ttcatgcGCC gctGCCCTGA taacatCCAC	35640
caccgcagAA taagccACAC ccagccAAACc tacacATTG ttctgcgAGT cacacACGGG	35700
aggagcggGA agagctggAA gaaccatgtt ttttttttA ttccAAAAGA ttatccAAA	35760

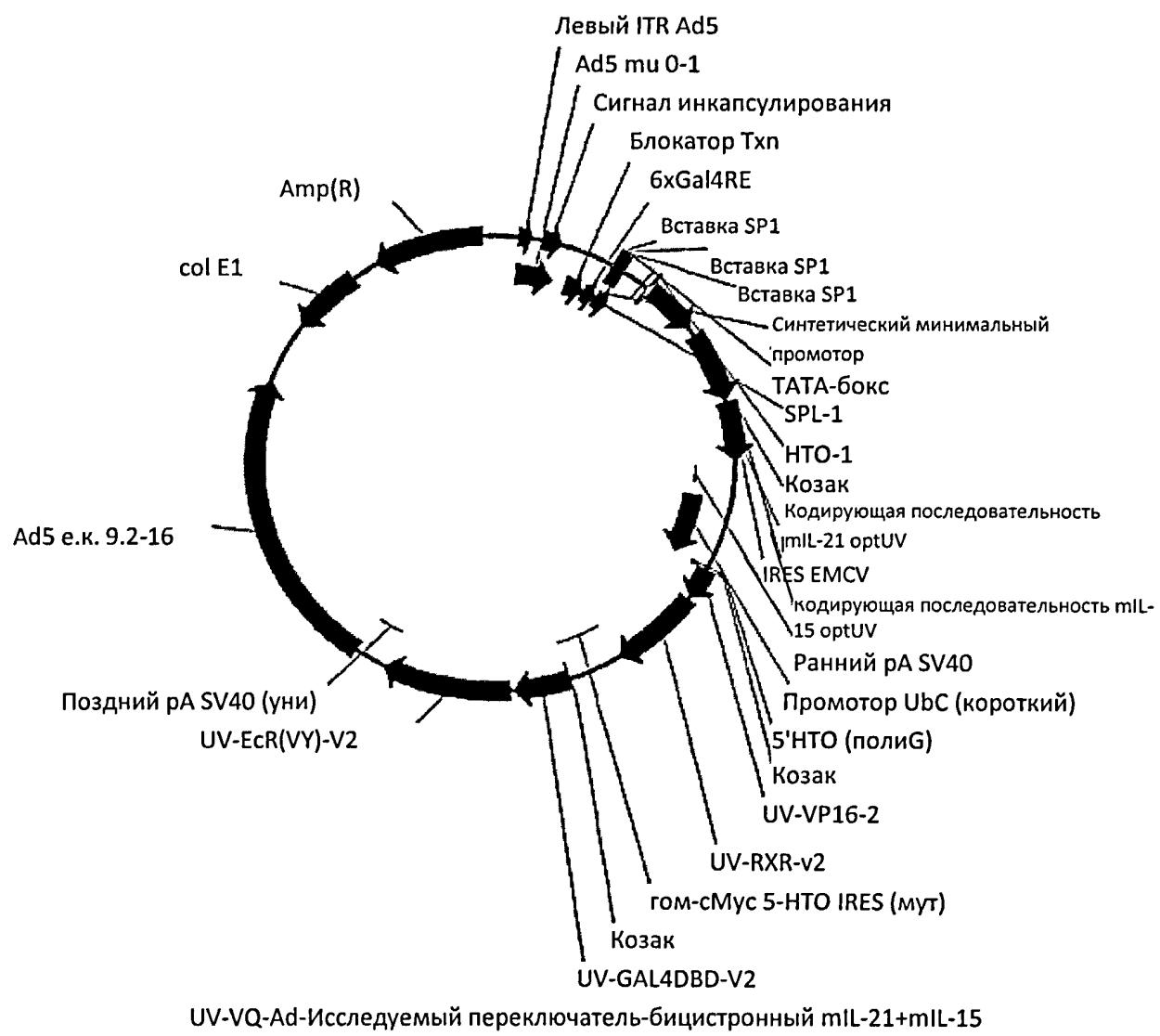
cctcaaaatg aagatctatt aagtgaacgc gctccctcc ggtggcgtgg tcaaactcta	35820
cagccaaaga acagataatg gcatttgtaa gatgttgcac aatggcttcc aaaaggcaaa	35880
cggccctcac gtccaagtgg acgtaaaggc taaacccttc agggtgaatc tcctctataa	35940
acattccagc accttcaacc atgccaaat aattctcatc tcgccacctt ctcataatata	36000
ctctaagcaa atcccgaaa ttaagtccgg ccattgtaaa aatctgctcc agagcgcct	36060
ccaccttcag cctcaagcag cgaatcatga ttgcaaaaat tcaggttcct cacagacctg	36120
tataagattc aaaagcggaa cattaacaaa aataccgcga tcccgtaggt cccttcgcag	36180
ggccagctga acataatcgt gcaggtctgc acggaccagc gcggccactt ccccgccagg	36240
aaccatgaca aaagaaccca cactgattat gacacgcata ctcggagcta tgctaaccag	36300
cgtagccccg atgtaagctt gttgcatggg cggcgatata aatgcaagg tgctgctcaa	36360
aaaatcaggc aaagcctcgc gcaaaaaaga aagcacatcg tagtcatgct catgcagata	36420
aaggcaggt a gctccggaa ccaccacaga aaaagacacc attttctct caaacatgtc	36480
tgccggtttc tgcataaaaca caaaataaaa taacaaaaaa acattaaac attagaagcc	36540
tgtcttacaa cagaaaaaac aacccttata agcataagac ggactacggc catgccggcg	36600
tgaccgtaaa aaaactggtc accgtgatta aaaagcacca ccgacagctc ctcggtcatg	36660
tccggagtca taatgtaaga ctcggtaaac acatcagggtt gattcacatc ggtcagtgt	36720
aaaaagcgcac cgaaatagcc cggggaaata cataccgcata ggcgtagaga caacattaca	36780
ccccccatag gaggtataac aaaattaata ggagagaaaa acacataaac acctgaaaaa	36840
ccctcctgcc taggcaaaat agcaccctcc cgctccagaa caacatacag cgcttccaca	36900
gcggcagcca taacagtcag ccttaccagt aaaaaagaaaa acctattaaa aaaacaccac	36960
tcgacacggc accagctcaa tcagtcacag tgaaaaaaag ggccaagtgc agagcgagta	37020
tatataggac taaaaatga cgtaacggtt aaagtccaca aaaaacaccc agaaaaccgc	37080
acgcgaacct acgcccagaa acgaaagcca aaaaacccac aacttcctca aatcgtcact	37140
tccgtttcc cacgttacgt cactccat ttaagaaaa ctacaattcc caacacatac	37200
aagttactcc gccctaaaac ctacgtcacc cgccccgttc ccacgccccg cgccacgtca	37260
caaactccac cccctcatta tcatattggc ttcaatccaa aataaggtat attattgtat	37320
atg	37323



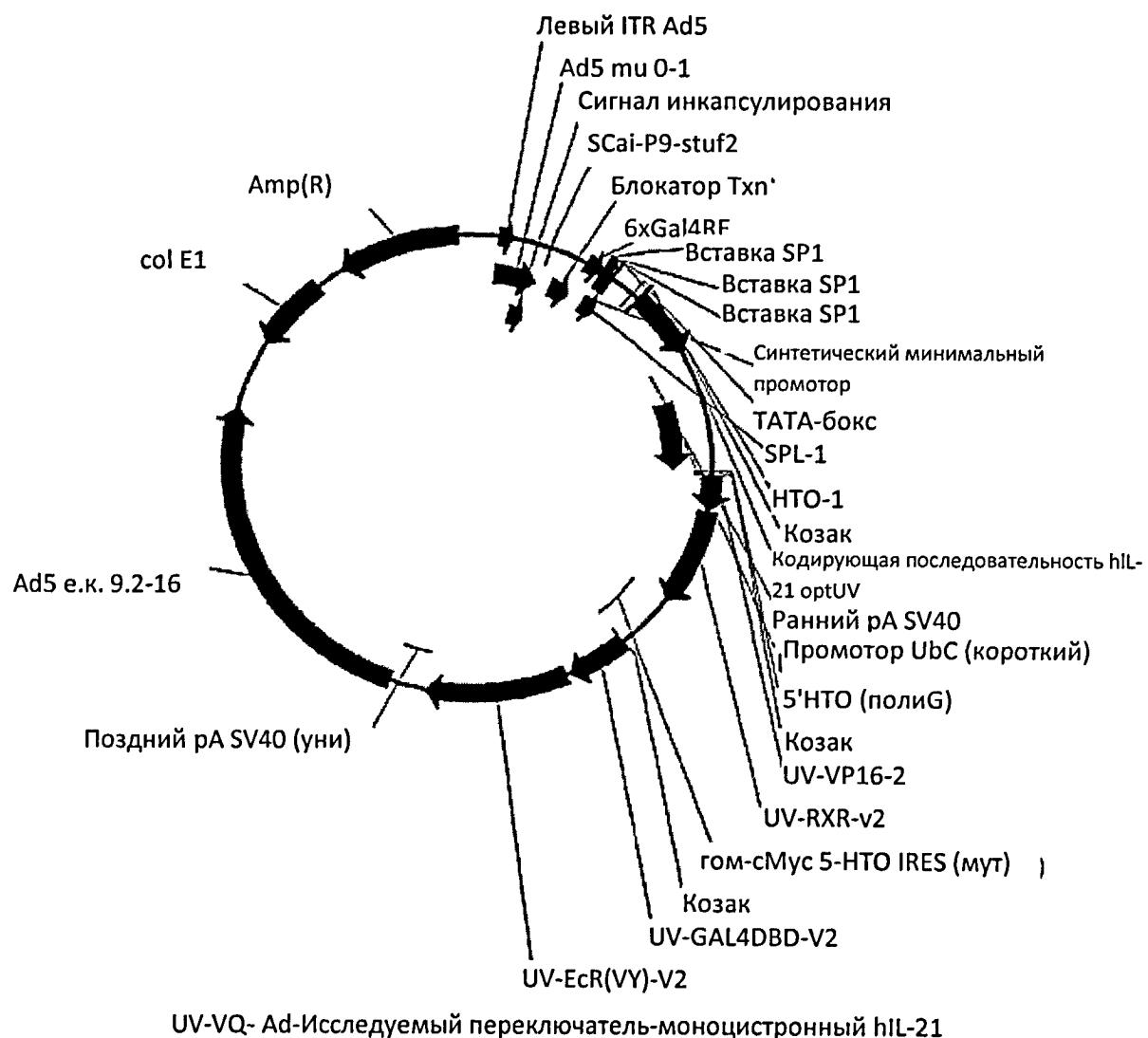
UV-VQ-Ad-Исследуемый переключатель-бицистрионный hIL-21+hIL-15

ФИГ. 2

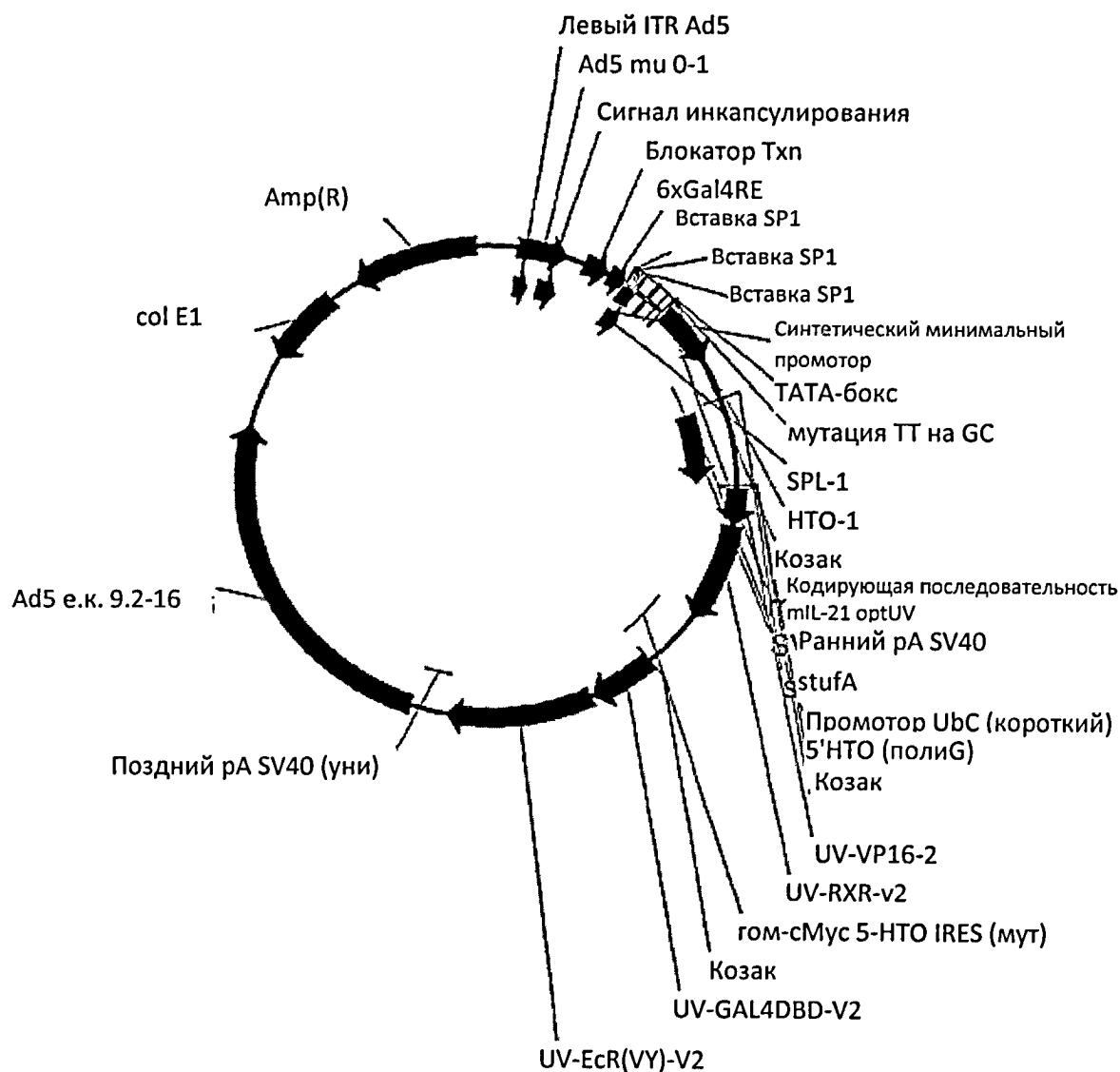




ФИГ. 4

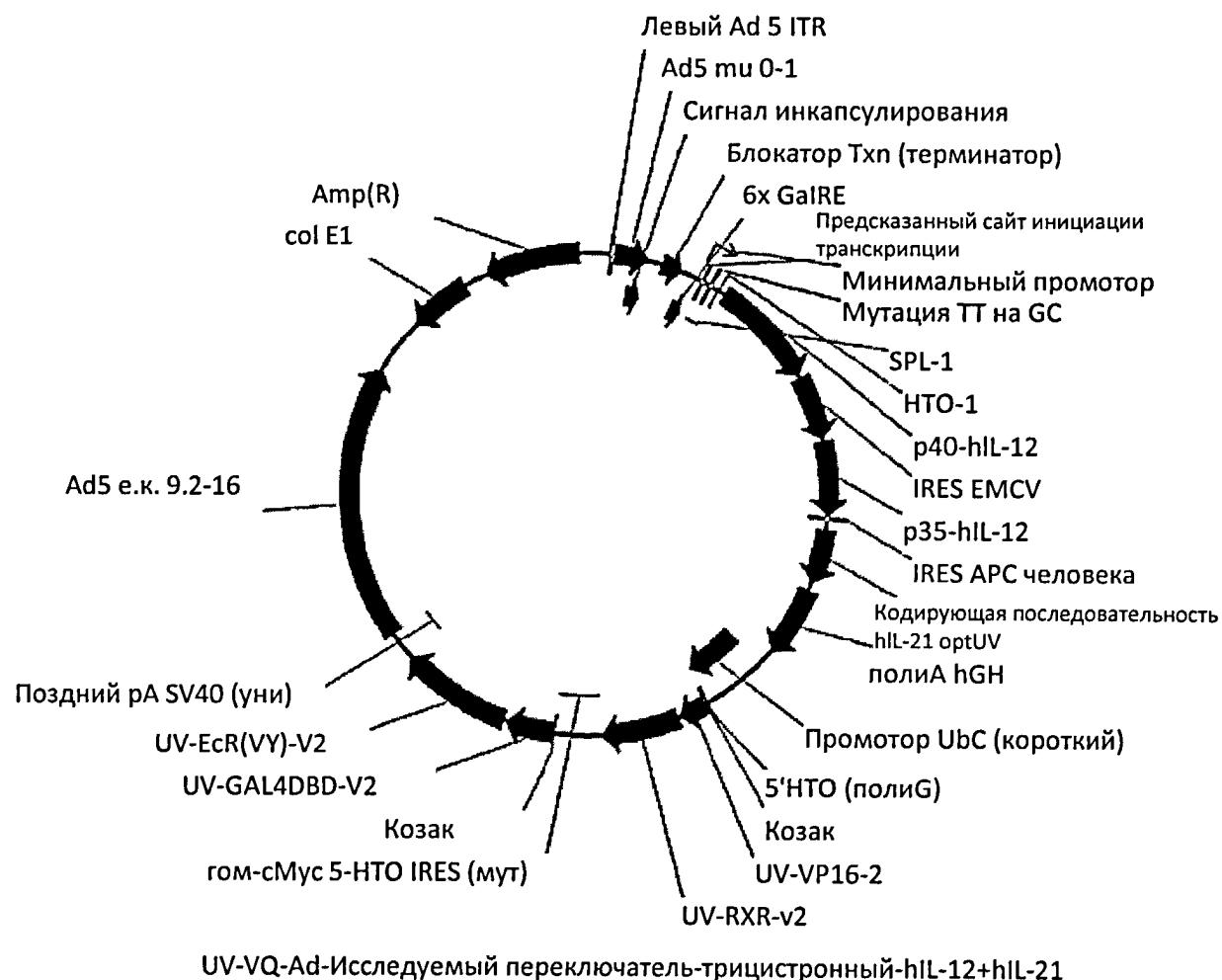


ФИГ. 5

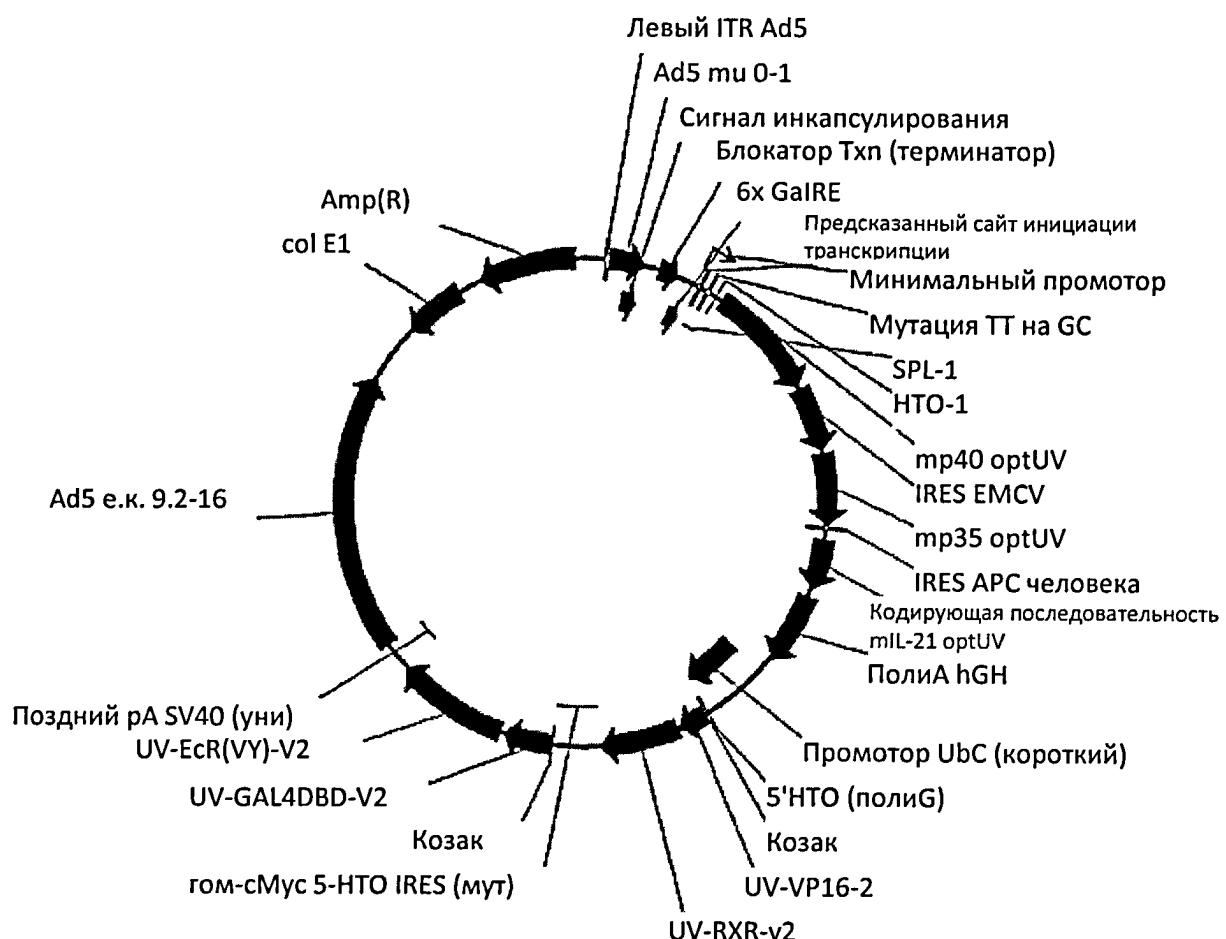


UV-VQ- Ad-Исследуемый переключатель-моноцистронный mIL-21

ФИГ. 6

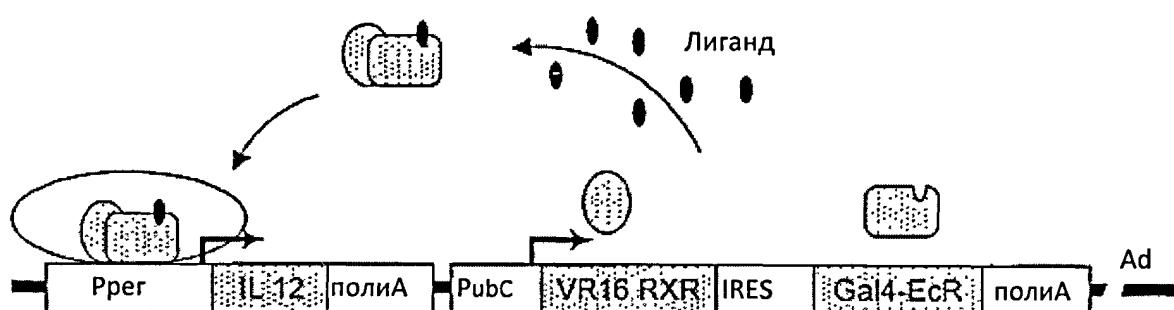


ФИГ. 7



UV-VQ-Ad-Исследуемый переключатель-трицистронный-mIL-12+mIL-21

ФИГ. 8



ФИГ. 9