



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(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

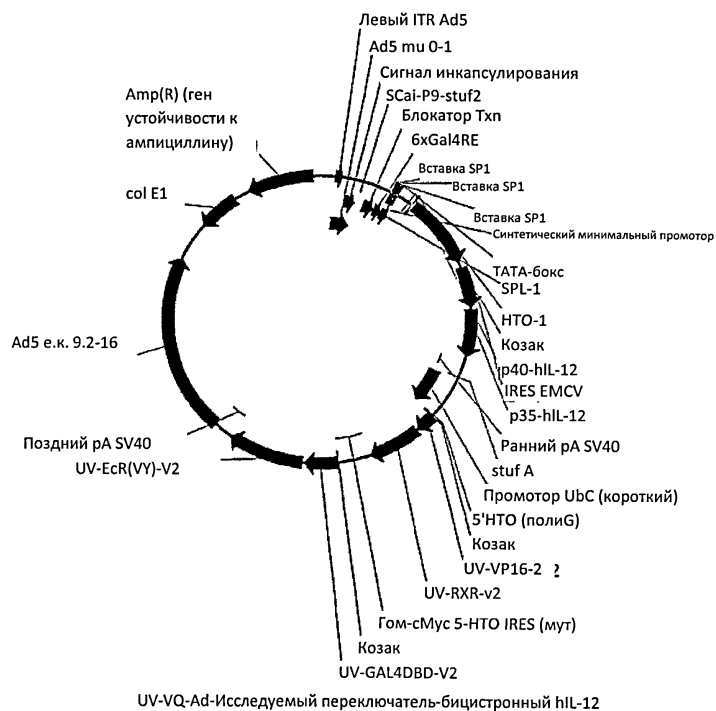
(57) Реферат:

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, 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. 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.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

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

(57) Abstract:

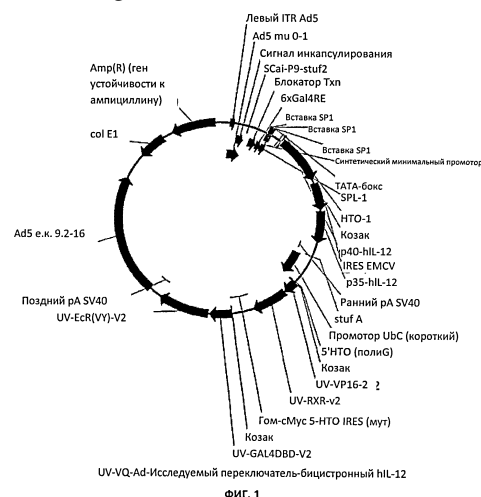
FIELD: chemistry.

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 (lymphotactin), 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



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.

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 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 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

[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 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 др., 1999; Thomas и др., 2000; Tsung и др., 1997; Wolf и др., 1994; Yuminamochi и др., 2007). Все большее число 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⁺ Т-клетки и CD8⁺ Т-клетки (Trinchieri, 2003), описанная 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 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 плазмиды (Heinzerling и др., 2005), или аутологических фибробластов, модифицированных геном IL-12 (Kang и др., 2001), оказалась безопасной и хорошо переносимой.

[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

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

[0007] Поскольку примирование перекрестнореагирующим 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 аденовирусом), приводит к значительному улучшению примирования перекрестнореагирующим 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 аденовируса, 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 аденовирусный 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, b-дефензина, HMGB1, Flt3L, IFN-бета, TNF-альфа, dnFADD, TGF-альфа, PHLN1, PD-L1, антисмыслового олигонуклеотида PD-L1, TGFbRII DN, ICOS-L и S100.

[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, 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 полинуклеотид из (2) и (3) связан с промотором, который активируется лиганд-зависимым фактором транскрипции.

[00011] Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает способ получения популяции клеток, например, иммунных клеток или TSC, экспрессирующих белок (белки), обладающие функцией (функциями) одного или нескольких иммуномодуляторов, путем модификации (например, трансфекции, электропорации и т.д.) указанных клеток 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 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.

[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 (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.)

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 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.

[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 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) 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) 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 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 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 *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 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 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 *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.

[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, 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 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) 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 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 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; Triozzi и др., 2005). 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:

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

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

[00022] 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 или TSC, которые сконструированы *in vitro* таким образом, что они при определенных 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
- (б) введение указанному млекопитающему терапевтически эффективного количества одного или нескольких активирующих лигандов;

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

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

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

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:

(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

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

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:

(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

(b) 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, 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 лигандом; и

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

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

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 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 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 сконструированной *in vitro* клетке, например, иммунной клетке или TSC, включающий:

(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,

5 обладающий функцией IL-12;

(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 плазмиды для системы экспрессии с регулируемого промотора для бицистронного транскрипта, кодирующего hIL-12.

[00032] На Фиг.2 показана карта плазмиды для системы экспрессии с регулируемого

20 промотора для бицистронного транскрипта, кодирующего hIL-21 и hIL-15.

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

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

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

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

[00037] На Фиг.7 показана карта плазмиды для системы экспрессии с регулируемого

30 промотора трицистронного транскрипта, кодирующего hIL-12 и hIL-21.

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

[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

35 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

Цитокины

40 [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 (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 atopическим 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 гематопоетических клеток. Полинуклеотидные последовательности IL-9 доступны в открытых базах данных под номерами доступа

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

5 [00052] Последовательности аминокислот интерлейкина 9 (IL-9) доступны в открытых базах данных под номерами доступа NP_000581 (человека); NP_032399 (мышь); 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 литическую активность NK/ 10 лимфокин- активированных клеток-киллеров и стимулировать продукцию IFN-гамма покоящимися мононуклеарными клетками периферической крови (РВМС).
Полинуклеотидные последовательности IL-12 доступны в открытых базах данных под номерами доступа NM_000882 (IL12A человека); NM_002187 (IL12B человека); NM_008351 (IL12a мышь); NM_008352 (IL12b мышь); 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 мышь); NP_032378 (IL12b мышь); 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 (мышь); 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 (мышь); 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 (мышь); 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 (мышь); 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 (мышь); 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 (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); 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 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 (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.

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 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 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.

[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 (мышь) и NM_134361 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00070] Последовательности аминокислот XCL1 доступны в открытых базах данных под номерами доступа NP_002986 (человека); NP_032536 (мышь) 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 активации полиморфоядерных лейкоцитов, доступны в открытых базах данных под

20 номерами доступа NM_002983 (человека); NM_011337 (мышь) и NM_013025 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00072] Последовательности аминокислот CCL3 доступны в открытых базах данных под номерами доступа NP_002974 (человека); NP_035467 (мышь) и NP_037157 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00073] Полинуклеотидные последовательности CCL5 (RANTES), который представляет собой провоспалительный цитокин, участвующий в воспалении и развитии астмы, доступны в открытых базах данных под номерами доступа AF043341 (человека); NM_013653 (мышь) 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 (мышь) и NP_112378 (крысы), 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 (мышь) 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 (мышь) и NP_001007613 (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.

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

15 ссылки.

[00080] Последовательности аминокислот хемокинового (С-Х-С-мотив) лиганда 10 (CXCL10) доступны в открытых базах данных под номерами доступа CAA26370 (человека); NP_067249 (мыши) и AAN58444 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

20 [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

25 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.

[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

30 настоящее описание посредством ссылки.

[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 MIP-3 β) важно для выработки первичных

35 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.

[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.

40

[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

45 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, 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 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 несколькими 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 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] Колонiestимулирующий фактор гранулоцитов/макрофагов (GM-CSF) 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); 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 колонiestимулирующего фактора гранулоцитов/макрофагов (GM-CSF) доступны в открытых базах данных под номерами 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 как рецептор фактора роста на гематопозитических 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 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 (мышь); NM_001001614 (цыпленок) 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 (мышь); NP_001001614 (цыпленок) 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, грибов и вирусов. Полипептидные
 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 мышь); NM_010030 (бета-дефензин-2 мышь, Defb2); NM_013756 (бета-дефензин-3 мышь, Defb3); NM_019728 (бета-дефензин-4 мышь, Defb4); NM_030734 (бета-дефензин-5 мышь, Defb5); NM_054074 (бета-дефензин-6 мышь, Defb6); NM_139220 (бета-дефензин-7 мышь); NM_153108 (бета-дефензин-8 мышь, Defb8); NM_139219 (бета-дефензин-9 мышь, Defb9) и NM_139225 (бета-дефензин-10 мышь, Defb10); перечисленные последовательности включены в
 25 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 мышь); NP_034160 (бета-дефензин-2 мышь, Defb2); NP_038784 (бета-дефензин-3 мышь, Defb3); NP_062702 (бета-дефензин-4 мышь, Defb4); NP_109659 (бета-дефензин-5 мышь, Defb5); NP_473415 (бета-дефензин-6 мышь, Defb6); NP_631966 (бета-дефензин-7 мышь, Defb7); NP_694748 (бета-дефензин-8 мышь, Defb8); NP_631965 (бета-дефензин-9 мышь, Defb9) и NP_631971 (бета-дефензин-10 мышь, 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 высокомолекулярной 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 данных под номерами доступа NM_002128 (человека); NM_010439 (мышь); NM_204902 (цыпленок) и NM_012963 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[000100] Последовательности аминокислот белков высокомолекулярной группы-1 (HMGB1) доступны в открытых базах данных под номерами доступа NP_002119 (человека); NP_034569 (мышь); NP_990233 (цыпленок) и NP_037095 (крысы), 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 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 человека); BC001431 (S100 A6 человека); BC 034687 (S100 A7 человека); BC005928 (S100 A8 человека); BC047681 (S100 A9 человека); BC015973 (S100 A10 человека); D38583 (клагизарин (clagizzarin) человека); NM_011309 (S100a1 мышь); NM_009115 (S100b мышь); NM_013650 (S100a8 мышь); NM_009114 (S100a9 мышь); NM_011310 (S100a3 мышь); NM_011311 (S100a4 мышь) и NM_011312 (S100a5 мышь), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[000102] Последовательности аминокислот белков S100 доступны в открытых базах данных под номерами доступа AAN14392 (S100 A1 человека); AAN02829 (S100 A2 человека); AAN12893 (S100 A3 человека); AAN16300 (S100 A4 человека); CAA79479 (S100D человека); AAN01431 (S100 A6 человека); AAN34687 (S100 A7 человека); AAN05928 (S100 A8 человека); AAN47681 (S100 A9 человека); AAN15973 (S100 A10 человека); BAA07597 (клагизарин человека); NP_035439 (S100a1 мышь); NP_033141 (S100b мышь); NP_038678 (S100a8 мышь); NP_033140 (S100a9 мышь); NP_035440 (S100a3 мышь); NP_035441 (S100a4 мышь) и NP_035442 (S100a5 мышь), 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 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 туберкулеза. В патенте США номер 7,393,541 описано получение адъювантной 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 примирования макрофагов *in vivo* у пациентов, нуждающихся в усилении бактерицидной и противовирусной активности, с помощью LPS.

Костимулирующие молекулы (положительный эффект)

- [000106] Лиганд OX40 (OX40L) принадлежит к членам 4 суперсемейства лигандов фактора некроза опухоли (Tnfsf4), экспрессируется на дендритных клетках и вызывает
15 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.

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

- [000108] Лиганд 4-1BB (4-1BBL) принадлежит к членам 9 суперсемейства лигандов фактора некроза опухоли (Tnfsf9), он представляет собой трансмембранный
25 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.

- [000101] Белок CD40 принадлежит к членам 5 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли, и является ключевым в опосредовании большого разнообразия
35 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
40 (цыпленка) и NM_134360 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

- [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
45 настоящее описание посредством ссылки.

[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 развившиеся опухоли, не вызывая явных аутоиммунных заболеваний. См. Ко и др., J. Exp. Med. 7: 885 (2005). В патенте США номер 6,503,184 В1 описано антитело против GITR.

5 [000104] Полинуклеотидные последовательности лиганда GITR (GITRL) доступны в открытых базах данных под номерами доступа AY358868 (человека) и AY359852 (мышь), 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 (мышь), 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 активацию Т-клеток. Для LIGHT есть два рецептора, медиатор входа в клетку вируса герпеса (HVEM) и рецептор лимфотоксина- β (LT- α). 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.

[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
25 последовательности CD70 доступны в открытых базах данных под номерами доступа NM_001252 (человека); NM_011617 (мышь) и NM_001106878 (крысы), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

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

[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
35 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 активации функции Т-клеток памяти. Полинуклеотидные последовательности ICOS-L доступны в открытых базах данных под номерами доступа NM_015259 (человека) и NM_015790 (мышь),
40 перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством ссылки.

[000110] Последовательности аминокислот ICOS-L доступны в открытых базах данных под номерами доступа NP_056074 (человека) и NP_056605 (мышь), перечисленные последовательности включены в настоящее описание посредством
45 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. Ингибирование 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 ингибирует пролиферацию Т-клеток путем блокирования продвижения по клеточному циклу и продукции цитокинов. У
- 25 Yamazaki и др., J. of Immunol. 169: 5538 (2002) и Ansari и др., J. Exp. Med. 198: 63 (2003) описано получение моноклональных антител против PD-L2.

Молекулы, направленные против иммунных супрессоров (ингибиторы толерантности)

- [000116] Трансформирующий фактор роста-бега (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 (TGFB2), 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 ингибирует 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 США номер 6,534,277 описан способ получения и применения антитела против SOCS1,
 35 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.

[000120] TGF- α представляет собой митогенный полипептид, который способен связываться с рецептором EGF и действовать синергично с TGF- β , чтобы вызвать
 40 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 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 программированной гибели клетки (апоптоза) и олигомеризации рецептора. Был обнаружен белок млекопитающего, обозначенный FADD, обладающий способностью связывать цитоплазматический участок или домен рецептора Fas и ингибировать 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.

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

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

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

- 20 [000126] SEQ ID NO:5 представляет собой полинуклеотидную последовательность конструкции, кодирующей hIL-21 и hIL-15.

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

- 25 [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.

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

- 30 [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.

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

- 40 [000136] SEQ ID NO:15 представляет собой полинуклеотидную последовательность, кодирующую mp35 mIL-12.

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

- 45 [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.

5 [000143] SEQ ID NO:22 представляет собой последовательность аминокислот p40 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 аденовирусного вектора, включающего последовательность, кодирующую IL-12 человека: Ad-RTS-hIL-12 (SP1-RheoIL-12).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ.

[000151] Если не указано иначе, предполагается, что все термины данной области, обозначения и другие научные термины или терминология, используемая в данной
25 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
30 обязательно должно истолковываться как наличие существенного отличия значения 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
35 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.

[000152] Термин "изолированный" для целей настоящего изобретения обозначает
40 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,
45 считают "изолированным".

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

[000154] Термины "нуклеиновая кислота", "молекула нуклеиновой кислоты", "олигонуклеотид", "нуклеотид" и "полинуклеотид" используют взаимозаменяемо, 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 нетранскрибируемой 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 25 длину, чем у исходной нуклеиновой кислоты, и включающей, на протяжении общей 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 30 в диапазоне длин от по меньшей мере 6, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 39, 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 кодирующей 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
35 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% моче и без формамида; или в 30% формамида, 5X SSC,
40 0.5% 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, аденозин 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 заявке, а также по существу сходным последовательностям нуклеиновых кислот.

[000163] В одном варианте реализации настоящего изобретения, полинуклеотиды обнаруживают 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.

[000164] Послегибридизационные 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 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 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 больше степень подобия или гомологии между двумя последовательностями нуклеотидов, тем больше значения T_m для гибридов нуклеиновых 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., 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 обнаруживают путем использования условий гибридизации, включающих этап гибридизации в менее чем 500 mM соли по меньшей мере при 37°C и этап промывки в 2X SSPE при температуре, равной по меньшей мере 63°C. В другом варианте реализации настоящего изобретения, условия гибридизации включают менее чем 200 mM 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.

[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 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 мечеными, например, ³²P-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 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 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 *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 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 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, процессинг 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 последовательности определяют по иницирующему 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 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 нуклеиновых кислот, любой из ДНК, кДНК или РНК, который содержит сигнал инициации трансляции или иницирующий кодон, такой как ATG или AUG, и терминирующий 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. 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 можно также обозначать символами ($\leftarrow \rightarrow$) или ($3' \leftarrow 5' \rightarrow 3'$).

[000176] Термин "хвост к хвосту" используется в данной заявке для описания ориентации двух полинуклеотидных последовательностей по отношению друг к другу. 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 ($5' \rightarrow 3' \leftarrow 5'$).

[000177] Термин "голова к хвосту" используется в данной заявке для описания 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. Термин "голова к хвосту" можно сокращенно называть (5') к (3') и можно также обозначать символами ($\rightarrow \rightarrow$) или ($5' \rightarrow 3' \rightarrow 3'$).

[000178] Термин "по ходу транскрипции" относится к последовательности 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, иницирующий 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 коревой оспы или аденовирус; 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 рВR322 или рUC, 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

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 субъектах-животных. Вирусные векторы, которые можно применять, включают, но не ограничены перечисленными, ретровирусные, векторы на базе аденоассоциированного вируса, поксвирусные, бакуловирусные, векторы на базе вируса коровьей оспы, вируса простого герпеса, вируса Эпштейна-Барра, аденовирусные, геминивирусные и колимовирусные векторы. Невирусные векторы включают плазмиды, липосомы, электрически заряженные липиды (цитофектины), комплексы ДНК-белок и биополимеры. Вдобавок 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 "плазида" относится к внехромосомному элементу, часто несущему 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 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 "клонировующий вектор" относится к "репликону", который представляет собой единичный участок нуклеиновой кислоты, предпочтительно ДНК, который последовательно повторяется и который содержит точку начала репликации, такому как плазида, фаг или космида, к которому может быть присоединен другой фрагмент нуклеиновой кислоты для осуществления репликации присоединенного фрагмента. Клонировующие векторы могут быть способны к репликации в одном типе клеток и экспрессии в другом ("челночный вектор"). Клонировующие 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 интересных последовательностей.

[000187] Термин "вектор экспрессии" относится к вектору, плазмиде или носителю, 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 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, 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*); p-лактамазный промотор, промоторы lac, ara, tet, trp, IP_L , IP_R , T7, tac и trc (полезные для экспрессии в *Escherichia coli*); регулируемые светом, специфичные для семян, специфичные для пыльцы, специфичные для яичника промоторы, промотор 35S вируса мозаики цветной капусты, минимальный 35S CMV, промотор вируса мозаики жилок 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, 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 саркомы Рауса (RSV), промоторы E1A или гены основных поздних промоторов (MLP) аденовирусов (Ad), ранний промотор цитомегаловируса (CMV), тимидинкиназный (ТК) 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 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, 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, активная в тестикулярных клетках, клетках груди, лимфоидных и тучных клетках; промотор гена альбумина, регуляторные области Aro AI и Aro AII, активные в печени, регуляторная область гена альфафетопротейна, 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 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.

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
- 30 полимер (например, WO 95/21931).

- [000191] Также можно ввести вектор *in vivo* в виде очищенной ДНК-плазмиды (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 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 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 изопентанил-трансферазы и тому подобные.

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

[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 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 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 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 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, 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, 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, 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.

[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 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 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 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 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 вставки чувствительного элемента в последовательность минимального промотора для изменения отзывчивости указанного промотора).

[000202] Кодированная 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 цис-действующим 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 спейсерных нуклеотидов (SEQ ID NO:26) (см. D'Avino и др., Mol. Cell. Endocrinol. 113:1 (1995)), и GGGTTGAATGAATTT (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.

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

[000207] Термины "кассета", "кассета экспрессии" и "кассета экспрессии генов" относятся к фрагменту ДНК, который можно вставить в нуклеиновую кислоту или
45 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 вдобавок к указанному полинуклеотиду содержит элементы, которые способствуют трансформации определенной клетки-хозяина. Кассеты, кассеты экспрессии, кассеты 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 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 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 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 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 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 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 онкогенов включают факторы роста, рецепторы факторов роста, протеинкиназы, регуляторы программированной 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 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 Томпсона-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, 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
15	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
20	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
25	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
30	ген-7, ассоциированный с дифференцировкой меланомы	рак	6,841,362
	простазин	рак	6,864,093
	каталитическая субъединица теломеразы; циклин-А	рак	6,936,595
	мидкин; c-erbB-2	рак	7,030,099
35	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
40	PCA ₃ dd3	рак предстательной железы	7,138,235
	DF3/MUC1	рак	7,247,297
	hex II	рак	2001/0011128
	циклооксигеназа-2	рак	2002/0107219
45	супер PCA	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	глиома	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
	урокортин II	психопатологии	7,087,385
10	тирозингидроксилаза	неврологические расстройства	7,195,910
	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 пероксисом/IIA-1 внепанкреатическая секреторируемая 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
	сайт-1 протеаза	ожирение, диабет	7,045,294
20	TIGR	глаукома	7,138,511
	VL30	аноксия	5,681,706
	моторный аминокислотный транспортер-2	ишемия нервной системы	2004/0171108
	MDTS9	почечная недостаточность	2006/0014931
	LIM, пирролин-5-карбоксилат-редуктаза, SIM2	расстройства предстательной железы	2006/0134688
25	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
35	тропонин Т	скелетные мышцы
	myoD	мышцы
	актин	мышцы
	22 α гладкой мышцы	гладкая мышца артерии
	утирофин	мышцы
40	миотатин	мышцы
	тяжелая цепь миозина гладкой мышцы	гладкая мышца
	сердечный белок с анкириновыми повторами	сердечные мышцы
	MLP	мышцы
	смузелин	гладкая мышца
45	MYBPC3	кардиомиоциты
	T α 1 α -тубулин	нейроны
	молекула межклеточной адгезии-4 (ICAM-4)	нейроны
	субъединица β 1 рецептора типа А γ -аминомасляной кислоты	гипоталамус
	β 2-субъединица нейронального никотинового ацетилхолинового рецептора	нейроны

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

15	длинный промотор кислого сыровоточного 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
20	серглицин	гематопозитические клетки	5,340,739
	молекула I адгезии тромбоцитов и эндотелиальных клеток (PECAM-1)	тромбоциты, лейкоциты, эндотелиальные клетки	5,668,012
	рецептор с тирозинкиназной активностью Tie	эндотелиальные клетки, костный мозг	5,877,020
20	KDR/flk-1	эндотелиальные клетки	5,888,765
	эндоглин	эндотелиальные клетки	6,103,527
	CCR5	миелоидные и лимфоидные клетки	6,383,746
25	CD11d	миелоидные клетки	6,881,834
	тромбоцитарный гликопротеин IIb	гематопозитические клетки	6,884,616
	препроэндотелин-1	эндотелиальные клетки	7,067,649
30	белок, связывающий интерлейкин-18	мононуклеары	2006/0239984
	CD34	гематопозитические стволовые клетки	5,556,954
	тирозинкиназа Tec	гематопозитические стволовые клетки, печень	6,225,459

[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.

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
45	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
45	PCAV	Рак предстательной железы	2006/0275747

	РАсР	Нечувствительный к андрогену рак предстательной железы	2006/0294615
	SEQ ID NO:1 из патента 5,866,329, включена в настоящее описание посредством ссылки	Рак печени	5,866,329
5	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	АТВ 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
	Cyt61	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
30	IL-8	Саркома Капоши	2003/0096781
	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 Р65	Рак	5,773,215
	Теломераза	Рак	2002/0025518
	CYP1B1	Рак	2002/0052013
	14-3-3σ	Рак	2002/0102245
	NES1	Рак	2002/0106367

5	CAR-1	Рак	2002/0119541
	HMGI, MAG	Рак	2002/0120120
	ELL2	Рак	2002/0132329
	Эфрин В2	Рак	2002/0136726
	WAF1	Рак	2002/0142442
10	CIF130	Рак	2002/0143154
	C35	Рак	2002/0155447
	BMP2	Рак	2002/0159986
	BUB3	Рак	2002/0160403
	Полимераза каппа	Рак	2003/0017573
15	EAG1, EAG2	Рак	2003/0040476
	SEQ ID NOS:18,20,22 из публикации заявки на патент США 2003/0044813, включены в настоящее описание посредством ссылки	Рак	2003/0044813
	HMG I	Рак	2003/0051260
	HLTF	Рак	2003/0082526
	Barx2	Рак	2003/0087243
20	SEQ ID NOS:18, 20, 22, 32, 34, 36 из публикации заявки на патент США 2003/0108920, включены в настоящее описание посредством ссылки	Рак	2003/0108920
	Cables	Рак	2003/0109443
	Pp 32r1	Рак	2003/0129631
	BMP4	Рак	2003/0134790
	TS10q23.3	Рак	2003/0139324
25	Ядерный белок сборки веретена деления	Рак	2003/0157072
	PFTAIRE	Рак	2003/0166217
	SEMA3B	Рак	2003/0166557
	MOGr	Рак, множественный склероз, воспалительное заболевание	2003/0166898
	Фортилин	Рак	2003/0172388
30	SEQ ID NO:1 из публикации заявки на патент США 2003/0215833, включена в настоящее описание посредством ссылки	Рак	2003/0215833
	IGFBP-3	Рак	2004/0005294
	Полигомеозисный 2	Рак	2004/0006210
	PNQALRE	Рак	2004/0077009
	SEQ ID NOS:1, 3 из публикации заявки на патент США 2004/0086916, включены в настоящее описание посредством ссылки	Рак	2004/0086916
35	SCN5A	Рак	2004/0146877
	miR15, miR16	Рак	2004/0152112
	Хэппин	Рак	2004/0180371
40	PAOh1/SMO	Рак	2004/0229241
	Hippo, Mst2	Рак	2005/0053592
	PSMA-подобный	Рак, неврологические расстройства	2005/0064504
	JAB1	Рак	2005/0069918
	NF-AT	Рак	2005/0079496
45	P28ING5	Рак	2005/0097626
	MTG16	Рак	2005/0107313
	ErbB-2	Рак	2005/0123538
	HDAC9	Рак	2005/0130146
	GPBP	Рак	2005/0130227
	MG20	Рак	2005/0153352
	KLF6	Рак	2005/0181374
	ARTS1	Рак	2005/0266443

5	Dock 3	Рак	2006/0041111
	Аннексии 8	Рак	2006/0052320
	MH15	Рак	2006/0068411
	DELTA-N p73	Рак	2006/0088825
	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 TGFβ II типа	Рак	2002/0064786
	GCA-ассоциированные гены	Гигантоклеточный артериит	6,743,903
15	PRV-1	Истинная полицитемия	6,686,153
	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
	AOP2	Атеросклероз	2002/0142417
	Ремоделин	Артериальный рестеноз, фиброз	2002/0161211
	Фосфодиэстераза 4D	Инсульт	2003/0054531
	Рецептор простагландина подтипа EP3	Заболевание окклюзии периферических артерий	2003/0157599
25	CARP	Сердечные расстройства	2004/0014706
	НОР	Врожденный порок сердца	2004/0029158
	SEQ ID NOS:1-4 из публикации заявки на патент США 2004/0087784, включены в настоящее описание посредством ссылки	Апоплексия	2004/0087784
30	PLTP	Атеросклероз, заболевание сосудов, гиперхолестеринемия, танжерская болезнь, семейное заболевание недостаточности ЛПВП	2006/0252787
	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
40	Резистин	Диабет II типа	2002/0161210
	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
45	Нейронатин	Метаболические расстройства	2004/0259777
	Ncb5or	Диабет	2005/0031605
	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
	UCP2	Нарушение массы тела	2002/0127600
15	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
25	AL-2	Нервные расстройства	2002/0142444
	Пролиндегидрогеназа	Биполярное расстройство, большое депрессивное расстройство, шизофрения, обсессивно-компульсивное расстройство	2002/0193581
	MNR2	Хроническое нейродегенеративное заболевание	2002/0197678
30	ATM	Атаксия-телеангиэктазия	2004/0029198
	Ho-1	Дементные заболевания	2004/0033563
	CON202	Шизофрения	2004/0091928
35	Атаксин-1	Нейродегенеративные расстройства	2004/0177388
	NR3B	Заболевания мотонейронов	2005/0153287
	NIPA-1	Наследственная спастическая параплегия	2005/0164228
40	DEPP, адреномедуллин, csdA	Шизофрения	2005/0227233
	Inf-20	Нейродегенеративные заболевания	2006/0079675
	EOPA	Расстройства развития головного мозга и дегенеративные расстройства	2007/0031830
45	SERT	Аутизм	2007/0037194
	FRP-1	Глаукома	2002/0049177
	Сывороточный амилоид А	Глаукома	2005/0153927
50	BMP2	Остеопороз	2002/0072066
	BMPRIА	Юношеский полипоз	2003/0072758
	ACLP	Гастрошизис	2003/0084464
55	Резистин-подобная молекула β	Семейный аденоматозный 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
60	TRANCE	Расстройства иммунной системы	2003/0185820
	Матрилин-3	Остеоартрит	2003/0203380
	Синовиолин	Ревматоидный артрит	2004/0152871
65	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
70	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		
	Eps8	Кожные расстройства, заживление ран	2003/0180302
	Бета-10	Патология щитовидной железы	2002/0015981
5	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
	Фактор роста волосистой	Алоpecia	2003/0036174
10	фолликулы		
	Корнеодесмоин	Алоpecia	2003/0211065
	GCR9	Астма, лимфома, лейкопения	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, преждевременный 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 железа	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 5 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 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) 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 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.

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 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 переключателях согласно настоящему изобретению, включают члены суперсемейства ядерных рецепторов, активируемых подходящими лигандами (например, глюкокортикоидом, эстрогеном, прогестинном, ретиноидом, экдизоном и их аналогами и миметиками), и гТТА, активируемый тетрациклином, но не ограничиваются ими. В одном аспекте настоящего изобретения, 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 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, 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 нестероидным агонистом экидизона, 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 экидизона, 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 экидизона.

А. Основанный на экидизоне генный переключатель

[000218] EsR и другие ядерные рецепторы группы Н представляют собой члены суперсемейства ядерных рецепторов, все члены которого, как правило, отличаются присутствием аминоконцевого домена трансаактивации (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: А/В, С, D, Е и, в некоторых членах семейства, F (см. US 4,981,784 и Evans, Science 240: 889 (1988)). Домен "А/В" соответствует домену трансаактивации, "С" соответствует связывающему ДНК домену, "D" соответствует шарнирному участку и "Е" соответствует лигандсвязывающему домену. Некоторые члены указанного семейства также могут содержать другой домен трансаактивации 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 H подсемейства 1 ядерных рецепторов) и имеет номер доступа в Genbank P34021.

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

```

1 mkrrwsnngg fmrlpeesss evtsssnnglv lpsgvnmpps sldshdycdq dlwlcgnesg
61 sfggsnnggl sqqqqsvitl amhgcsstlp aqttiiping nangnggstn ggyvpgatnl
121 galangmlng gfngmqqqiq nghglinstt pstpttplhl qqnlggaggg giggmgilhh
181 angtpnglig vvgggggvgl gvgggggvgl gmqhtprds vnsissgrdd lspssslngy
241 sanescdak skkgpaprvg eelclvcgdr asgyhynalt cegckgffrr svtksavycs
301 kfgracemdm ymrrkcqecr lkkclavgmr pecvvpengc amkrrekkaq kekdkmmtsp
361 ssqhgngsl asggggdfvk keildlmtce ppqhatipll pdeilakcga rnipsltynq
421 laviykliwy qdgyeqpsee dlrrimsqpd enesqtdvsf rhiteitilt vqlivefakg
481 lpaftkipqe dqitllkacs sevmmlrmar rydhssdsif fannrsytrd sykmagmadn

541 iedllhfcrq mfsmkvdnve yalltaivif sdrpglekaq lveaiqsyyi dtlriyilnr
601 hcgdsmslvf yakllsilte lrtlgngnae mcfslklknr klpkfleeiw dvhaippsvq
661 shlqitqeen erleraermr asvggaitag idcdsastsa aaaaqhqpq pqpqpqpssl
721 tqndsqhqtq pqlqpqlppq lggqlqpqlq pqlqtqlqpq iqrpqqlpv sapvpasvta
781 pgslsavsts seymggsaai gpitpattss itaavtasst tsavpmgngv gvgvgvggnv
841 smyanaqtam almgvalhsh qeqliggvav ksehstta

```

[000221] DBD характеризуется присутствием двух цистеиновых 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 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 транскрипции содержит AD, DBD, который узнает чувствительный элемент, связанный с терапевтическим белком или терапевтическим полинуклеотидом, экспрессию которого нужно модулировать; и LBD ядерного рецептора группы H. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения, LBD ядерного рецептора группы H содержит мутацию с заменой.

[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 белки, кодируемые указанной первой последовательностью фактора транскрипции и указанной второй последовательностью фактора транскрипции, взаимодействуют с образованием белкового комплекса (LDTF), т.е., представляет собой генный переключатель, основанный на "двойном переключателе" или на "двухгибридной" системе. Первый и второй TSP могут быть одинаковыми или различными. В данном 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, 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 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 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 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 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, 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 факторов промоторов может быть функционально связан с различными 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 терапевтического продукта, экспрессию которого нужно модулировать; и лигандсвязывающий домен ядерного рецептора группы H, 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 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, 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, при этом один из лигандсвязывающих доменов ядерного рецептора представляет собой лигандсвязывающий домен ядерного рецептора группы H. 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, содержащий DBD и лигандсвязывающий домен ("LTF").

[000230] Если один лигандсвязывающий домен (LBD) ядерного рецептора представляет собой LBD группы H, другой лигандсвязывающий домен ядерного рецептора может быть получен из любого другого ядерного рецептора, который образует димер с LBD группы H. Например, когда LBD ядерного рецептора группы H 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 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 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 *Polyandrocara misakiensis* или медузы *Tripedalia cysophora*.

[000232] В одном варианте реализации настоящего изобретения, LBD 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 *Celaca 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 (GHNR) или его партнером, и образование 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 того, чтобы оптимизировать гибридные гены и полученные в результате этого гибридные белки в выбранной клетке-хозяине или организме по 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 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 регулируемые, 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 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 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 (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 иницирующим комплексом. 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. Opin. Cell Biol. 9: 222 (1997)). Также, кофакторы белков, широко известные как корепрессоры (также известные как репрессоры, сайленсеры или медиаторы сайленсинга), могут быть необходимы для эффективного ингибирования активации транскрипции в отсутствие 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, 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 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 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 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) FKBP, кодируемого последовательностью ДНК, которая избирательно гибридизуется с последовательностью ДНК, кодирующей FKBP по п. (1) или (2);

(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 FKBP: 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,

(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).

[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 FKBP 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 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 меньшей мере один домен активации транскрипции (например, домен активации транскрипции VP16 или р65). 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 из слитых белков. Сведения относительно системы экспрессии генов, а также лиганда, приведены в патентах США с номерами 6,187,757 В1, 6,649,595 В1, 6,509,152 В1, 6,479,653 В1 и 6,117,680 В1.

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

лиганда 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.

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

[000244] В одном варианте реализации, настоящее изобретение обеспечивает систему генного переключателя, содержащую (а) первый полинуклеотид, кодирующий 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 tet. Первый полинуклеотид, кодирующий трансактиваторный слитый белок, может содержать промотор терапевтического переключателя, как описано в других местах настоящего описания. Экспрессия летального белка повышена в отсутствие 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; 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 (а) 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 терапевтического переключателя. В системе Lac, lac-оперон инактивирован в отсутствие лактозы или ее синтетических аналогов, таких как изопропил-b-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 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.

D. 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:

- 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
- б. 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
 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.

[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 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 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

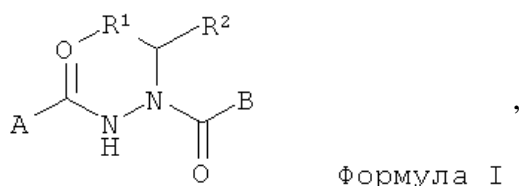
[000251] В данной заявке термин "лиганд", применительно к основанным на LDTFC генным переключателям, например, основанным на EcD-комплексе генным переключателям, описывает малые и растворимые молекулы, обладающие способностью активировать генный переключатель, чтобы стимулировать экспрессию полипептида. Лиганд для комплекса лиганд-зависимого фактора транскрипции согласно настоящему 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; оксадиазолины, описанные в опубликованной патентной заявке США номер 2004/0171651; дибензоилалкилциангидразины, 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-ди-трет-бутил-4-гидрокси-N-изобутилбензамид, 8-О-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 экдизона генного переключателя можно выбрать из любых подходящих лигандов. в качестве лиганда для генного переключателя согласно настоящему изобретению можно применять как встречающийся в природе экдизон или аналоги экдизона (например, 20-гидроксиэкдизон, муристерон А, понастерон А, понастерон В, понастерон С, 26-иодпонастерон А, инокостерон или 26-мезилинокостерон), так и нестероидные индукторы. В патенте США номер 6,379,945 В1 описан стероидный рецептор насекомого, выделенный из *Heliothis virescens* ("HEcR"), который способен действовать как генный переключатель, отвечающий как на стероидные, так и на некоторые нестероидные индукторы. Нестероидные индукторы имеют особое преимущество над стероидными, в этой и множестве других систем, которые отвечают как на стероидные, так и на нестероидные индукторы, по многим причинам, включая, например: более низкую стоимость изготовления, метаболическую стабильность, отсутствие у насекомых, растений или млекопитающих и приемлемость для окружающей среды. В патенте США номер 6,379,945 В1 описано применение двух дибензоилгидразинов, 1,2-дибензоил-1-трет-бутилгидразина и тебуфенозида (N-(4-этилбензоил)-N'-(3,5-диметилбензоил)-N'-трет-бутилгидразина), в качестве лигандов для основанного на экдизоне генного переключателя. Также включены в настоящее изобретение в качестве лигандов другие дибензоилгидразины, такие как описанные в патенте США номер 5,117,057 В1. Применение тебуфенозида в качестве химического лиганда для рецептора экдизона из *Drosophila melanogaster* также описано в патенте США номер 6,147,282. Дополнительные неограничивающие примеры экдизоновых лигандов представляют собой 3,5-ди-трет-бутил-4-гидрокси-N-изобутилбензамид, 8-О-ацетилгарпагид, 1,2-диацилгидразин, N'-замещенный-N,N'-двузамещенный гидразин, дибензоилалкилциангидразин, 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 экдизоне, представляет собой диацилгидразиновый лиганд или хиральный диацилгидразиновый лиганд. Лиганд, используемый в системе генного переключателя, может представлять собой соединения формулы I



где

A представляет собой алкоксил, арилалкилоксил или арилоксил;

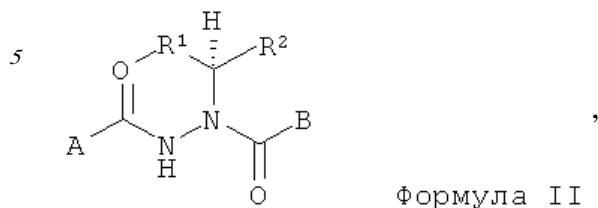
B представляет собой возможно содержащий заместители арил или возможно содержащий заместители гетероарил; и

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 энантимерно обогащенные соединения формулы II



10 где

А представляет собой алкоксил, 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

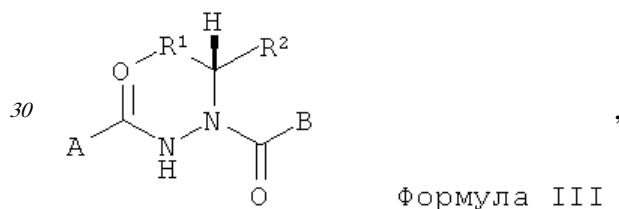
15 R^1 и R^2 независимо представляют собой возможно содержащий заместители алкил, арилалкил, гидроксиалкил, галоалкил, возможно содержащий заместители циклоалкил, возможно содержащий заместители алкенил, возможно содержащий заместители алкинил, возможно содержащий заместители гетероцикл, возможно содержащий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

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

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



где

35 А представляет собой алкоксил, 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 избытком, 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 экдизоне 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 тригалоуксусной кислотой, например, трифторуксусной кислотой), адипаты, альгинаты, аскорбаты, аспартаты, бензоаты, бензолсульфонаты, бисульфаты, бораты, бутираты, цитраты, камфораты, камфорсульфонаты, циклопентанпропионаты, диглюконаты, додецилсульфаты, этансульфонаты, фумараты, глюкогептаноаты, глицерофосфаты, гемисульфаты, гептаноаты, гексаноаты, гидрохлориды (образованные с соляной кислотой), гидробромиды (образованные с бромистым водородом), гидройодиды, 2-гидроксиэтансульфонаты, лактаты, малеаты (образованные с малеиновой кислотой), метансульфонаты (образованные с метансульфоновой кислотой), 2-нафталинсульфонаты, 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, ундеканоеаты 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(дегидроабетил)этилендиамином), N-метил-D-глюкаминами, N-метил-D-глюкамидами, 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 США с номерами 6,649,595 В2 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 находится в виде растворов, суспензий, таблеток, капсул, мазей, эликсиров или инъектируемых 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

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), которая содержит два слитых белка, домены DEF мутагенизированного рецептора экдизона (EcR), слитые со связывающим ДНК доменом Gal4, и домены EF химерного RXR, слитые с доменом активации транскрипции VP16, экспрессируемых под контролем конститутивного промотора, показанного на ФИГ.1.

[000265] Термины "модулируют" и "модулирует" означают индуцирование, 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 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.

[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 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 область (НТО)" относятся к последовательностям ДНК, расположенным по ходу транскрипции (3') от кодирующей последовательности, и могут содержать последовательности узнавания полиаденилирования [поли(А)] 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 посттранскрипционного процессинга первичного транскрипта, и называется зрелой РНК. "Информационная РНК (мРНК)" относится к РНК, которая не содержит интронов 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. "Антисмысловая 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 подразумевает исключаящим 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 глутаминовой 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 *t vitro* (Hutchinson и др., J. Biol. Chem. 253: 6551 (1978); Zoller и др., DNA 3-A79 (1984); Oliphant и др., Gene 44: 177 (1986);

Hutchinson и др., Proc. Natl. Acad. Set. USA 83: 710 (1986)), применение линкеров ТАВ[®] (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).

[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.

[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, характеризующиеся различиями в последовательностях нуклеотидов структурного гена, кодирующего белок, или могут включать альтернативный сплайсинг или посттрансляционные 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, (b) варианты, в которых одна или более аминокислот добавлены в полипептид или белок, (с) варианты, в которых одна или более аминокислот содержат замещающую группу, и (d) 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 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 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.

[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 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 последовательностей ДНК. Последовательности, которые являются по существу гомологичными, можно идентифицировать путем сравнения последовательностей, применяя стандартное программное обеспечение, доступное в базах данных 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).

[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 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 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 биологической активности кодируемых продуктов.

[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 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 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.

[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 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 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) 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 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 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" 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 (Gribkov, 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 b) 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 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 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, 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 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 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 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" относится к фактору транскрипции, включающему одну или более белковых субъединиц, 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 два члена семейства ядерных рецепторов: рецептор экдизона ("EcR") и белок ultraspiracle ("USP") (см. Yao и др., Nature 366: 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 (такие как DHR38, betaFTZ-1 или другие гомологи у насекомых), также могут быть лигандзависимыми 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, тетрамеры и другие мультимеры, обладающие такой же функцией.

[000296] LDTFC, такой как комплекс EcR, можно активировать активным
 5 экдистероидным или нестероидным 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
 10 нескольких полипептидных субъединиц, включающих аминоконцевой домен трансаактивации ("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 "НР". Гибридный белок, включающий AD и НР 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 трансаактивации на карбоксильном конце LBD. DBD характеризуется присутствием двух цистеиновых 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 лигандзависимыми 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 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 эрдистероидным или нестероидным лигандом, который связывается с одним из белков комплекса, включая EcR, но не исключая другие белки комплекса. В данной заявке термин "лиганд", 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, эрдистероид, такой как эрдизон, 20-гидроксиэрдизон, 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; оксадиазолины, описанные в опубликованной заявке на патент США номер 2004/0171651; дибензоилалкилциангидразины, 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 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 3,5-ди-трет-бутил-4-гидрокси-N-изобутилбензамид, 8-О-ацетилгарпагид, оксистерины, 22(R) гидроксистерин, 24(S)-гидроксистерин, 25-эпоксистерин, T0901317, 5-альфа-6-альфа-эпоксистерин-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 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, 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 аминоконцевого домена трансаактивации ("TA"), связывающего ДНК домена ("DBD") и лигандсвязывающего домена ("LBD"), разделенных шарнирным участком. Некоторые члены указанного семейства также могут включать другой домен трансаактивации на карбоксиконцевой стороне LBD. DBD характеризуется присутствием двух цистеиновых цинковых пальцев, между которыми расположены два аминокислотных мотива, Р-бокс и D-бокс, которые придают специфичность к чувствительным к эрдизону 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 археобактерии, 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 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 предпочтительными, так как в них обычно отсутствуют молекулы, которые придают EcR ответственность 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 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 (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, или регуляторным, элементом ДНК. Белок EcR, как и другие члены семейства ядерных рецепторов, содержат по меньшей мере три домена: домен трансактиваации, 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 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 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 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 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 подходящим промотором, вводят в клетки субъекта, экспрессия экзогенных генов контролируется присутствием лиганда
 5 согласно настоящему изобретению. Промоторы могут быть конститутивно или индуцибельно регулируемые 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
 10 терапевтического переключателя, описанный в способах, является конститутивным. 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,
 15 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,
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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, 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, глюкокортикоидом, эстрогеном, прогестинном, ретиноидом, экдизоном и их аналогами и миметиками), и гТТА, 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, 2007/0161086 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 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, 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 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, 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 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 суперсемейства ядерных рецепторов, все члены которого как правило характеризуются присутствием аминоконцевого домена трансаактивации (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 трансаактивации, "C" соответствует связывающему ДНК домену, "D" соответствует шарнирному участку и "E" соответствует лигандсвязывающему домену. Некоторые члены указанного семейства также могут содержать другой домен трансаактивации на карбоксильном конце лигандсвязывающего домена, соответствующий "F".

[000308] DBD характеризуется присутствием двух цистеиновых 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 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 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 рецептора группы H. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения, LBD ядерного рецептора группы H 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 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 переключателе" или на "двухгибридной" 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 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 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, DBD, который узнает чувствительный элемент, связанный с экзогенным геном, экспрессию которого нужно модулировать; и LBD ядерного рецептора группы H, 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 H. 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 H, другой LBD ядерного рецептора можно получить из любого другого ядерного рецептора, который образует димер с LBD группы H. Например, когда LBD ядерного рецептора группы H 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 *Polyandrocara 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 *Celaca 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

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

фрагмент RXR позвоночных видов и один полипептидный фрагмент RXR беспозвоночных видов недвукрылых/нечешуекрылых.

[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 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

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 Н и с партнером LBD ядерного рецептора позволяет экспрессию экзогенного гена. Этот механизм не исключает возможности связывания лиганда с ядерным

рецептором группы Н (GHR) или его партнером, и образования в результате этого активных гомодимерных комплексов (например, GHR+GHR 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 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 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.

[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 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 иницилирующим комплексом. Примеры таких коактиваторов включают RIP140, TIF1, RAP46/Bag-1, ARA70, SRC-1/NCoA-1, TIF2/GRIP/NCoA-2, ASTR/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 или медиаторы сайленсинга), могут быть необходимы для эффективного ингибирования активации транскрипции в отсутствие 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, 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 трансенов, которые будут экспрессироваться либо 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, 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.

[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 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.

[000326] Таким образом, как минимум, векторы должны включать полинуклеотиды согласно настоящему изобретению. Другие компоненты вектора могут включать селективируемые маркеры, домены модификации хроматина, дополнительные промоторы, запускающие экспрессию других полипептидов, которые также могут присутствовать на векторе (например, летального полипептида), сайты встраивания в геном, сайты 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, 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 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 означаемыми стандартные, хорошо известные способы отбора клеток с определенным генетическим составом или фенотипом. Обычные способы включают культивирование клеток в присутствии антибиотиков, таких как G418, неомицин и ампициллин, но не ограничиваются ими. Другие примеры селектируемых маркерных генов включают гены, которые придают устойчивость к дигидрофолатредуктазе, гистамицину или микофенольной кислоте, но не ограничиваются ими. Другие способы селекции включают селектируемый маркерный ген, который позволяет использовать в качестве селекционных агентов тимидинкиназу, 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, 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-инсуляторы, не ограничиваются ими. См. Ciavatta и др., Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A., 103: 9958 (2006). Примеры CMD включают инсулятор β -глобулина цыпленка и гиперчувствительный сайт 4 (сHS4) 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 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 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, эписомные 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, аденовирусы, вирусы оспы птиц, вирусы псевдобешенства 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 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. Кодированная часть зрелых транскриптов, экспрессируемых конструкциями, может содержать иницирующий 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 pCMVDsRed2-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, Afe 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 (HE). У ферментов HE большие асимметричные сайты рестрикции (12-40 пар оснований), и их сайты рестрикции редко встречаются в природе. Например, у HE, 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 HE сильно повышает вероятность того, что специалист в области генной инженерии сможет разрезать генную программу, не нарушая целостности генной программы, если сайты HE введены в подходящие положения клонирующей векторной плазмиды.

[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.

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 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. 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 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 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 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 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 O⁶-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 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

5 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.

10 [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, 15 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 суспензии.

[000343] Для терапевтических способов *ex vivo*, клетки выделяют из субъекта и 20 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 25 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 30 полинуклеотидов в клетках определяют перед введением клеток обратно субъекту. В другом варианте реализации настоящего изобретения, клетки, содержащие полинуклеотиды, отбирают (например, на основании присутствия селективируемого маркера в полинуклеотидах) и только такие клетки, содержащие указанные полинуклеотиды, вводят субъекту. После того как клетки ввели обратно субъекту, 35 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. Лиганд можно вводить с помощью любого 40 подходящего способа, либо системно (например, перорально, внутривенно), либо местно (например, интраперитонеально, интратекально, 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.

45 [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. Лиганд можно вводить с помощью любого подходящего способа, либо системно (например, перорально, внутривенно), либо местно (например, интраперитонеально, интратекально, интравентрикулярно или путем 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*, лиганды, описанные в данной заявке, можно принимать в фармацевтически приемлемых носителях, таких как, например, растворы, суспензии, таблетки, капсулы, мази, эликсиры и инъеклируемые композиции.

Фармацевтические композиции могут включать от 0.01% до 99% лиганда по весу. Композиции могут быть в виде лекарственных форм, содержащих одну либо множество 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, 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 аденовирусному 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 аденовирусному полинуклеотидному контрольному вектору, включающему ген IL-12 под контролем конститутивного промотора.

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

[000349] В данной заявке термин "белок, обладающий функцией иммуномодулятора", 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 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, BCG, TGF-альфа, PD-L1, TGFbRII DN, ICOS-L и S100. Аналогично, термин "белок, обладающий функцией IL-12", относится к белку, 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	
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.
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.
Интерлейкин-3 (IL-3)	IL-3 стимулирует пролиферацию гематопозитических 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).
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 гематопозитический 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. (Ни 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)	IFNB1 представляет собой член группы белков интерферонов, которые связываются со специфичными рецепторами на поверхности 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 анти-пролиферативное 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 (С-мотив) лиганд 1 (XCL1)	Хемокиновый (С-мотив) лиганд 1 (XCL1, также известный как лимфотактин) хемотаксичен 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
	представляет собой так называемый монокин (тип цитокина, продуцируемого, главным образом, моноцитами и макрофагами), который участвует в привлечении и активации полиморфоядерных 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.

5	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 В.
	Хемокиновый (СХС-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 (С-Х-С-мотив) лиганд 10 (CXCL10)	Хемокиновый (С-Х-С-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.
	Хемокиновый (С-Х-С-мотив) лиганд 12 (CXCL12)	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.
10	Хемокиновый (С-С-мотив) рецептор 7 (CCR7)	CCR7 представляет собой рецептор к MIP-3-бета хемокину. Вероятный медиатор действия EBV на В-лимфоциты или нормальных функций лимфоцитов.
	Хемокиновый (С-С-мотив) лиганд 19 (CCL19, также известный как MIP-3β)	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.
15	СС хемокиновый лиганд 21 (CCL21)	CCL21 ингибирует гемопоэз и стимулирует хемотаксис. CCL21 хемотаксичен in vitro для тимоцитов и активированных Т-клеток, но не для В-клеток, макрофагов или нейтрофилов.
	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.
20	Факторы роста	
	Колонистимулирующий фактор гранулоцитов/макрофагов (GM-CSF)	GM-CSF представляет собой цитокин, который стимулирует роет и дифференцировку гематопоэтических клеток-предшественников из различных линий, включая гранулоциты, макрофаги, эозинофилы и эритроциты.
	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.
30	Адьюванты	
	Бета-дефензин	Бета-дефензины представляют собой противомикробные пептиды, участвующие во врожденном иммунном ответе против многих грамотрицательных и грамположительных бактерий, грибов и вирусов.
	Белки высокомолекулярной группы-1 (HMGB1)	Белки высокомолекулярной 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.
	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.
35	Маннан	Маннан, полисахарид растений, который представляет собой полимер сахара маннозы, используют для выработки иммунного ответа.
	Бацилла Кальметта-Герена (BCG)	Бациллу 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.
40	Костимулирующие молекулы (положительный эффект)	
	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 BB (4-1BBL)	Лиганд 4-1 BB (4-1BBL) принадлежит к членам 9 суперсемейства лигандов фактора некроза опухоли (Tnfsf9), он представляет собой трансмембранный гликопротеин 2

Иммуномодулятор		Функция
45		
	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).	
	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, родственник семейства индуцируемых глюкокортикоидами рецепторов (GIR) может вызывать эффективный иммунитет к опухоли посредством стимуляции Т-клеток. Введение моноклонального антитела (mAb) против GIR может вызвать сильный противоопухолевый иммунитет и уничтожить развившиеся опухоли, не вызывая явных аутоиммунных заболеваний.

5	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.
	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. Ингибирование взаимодействия между PD-L1 и рецептором на Т-клетке с помощью антитела против PD-L1 приводит к снижению иммунного ответа, названного анергией иммунной клетки.
	Антитела против PD-L2	PD-12 участвует в передаче костимулирующего сигнала, необходимого для пролиферации Т-лимфоцитов и продукции

20	Иммуномодулятор	Функция
		IFN-гамма, независимо от PDCD1, но известно, что этот лиганд, главным образом, действует через PD-1, что приводит к анергическим ответам.
25	Молекулы, направленные против иммунных супрессоров (ингибиторы толерантности)	
	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 TGFRR2 H2-3FF, доступна в открытых базах данных под номером доступа M85079, и последовательность аминокислот, доступная под номером доступа AAA61164) нарушает экспрессию, зависимость от всех трех генов TGF-P (1, 2 и 3).
	Антитела против TGFβ	TGF-β представляет собой многофункциональный белок, который регулирует пролиферацию, дифференцировку и другие функции во многих типах клеток. TGF-β, действуя синергично с TGFα, вызывает трансформацию клеток. Он также действует как негативный аутокринный фактор роста. Нарушенная регуляция активации и передачи сигнала TGFβ 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

45 активности NK-клеток и цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов, стимуляцию экспрессии IL-12R-β1 и IL-12R-β2, 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, PHLN и 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 взаимозаменяемо.

[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, фибробласты, 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 декстрана 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 аденовирусных частиц, которые заражают отдельную клетку в конкретном эксперименте (например, рекомбинантного аденовируса или контрольного аденовируса).

[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 инсулиному поджелудочной железы, злокачественную карциноидную карциному, хориокарциному, фунгоидный микоз, злокачественную гиперкальцемию, 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 лейкофереза, 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 гематopoэтических стволовых

10 клеток человека вектором согласно настоящему изобретению, экспрессирующим 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 аденовирусный 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 аденовирусный челночный вектор под контролем промотора С убиквитина человека. Кодирующие последовательности для субъединиц р40 и р35 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 челночный вектор, несущий единицы транскрипции (VP16-RXR и Gal4-EcR) для двух гибридных белков и индуцируемые субъединицы IL-12, рекомбинированные с

25 аденовирусным 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.

[000368] В одном варианте реализации настоящего изобретения, последовательность гена иммуномодулятора и/или гена IL-12 представляет собой последовательность

40 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 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 лейкофереза, 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 аденовирусом, кодирующим иммуномодулятор и/или IL-12, экспрессия которых запускается с конститутивного или индуцируемого промотора, или инфицируют проверочным, контрольным аденовирусным вектором (rAch ψ 5), в диапазоне множественностей 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 содержащих 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 лиганды 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 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 Т-, НК- и НК-Т-клетки. Ожидается, что экспрессия IL-2 и IL-12 в клетках приведет к взаимному повышению экспрессии рецепторов друг друга и индуцирует 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 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; Horton и др. 2008. Полинуклеотидные последовательности IL-2 доступны под номерами доступа U25676 (человека); NM_008366 (мышь); NM_204153 (цыпленок) и NM_053836 (крысы). Полинуклеотидные последовательности IL-12 доступны под номерами доступа NM_000882 (IL12A человека); NM_002187 (IL12B человека); NM_008351 (IL12a мышь); NM_008352 (IL12b мышь); NM_213588 (IL12A цыпленок); NM_213571 (IL12B цыпленок); NM_053390 (IL12a крысы) и NM_022611 (IL12b крысы). SEQ ID NOS:13, 15, 21 и 23 кодируют IL-12 человека и мышь 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 Т-хелперных клеток и активацию НК-клеток. Вдобавок, 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 более интенсивные Th1-ответы против опухолевого антигена, чем когда дендритные клетки трансфицируют каждым цитокином отдельно.

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

[000382] В другом варианте реализации настоящего изобретения, дендритные клетки сконструированы таким образом, что они при определенных условиях экспрессируют 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 НК-клеток и активированных Т-клеток и поддерживает экспансию эффекторных Т-клеток. Сообщали, что IL-15 действовал синергично с IL-12 с повышением продукции IFN-гамма НК-клетками. Кока, 2004; Basak 2008; Lasek и др. 2004. Внутритропухоловая

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 НК-клеток. Биологическое действие IL-21 потенциально синергично с IL-12, так как обработка НК-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); 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.

[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 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 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 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 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. Ожидают, что комбинация IL-12 (активация Т-клеток) и GM-CSF (активация дендритных клеток) 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 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 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), CCL19 (MIP-3b), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10), CXCL12 (SDF-1) или CCL21 (6Ckine)) и IL-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.

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 гематопоеза. В исследованиях на животных, совместная внутриопухолевая инъекция двух отдельных аденовирусов, экспрессирующих IL-12 и CXCL10, привела к 100% регрессии опухолевых узелков, произошедших от линии клеток колоректальной аденокарциномы мыши CT26. Narvaiza и др., 2000, Emtage и др., 1999, описали два дважды рекомбинантных аденовирусных вектора, экспрессирующих либо IL2 и XCL1 (лимфотактин), либо IL-12 и XCL1. Внутриопухолевая инъекция указанных векторов в аденокарциномные опухоли груди у мышей вызвала эффективные противоопухолевые реакции и защитный иммунитет. В других исследованиях на животных, совместная трансдукция аденовирусных векторов, экспрессирующих IL-12 и CCL27, привела к регрессии опухоли и длительному специфичному иммунитету. Gao и др., 2007. Таким образом, ожидается, что совместная экспрессия хемокина и IL-12 согласно настоящему изобретению приведет к синергичной противоопухолевой активности.

[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 НК-клеток, и их способность ингибировать ангиогенез зависит от НК-клеток. Исследования на животных показали, что комбинированная терапия двумя аденовирусами, один из которых экспрессирует IP 10, а другой экспрессирует IL-12, привела к заметному совместному противоопухолевому действию. Narvaiza и др., 2000. В других исследованиях, аденовирусные 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 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 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 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 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 мигрируют в дренирующие опухоль лимфатические узлы; и 4) наиболее сильный иммунный коррелят результата терапии представляет собой уровень

опухолеспецифических CD8⁺ Т-клеток, перекрестно примированных терапией, а не количество инъецированных DC, оставшихся в микроокружении опухоли. В целом, полученные результаты позволяют предположить, что основанные на DC.IL12 методы лечения, вероятно, успешны благодаря положительному влиянию на афферентные события (перекрестное примирование) эффекторов CD8⁺ Т-клеток 1 типа, но не на более поздние эфферентные события, такие как опосредованное инъецированными DC 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 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, 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 ингибирования путей клеточной гибели внутри клеток), антитела против SOCS1, мiPНК или рецепторы-ловушки (для ингибирования передачи супрессорного сигнала цитокинов внутри клеток) или антитела против TGFa.

[000391] Получали рекомбинантные аденовирусы, несущие полинуклеотидные

последовательности, показанные на Фигурах 1-8. Например, hIL-21 получали путем совместной трансфекции вектора экспрессии hIL-21, линейаризованного с помощью рестрикционного расщепления в сайте, расположенном против хода транскрипции от левого ITR, и подходящего (например, с удаленным E3) аденовирусного остова в пермиссивную линию клеток, такую как клетки НЕК293. Аденовирусный 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. Аденовирусный 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 аденовирусом дендритных клеток и ежедневное пероральное введение в течение 14 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 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 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 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 дренирующей опухоль 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.

[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 (b) 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 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
10 определенных условиях, и (b) вектор, экспрессирующий IL-12, либо конститутивно, либо при определенных условиях, путем внутриопухолевой инъекции субъекту. 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 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 (b) субъекту вводят один или более противораковых
20 химиотерапевтических агентов. В предпочтительном варианте реализации настоящего 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
25 клеток или одновременно с введением сконструированных дендритных 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, (b) вектор, экспрессирующий IL-12, либо конститутивно, либо
35 при определенных условиях, путем внутриопухолевой инъекции субъекту, и (c) 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
40 настоящего изобретения, вектор, который вводят путем внутриопухолевой инъекции 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 (b) 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 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.

[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 (b) указанному субъекту вводят один или более противораковых химиотерапевтических 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 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 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, (b) 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 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 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,

экспрессирующего иммуномодулятор. 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:

a. 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;

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

c. введение указанному пациенту эффективного количества активирующего лиганда;

d. 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 I тестового уровня; и

e. 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

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

g. наблюдение регрессии опухоли в ответ на лечение.

[000403] Термин "субъект" означает интактное насекомое, растение или животное. Также ожидается, что лиганды 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 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⁺ Т-клеткам (продуцирующим IFN-гамма) как второстепенному ожидаемому результату исследования. Возможность включать и выключать экспрессию иммуномодулятора и/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.

[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.

[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.

[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.

[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 включена посредством ссылки.

ПРИМЕР 1

[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 Rensa.

[000411] В данном исследовании использовали две линии опухолевых клеток: Rensa и Rensa-НА. Последнюю линию клеток получали путем трансфекции клеток Rensa гемагглютинином вируса гриппа (НА). Преимущество модели Rensa-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 Rensa-НА у BALB/с 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 мыши):

1. Мыши, которым ничего не вводили;
2. Мыши, которым вводили 5×10^5 дендритных клеток, трансдуцированных контрольной плазмидой;
3. Мыши, которым вводили 10^6 дендритных клеток, трансдуцированных контрольной плазмидой;
4. Мыши, которым вводили 5×10^6 дендритных клеток, трансдуцированных контрольной плазмидой;
5. Тех же, что и в группах 2-4, применяя дендритные клетки, трансдуцированные IL-12;
6. Тех же, что и в группах 2-4, применяя дендритные клетки, трансдуцированные IL-15; и
7. Тех же, что и в группах 2-4, применяя дендритные клетки, трансдуцированные IL-21.

Для тестирования влияния комбинации различных цитокинов, мышам одновременно вводили:

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

1. ELISPOT IFN- γ и IL-2;
2. Анализ пролиферации Т-клеток;
3. Обнаружение высвобождения TNF α , IL-10, IL-4 и GM-CSF клетками лимфатических узлов.

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

[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.

[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 Rensa-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 аденовирусом. Чтобы достигнуть статистической значимости, в каждую группу включали по 10 мышей.

[000424] Оценивали рост опухоли. Опухоль Rensa-НА содержит иммуногенный эпитоп, который полезен для иммунологического контроля и предварительного тестирования противоопухолевого действия. Тем не менее, чтобы проверить потенциальную противоопухолевую активность лечения, нужно использовать нетрансфицированные опухолевые клетки. Следовательно, эксперименты, описанные выше, повторяли с применением модели опухоли Rensa.

ПРИМЕР 2

[000425] Безопасность, переносимость, функционирование трансгена и иммунологическое действие внутриопухолевой инъекции(й) трансдуцированных аденовирусом 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.

[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 аденовирусом аутологических (введенных обратно тому же субъекту, от которого они произошли) дендритных клеток (DC), сконструированных таким образом, что они 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) аденовирусным вектором, для индуцируемой экспрессии IL-12 человека и одного или нескольких других иммуномодуляторов. Продукцию IL-12 и одного или нескольких других иммуномодуляторов инъектированными DC "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), измерения показателей жизнедеятельности, химического анализа сыворотки, анализа мочи, гематологии, возникновения нежелательных "побочных эффектов" и антител и клеточного иммунного ответа на аденовирус, компоненты RTS и активирующее средство. Чтобы оценить улучшение, измеряли однократную и стационарную 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 (Т-клетки) в биоптатах целевых опухолей, дренирующих опухоли лимфатических узлах и периферическом кровообращении, а также измеряли профиль цитокинов в сыворотке.

[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 аденовирусным вектором, кодирующим IL-

12 человека и один или более других иммуномодуляторов под контролем RTS. Например, субъектам осуществляли внутриопухолевую инъекцию аутологических DC, трансдуцированных аденовирусным 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. Дополнительную инъекцию(и) трансдуцированных аденовирусом 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 сконструированных *in vitro* дендритных клеток, перед включением в исследование следующих субъектов, получающих более высокие дозы активирующего средства. 10
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 для субъекта, если наблюдается токсичность или субъект получает дополнительную инъекцию(и) дендритных клеток. 20

- [000429] Такое исследование демонстрирует безопасность и переносимость однократной или многократной внутриопухолевой инъекции(й) трансдуцированных аденовирусом 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 аденовирусом 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 аденовирусом аутологических дендритных клеток в отношении клеточного иммунного ответа в целевой опухоли, дренирующих ее лимфатических узлах и периферическом кровообращении после перорального введения активирующего средства. 30
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 внутриопухолевой инъекции и биопсии. Субъекты, включенные в исследование, имели неоперабельную меланому III или IV 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. 40

Получение аденовируса, несущего терапевтическую систему RheoSwitch, ML-12 и один или более других иммуномодуляторов.

- 45 [000431] Рекомбинантную ДНК переносили в дендритные клетки (DC) путем трансдукции аденовирусного вектора *ex vivo*. Рекомбинантную ДНК применяли для экспрессии IL-12 человека (p70) и одного или нескольких других иммуномодуляторов инъектированными 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 аденовирусного 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 экдизона 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 экдизона насекомого *Choristoneura fumiferana*. VP16-RXR собой слитые домен 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 аденовируса 5 в сайт, где участок E1 был удален. В аденовирусном остоле также отсутствует ген E3. Карта для аденовирусного вектора Ad-RTS-hIL-12

30 показана на ФИГ.8 в US 2009/0123441 A1.

[000433] Рекомбинантный аденовирусный вектор, применяемый в данном исследовании, содержит следующие типичные регуляторные элементы, вдобавок к последовательностям вирусного 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 полиаденилирования 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 аденовирусный 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 аденовирусный челночный 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 аденовируса 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, несущий RTS-hIL-12-иммуномодулятор(ы), тестировали, с помощью временной трансфекции им клеток HT-1080, на зависимость от присутствия активирующего средства экспрессию IL-12 и другого иммуномодулятора(ов). Челночный вектор затем объединяли с аденовирусным остовом путем совместной трансфекции ими клеток НЕК 293 с получением рекомбинантного аденовируса Ad-RTS-hIL-12-иммуномодулятор(ы). В аденовирусном остове удалены последовательности с 0 по 9.2 е.к. с левого конца генома и ген E3. Челночный вектор и аденовирусный остов содержат перекрывающуюся последовательность с е.к. 9.2 по е.к. 16, которая позволяет рекомбинацию между ними и получение рекомбинантного аденовирусного вектора. Так как в рекомбинантном аденовирусном векторе отсутствуют участки E1 и E3, вирус не может реплицироваться в нормальных клетках млекопитающих. Тем не менее, вирус может реплицироваться в клетках НЕК 293, которые содержат участок E1 аденовируса-5 и, следовательно, обеспечивают функционирование E1 в транспозиции.

[000435] Типичный рекомбинантный аденовирусный вектор получали следующим способом. Линеаризованным челночным вектором, несущим элементы ДНК для индуцируемой экспрессии IL-12 человека и одного или нескольких Других иммуномодуляторов, и аденовирусным остовом совместно трансфицировали клетки НЕК293. Рекомбинация между перекрывающимися последовательностями на челночном векторе и вирусном остове приводила к получению рекомбинантного аденовируса и его упаковыванию в вирусные частицы в клетках НЕК293. Клетки НЕК293 выращивали в среде DMEM, содержащей фетальную бычью сыворотку.

[000436] Вирус, используемый для предложенного исследования, очищали путем центрифугирования в градиенте плотности CsCl. Рекомбинантный аденовирус подвергали двум раундам очистки бляшек и полученный в результате этого материал для посева использовали для получения основного вирусного банка (MVB) путем 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 аденовируса (RCA), стерильность, присутствие микоплазмы, случайных вирусов, ретровируса, вирусов человека HIV1/2, HTLV1/2, HAV, HBV, HCV, EBV, В 19, CMV, HHV-6, 7 и 8, бычьих и свинных" 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 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 в линиях клеток человека.

Трансдукция аутологических дендритных клеток аденовирусом, включающим трансген hiL-12 и один или более других иммуномодуляторов и терапевтическую систему Rheoswitch[®] (RTS)

[000438] Дендритные клетки, полученные из людей, трансдуцировали *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, клетки промывали повторно, чтобы удалить любой непоглощенный вирус. Супернатант с последней промывки тестировали на содержание остаточного вируса с помощью ПЦР. Так как DC трансдуцировали *ex vivo* с помощью аденовирусного вектора (невстраивающийся вирус) и время жизни DC после внутриопухолевой инъекции и 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 аденовирусной трансдукции DC, позволит получить 80-90% трансдукции, и считали его очень эффективным.

[000439] Сбор РВМС (мононуклеаров периферической крови) путем лейкоафереза: Субъектов подвергали стандартному лейкоаферезу от 90 до 120 минут на устройстве для афереза от UPCI Outpatient. Процедура лейкоафереза 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 чем 15% общего объема крови субъекта одновременно, когда кровь пропусклась 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 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 лейкоафереза, и должен подвергнуть его обычному скринингу на показатели жизнедеятельности (включая 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 ресуспендировали при концентрации от 5 до 10×10^6 клеток/мл в бессывороточной и свободной от антибиотиков среде CellGenix, содержащей 1000 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 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 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 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) способны продуцировать IL-12p70 самопроизвольно или при активации CD40L с добавлением или без сигналов врожденного иммунитета (например, LPS). Недавно учредили стандартизированный 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 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 Luminox. Данный анализ эффективности имеет коэффициент вариации для серии анализов 18.5% (n=30) и широкий динамический диапазон, что способствует оценке продуктов различных DC, характеризующихся 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.

Критерии продукции и высвобождения для дендритных клеток.

[000447] Каждую партию полученных *in vitro* дендритных клеток тестировали на присутствие микробных контаминантов (аэробных и анаэробных бактерий, грибов и микоплазмы), а также эндотоксина, и описывали фенотипически и функционально. Все дендритные клетки для инъектирования субъектам должны быть свежими и не 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 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-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

двухцветовой 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., Уолкервилль, 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. Нетрансдуцированные и

25 трансдуцированные дендритные клетки подвергали криоконсервированию для дальнейшего анализа.

[000454] Ожидали, что все трансдуцированные клетки будут экспрессировать трансген. Ожидали, что более чем 80% DC трансдуцированы. Продукт должен быть биологически активным, так как в трансгене сохраняется нативная кодирующая последовательность.

30 Трансдуцированные 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

35 осуществлялась с трансгена. Так как экспрессия трансгена, содержащего IL-12 и один или более других иммуномодуляторов, индуцировалась низкомолекулярным активирующим средством RG-115932 зависимым от дозы образом, можно было поддерживать уровень экспрессии трансгена в трансдуцированных DC на желательных уровнях. Небольшую часть трансдуцированных 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, трансдуцированных 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 трансдуцированных 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.

[000456] Например, *in vitro*, линии клеток человека и мыши и первичные дендритные клетки, Трансдуцированные рекомбинантным аденовирусным 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

[000457] Активирующее средство, применяемое в данной заявке, входит в состав любой из следующих лекарственных форм:

(1) 100% лабразол;

(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

(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

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).

[000459] 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

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 однократную внутриопухолевую инъекцию трансдуцированных аденовирусом

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 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 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 аденовируса и/или компонентов RTS. Также получали профиль цитокинов в сыворотке, чтобы определить, влияет ли на экспрессию других цитокинов 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 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 сыворотки, анализа мочи и гематологии (показателей безопасности). Кровь отбирали в день 14 ± 24 часа для анализа на наличие антител и клеточного иммунного ответа против аденовируса 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 пациентов и амбулаторных пациентов, чтобы измерить наличие антител и клеточного иммунного ответа на аденовирус и компоненты RTS. Кровь получали для измерения базового профиля цитокинов в сыворотке. Для обнаружения гуморального ответа на аденовирусный вектор применяли анализ блокирования инфицирующей способности AdVeGFP (Gambotto, Robins и др. 2004). Гуморальный ответ на компоненты RTS 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 крови.

[000463] Возможный гуморальный и клеточный иммунный ответ на аденовирус 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 аденовирус и компоненты RTS, и на опухолевые антигены. Для обнаружения гуморального ответа на аденовирусный 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 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 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 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, 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

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.

[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 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:

1. Отсутствовала ограничивающая токсичность,
2. Заболевания субъекта было стабильным или проявило клинические или субъективные признаки улучшения, и
3. Отсутствовали признаки гуморального или клеточного иммунного ответа на аденовирусные компоненты терапевтической системы RheoSwitch[®].

[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. 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.

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 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, TNF α , IL-4, IL-5 и IL-10. Для данных анализов на антитела и цитокины требовалось приблизительно 10 мл крови.

[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 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 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).

[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.

Литература

Abdalla, 2007.

Abdi K, Singh N, Matzinger P (2006). T-cell control of IL-12p75 production. Scand J Immunol 64: 83-92.

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.

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, Wilttrout 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.

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 trypomastigotes. *Infect Immun* 64: 1961-7.

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.

Alii RS, Khar A (2004). Interleukin-12 secreted by mature dendritic cells mediates activation of NK cell function. *FEBS Lett* 559: 71-6.

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.

Araujo MI, Bliss SK, Suzuki Y, Alcaraz A, Denkers EY, Pearce EJ (2001). Interleukin-12 promotes pathologic liver changes and death in mice coinfectd 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.

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, Hilken CM (2004). Sustained IL-12 signaling is required for Th1 development. *J Immunol* 172: 61-9.

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 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.

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 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 Lymphotoxin and Interleukin 2 or Lymphotoxin 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 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 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 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 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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*.

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., Geertsens, 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.

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., 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.

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.

Inuma, H., Okinaga, K., Fukushima, R., Inaba, T., Iwasaki, K., Okinaga, A., Takahashi, I. and 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.

Basak, G.W., Zapala, L., Wysocki, P.J., Mackiewicz, A., Jakóbsiak, 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 Jakóbsiak, 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.

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.

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.

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.

Huang, H. and Xiang, J. (2004) Synergistic effect of lymphotactin 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 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 аденовирусный 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 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 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.

7. Способ получения популяции иммунных клеток или вспомогательных клеток для терапии (TSC), экспрессирующих иммуномодуляторные полипептиды, включающий модифицирование указанных клеток рекомбинантным вектором по п. 1, причем указанный способ не включает использования клеток эмбриона человека.

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 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.

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.

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.
- <120> 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
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Synthetic mIL-12 and mIL-21
- <400> 1
- | | |
|---|------|
| taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgacg tctaagaaac | 60 |
| cattattatc atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc acgaggccct ttcgtcttca | 120 |
| attaatcgca ccggtatcta tgtcgggtgc ggagaaagag gtaatgaaat ggcagctagc | 180 |
| atcatcaata atatacctta ttttgattg aagccaatat gataatgagg gggaggagtt | 240 |
| tgtgacgtgg cgcggggcgt gggaacgggg cgggtgacgt agtagtgtgg cggaagtgtg | 300 |
| atgttgcaag tgtggcggaa cacatgtaag cgacggatgt ggcaaaagtg acgttttttg | 360 |
| tgtgcgccgg tgtacacagg aagtgacaat tttcgcgcgg ttttaggcgg atgttgtagt | 420 |
| aaatttgggc gtaaccgagt aagatttggc cattttcgcg ggaaaactga ataagaggaa | 480 |
| gtgaaatctg aataattttg tgttactcat agcgcgtaat atttgtctag ggagatccgg | 540 |
| taccgatatc ctagacaacg atgctgagct aactataacg gtcctaaggt agcgaccgcg | 600 |
| gagactaggt gtatttatct aagcgatcgc ttaattaagg ccggccgccg caataaaata | 660 |
| tctttatttt cattacatct gtgtgttggg tttttgtgtg aatccatagt actaacatac | 720 |
| gctctccatc aaaacaaaac gaaacaaaac aaactagcaa aataggctgt ccccagtgca | 780 |
| agtccagggt ccagaacatt tctctatcca taatgcaggg gtaccgggtg atgacgggtga | 840 |
| aaacctcaa ttgcggagta ctgtcctccg agcggagtac tgctcctccga gcggagtact | 900 |
| gtcctccgag cggagtactg tcctccgagc ggagtactgt cctccgagcg gagtactgtc | 960 |
| ctccgagcgg agagtccccg gggacctaga gggatatataa tgggtgcctt agctgggtgtg | 1020 |
| tgacctcatc ttcctgtacg cccctgcagg ggcgcgccac gcgtcgaaga aggtgagtaa | 1080 |
| tcttaacatg ctcttttttt ttttttttgc taatcccttt tgtgtgctga tgtaggatg | 1140 |
| acatttacaa caaatgtttg ttcctgacag gaaaaacctt gctgggtacc ttcgttgccg | 1200 |

gacacttctt gtcctctact ttggaaaaaa ggaattgaga gccgctagcc caccatgtgc	1260
ccccagaagc tgaccatcag ctggttcgcc atcgtgctgc tggtagagccc cctgatggcc	1320
atgtgggagc tggagaagga cgtgtacgtg gtggagggtg actggacccc cgacgcccc	1380
ggcgagaccg tgaacctgac ttgcgacacc cccgaggagg acgacatcac ctggaccagc	1440
gaccagagac acggcgatcat cggcagcggc aagaccctga ccatcaccgt gaaggagtgc	1500
ctggacgccc gacagtacac ctgtcacaag ggcgggcaga ccctgagcca cagccacctg	1560
ttgctgcaca agaaggagaa cggcatctgg agcaccgaga tcctgaagaa cttcaagaac	1620
aagaccttcc tgaagtgcga ggcccccaac tacagcggca gattcacctg tagctggctg	1680
gtgcagagaa acatggacct gaagttcaac atcaagagca gcagcagcag ccccgacagc	1740
agagccgtga catgcggcat ggccagcctg agcgccgaga aggtgaccct ggaccagaga	1800
gactacgaga agtacagcgt gagctgccag gaggacgtga cctgtcccac cgccgaggag	1860
accctgccc a tcgagcttgc cctggaagcc agacagcaga acaagtacga gaactacagc	1920
accagcttct tcatcagaga catcatcaag cccgaccccc ccaagaacct ccagatgaag	1980
cccctgaaga acagccaggt ggaggtgtcc tgggagtacc ccgacagctg gagcaccccc	2040
cacagctact tcagcctgaa gttcttcgtg agaatccaga gaaagaagga gaagatgaag	2100
gagaccgagg agggctgcaa ccagaagggc gctttcctgg tggagaaaac cagcaccgag	2160
gtgcagtgca agggcggcaa cgtgtgtgtg caggcccagg acagatacta caacagcagc	2220
tgctccaagt gggcctgcgt gccctgccgc gtgagaagct gaatcgattg cgcaaagctc	2280
ccccctctcc tcccccccc ctaacgttac tggccgaagc cgcttggaat aaggccggtg	2340
tgcgtttgtc tatatgttat tttccaccat attgccgtct tttggcaatg tgagggccccg	2400
gaaacctggc cctgtcttct tgacgagcat tcctaggggt ctttcccctc tcgccaaagg	2460
aatgcaaggt ctgttgaatg tcgtgaagga agcagttcct ctggaagctt cttgaagaca	2520
aacaacgtct gtagcgaccc tttgcaggca gcggaacccc ccacctggcg acaggtgcct	2580
ctgcggccaa aagccacgtg tataagatac acctgcaaag gcggcacaac cccagtgcc	2640
cgttgtgagt tggatagttg tggaaagagt caaatggctc tcctcaagcg tattcaacaa	2700
ggggctgaag gatgcccaga aggtacccca ttgtatggga tctgatctgg ggcctcgggtg	2760
cacatgcttt acatgtgttt agtcgagggt aaaaaacgtc taggcccccc gaaccacggg	2820
gacgtgggtt tcctttgaaa aacacgatct cttaagtcta gcgccaccat gtgccagagc	2880
agatacctgt tgttcctggc taccctggcc ctgctgaacc acctgagcct ggcccgcgtg	2940
atccccgtga gcggccccgc cagatgcctg agccagagca gaaacctgtt gaaaacaacc	3000
gacgacatgg tgaaaaccgc cagagagaag ctgaagcact acagctgcac cgccgaggac	3060
atcgaccagc aggacatcac cagagaccag accagcacc tgaaaacctg tctgcccctg	3120
gagctgcaca agaacgagag ctgcctggct accagagaga ccagcagcac caccagaggc	3180
agctgcctgc cccccagaa aaccagcctg atgatgacc tgtgcctggg cagcatctac	3240

gaggacctga agatgtacca gaccgagttc caggccatca acgccgccct gcaaaaccac	3300
aaccaccagc agatcatcct ggacaagggc atgttggtgg ccatcgacga gctgatgcag	3360
agcctgaacc acaacggcga gaccctgaga cagaagcccc ccgtgggcga ggccgacccc	3420
tacagagtga agatgaagct gtgcatcctg ctgcacgcct tcagcaccag agtggtgacc	3480
atcaacagag tgatgggcta cctgagcagc gcctgaatcg aatgcgcact cgagtggtat	3540
tacgtcaac ttcagaatct cactaaaaga atagatagtc ttcctttaac tgaaaatttt	3600
tccttacaaa cagatatgga cgtcactagc accaccatgg agaggaccct ggtgtgcctg	3660
gtggtgatct tcctgggcac cgtggcccac aagagcagcc cccagggacc cgacaggctg	3720
ctgatccggc tgagacacct gatcgacatc gtggagcagc tgaagattta cgagaacgac	3780
ctggacccc agctgctgtc cgccccccag gacgtgaagg gccactgcga gcacgccgcc	3840
ttcgctgct tccagaaggc caagctgaag cccagcaacc ccggcaacaa caagaccttc	3900
atcatcgacc tgggtggcca gctgagaagg aggctgcccg ccaggagggg cggcaagaag	3960
cagaagcaca tcgccaagtg ccccagctgc gacagctacg agaagcggac cccaaggag	4020
ttcctggaga ggctgaagtg gctgctgcaa aagatgatcc accagcacct gagctgaatc	4080
gcctgcgcag catgctcgcg acctaagtcg gccgctaaag tttacgtagc ggccgcgtcg	4140
acgatagctt gatgggtggc atccctgtga cccctcccca gtgcctctcc tggccctgga	4200
agttgccact ccagtgccca ccagccttgt cctaataaaa ttaagttgca tcattttgtc	4260
tgactaggtg tccttctata atattatggg gtggaggggg gtggtatgga gcaaggggca	4320
agttgggaag acaacctgta gggcctgcgg ggtctattgg gaaccaagct ggagtgcagt	4380
ggcacaatct tggctcactg caatctccgc ctcttggtt caagcgattc tcctgcctca	4440
gcctcccgag ttgttgggat tccaggcatg catgaccagg ctcagctaata ttttgttttt	4500
ttggtagaga cggggtttca ccatattggc caggctggtc tccaactcct aatctcaggt	4560
gatctacca ccttggcctc ccaaattgct gggattacag gcgtgaacca ctgctccctt	4620
ccctgtcctt ctgattttta aataactata ccagcaggag gacgtccaga cacagcatag	4680
gctacctggc catgcccac cggtgggaca tttgagttgc ttgcttggca ctgtcctctc	4740
atgcgttggg tccactcagt agatgcctgt tgaattctga tttaaatcgg tccgcgtacg	4800
gcgtggtagg tccgaacgaa tccatggatt accctgttat ccctatccgg agttaacctc	4860
gaggacttcg gaacttctag aaccagaccg ttcagtttaa acgctcttct cccctcgag	4920
ggcctccgcg ccgggttttg gcgcctcccc cgggcgcccc cctcctcacg gcgagcgctg	4980
ccacgtcaga cgaagggcgc agcgagcgtc ctgacccctc cggccggacg ctcaggacag	5040
cggcccgctg ctcataagac tcggccttag aaccccagta tcagcagaag gacattttag	5100
gacgggactt gggtgactct agggcactgg ttttctttcc agagagcgga acaggcgagg	5160
aaaagtagtc ctttctcggc gattctgcgg agggatctcc gtggggcggt gaacgccgat	5220
gattatataa ggacgcgccg ggtgtggcac agctagtctc gtcgcagccg ggatttgggt	5280

cgcggttctt gtttgtggat cgctgtgatc gtcacttggg gagtagcggg ctgctgggct	5340
gggtacgtgc gctcgggggtt ggcgagtgtg ttttgtgaag ttttttaggc accttttgaa	5400
atgtaatcat ttgggtcaat atgtaatttt cagtgttaga ctagtaaatt gtccgctaaa	5460
ttctggccgt ttttggcttt tttgttagac ggcatgcggg gggggggggg ggcaattggc	5520
caccatgggc cccaagaaga aaaggaagggt ggccccccc accgacgtga gcctgggcga	5580
cgagctgcac ctggacggcg aggacgtggc catggccac gccgacgcc tggacgactt	5640
cgacctggac atgctgggcg acggcgacag ccccgcccc ggcttcaccc cccacgacag	5700
cgccccctac ggcgccctgg acatggccga cttcgagttc gagcagatgt tcaccgacgc	5760
cctgggcacg gacgagtacg gcggccatat ggagatgccc gtggacagga ttctggaggc	5820
cgaactcgcc gtggagcaga aaagcgacca gggcgtggag ggccccggcg gaaccggcg	5880
cagcggcagc agccccaacg acccctgac caacatctgc caggccgccg acaagcagct	5940
gttcaccctg gtggagtggg ccaagaggat tccccacttc agcagcctgc ccctggacga	6000
ccaggtgatc ctgctgaggg ccgatggaa cgagctgctg atcgccagct tcagccacag	6060
gagcatcgac gtgagggacg gcatcctgct ggccaccggc ctgcacgtcc ataggaacag	6120
cgccacagc gccggagtgg gcgccatctt cgacagggtg ctgaccgagc tggtagcaa	6180
gatgagggac atgaggatgg acaagaccga gctgggctgc ctgagggcca tcatcctgtt	6240
caaccccgag gtgaggggccc tgaaaagcgc ccaggagggtg gagctgctga gggagaagg	6300
gtacgccgcc ctggaggagt acaccaggac caccacccc gacgagcccg gcagattcgc	6360
caagctgctg ctgaggctgc ccagcctgag gagcatcggc ctgaagtgcc tggagcacct	6420
gttcttcttc aggctgatcg gcgacgtgcc catcgacacc ttcctgatgg agatgctgga	6480
gagccccagc gacagctgag ccggcaactc gctgtagtaa ttccagcgag aggcagaggg	6540
agcgagcggg cggcgggcta gggtaggga gcccggcgag cagagctgcg ctgcgggcgt	6600
cctgggaagg gagatccgga gcgaataggg ggcttcgcct ctggcccagc cctcccgtg	6660
atccccagc cagcgggtgc caaccctagc cgcattcacg aaactttgcc catagcagcg	6720
ggcgggcact ttgactgga acttacaaca cccgagcaag gacgcgactc tcccagcgcg	6780
gggaggctat tctgcccatt tggggacact tccccgccgc tgccaggacc cgcttctctg	6840
aaaggctctc cttgcagctg cttagacgct ggattttttt cgggtagtgg aaaaccagca	6900
gcctcccgcg accagatctg ccaccatgaa gctgctgagc agcatcgagc aggcttgcga	6960
catctgcagg ctgaagaagc tgaagtgcag caaggagaag cccaagtgcg ccaagtgcct	7020
gaagaacaac tgggagtgca gatacagccc caagaccaag aggagcccc tgaccagggc	7080
ccacctgacc gaggtggaga gcaggctgga gaggtggag cagctgttcc tgctgatctt	7140
ccccagggag gacctggaca tgatcctgaa gatggacagc ctgcaagaca tcaaggccct	7200
gctgaccggc ctgttcgtgc aggacaacgt gaacaaggac gccgtgaccg acaggctggc	7260
cagcgtggag accgacatgc ccctgaccct gaggcagcac aggatcagcg ccaccagcag	7320

cagcgaggag agcagcaaca agggccagag gcagctgacc gtgagccccg agtttccccg	7380
gatcaggccc gagtgcgtgg tgcccagagac ccagtgcgcc atgaaaagga aggagaagaa	7440
ggcccagaag gagaaggaca agctgcccgt gagcaccacc accgtcgatg accacatgcc	7500
ccccatcatg cagtgcgagc ccccccccc cgaggccgcc aggattcacg aggtcgtgcc	7560
caggttcctg agcgacaagc tgctggtgac caacaggcag aagaacatcc cccagctgac	7620
cgccaaccag cagttcctga tcgccaggct gatctggtat caggacggct acgagcagcc	7680
cagcgacgag gacctgaaaa ggatcaccca gacctggcag caggccgacg acgagaacga	7740
ggagagcgac acccccttca ggcagatcac cgagatgacc atcctgaccg tgcagctgat	7800
cgtggagttc gccaaaggcc tgcccggatt cgccaagatc agccagcccc accagatcac	7860
cctgctgaag gcttgacga gcgaggtgat gatgctgagg gtggccagga ggtacgacgc	7920
cgccagcgac agcatcctgt tcgccaacaa ccaggcttac accagggaca actacaggaa	7980
ggctggcatg gccgaggtga tcgaggacct cctgcacttc tgcagatgta tgtacagcat	8040
ggccctggac aacatccact acgccctgct gaccgccgtg gtgatcttca gcgacaggcc	8100
cggcctggag cagccccagc tgggtggagga gatccagagg tactacctga acaccctgag	8160
gatctacatc ctgaaccagc tgagcggcag cgccaggagc agcgtgatct acggcaagat	8220
cctgagcatc ctgagcgagc tgaggaccct gggaaatgcag aacagcaata tgtgtatcag	8280
cctgaagctg aagaacagga agctgcccc cttcctggag gagatttggg acgtggccga	8340
catgagccac acccagcccc cccccatcct ggagagcccc accaacctgt gaatcgatta	8400
gacatgataa gatacattga tgagtttggg caaaccacaa ctagaatgca gtgaaaaaaa	8460
tgcttaattt gtgaaatttg tgatgctatt gcttaatttg taaccattat aagctgcaat	8520
aaacaagtta ataaaacatt tgcattcatt ttatgtttca ggttcagggg gagatgtggg	8580
aggtttttta aagcaagtaa aacctctaca aatgtggtat ctagagctct tccaaataga	8640
tctggaaggt gctgaggtag gatgagaccc gcaccagggtg cagaccctgc gagtgtggcg	8700
gtaaacatat taggaaccag cctgtgatgc tggatgtgac cgaggagctg aggcccgatc	8760
acttggtgct ggcctgcacc cgcgctgagt ttggctctag cgatgaagat acagattgag	8820
gtactgaaat gtgtgggctg ggcttaaggg tgggaaagaa tatataaggt gggggtctta	8880
tgtagttttg tatctgtttt gcagcagccg ccgccgccat gagcaccaac tcgtttgatg	8940
gaagcattgt gagctcatat ttgacaacgc gcatgcccc atgggcccggg gtgcgtcaga	9000
atgtgatggg ctccagcatt gatggtcgcc ccgtcctgcc cgcaaactct actaccttga	9060
cctacgagac cgtgtctgga acgccgttg agactgcagc ctccgccgcc gcttcagccg	9120
ctgcagccac cgcccgcggg attgtgactg actttgcttt cctgagcccc cttgcaagca	9180
gtgcagcttc ccgttcatcc gcccgcgatg acaagttgac ggctcttttg gcacaattgg	9240
attctttgac ccgggaactt aatgtcgttt ctgagcagct gttggatctg cgccagcagg	9300
tttctgccct gaaggcttcc tcccctccca atgcgggttta aaacataaat aaaaaaccag	9360

actctgtttg gatttggatc aagcaagtgt cttgctgtct ttatttaggg gttttgcgcg 9420
 cgcggtaggc ccgggaccag cggctcgggt cgttgagggt cctgtgtatt ttttccagga 9480
 cgtggtaaag gtgactctgg atgttcagat acatgggcat aagcccgtct ctgggggtga 9540
 ggtagacca ctgcagagct tcatgctgcg ggggtggtgt gtagatgac cagtcgtagc 9600
 aggagcgctg ggcgtggtgc ctaaaaatgt ctttcagtag caagctgatt gccaggggca 9660
 ggcccttgggt gtaagtgttt acaaagcgggt taagctggga tgggtgcata cgtgggggata 9720
 tgagatgcat cttggactgt atttttaggt tggctatgtt cccagccata tccctccggg 9780
 gattcatgtt gtgcagaacc accagcacag tgtatccgggt gcacttggga aatttgtcat 9840
 gtagcttaga aggaaatgcg tggagaact tggagacgcc cttgtgacct ccaagatttt 9900
 ccatgcattc gtccataatg atggcaatgg gccacgggc ggcggcctgg gcgaagatat 9960
 ttctgggatc actaacgtca tagttgtgtt ccaggatgag atcgtcatag gccattttta 10020
 caaagcgcgg gcggaggggt ccagactgcg gtataatggt tccatccggc ccaggggctg 10080
 agttaccctc acagatttgc atttcccacg ctttgagttc agatgggggg atcatgtcta 10140
 cctgcggggc gatgaagaaa acggtttccg gggtagggga gatcagctgg gaagaaagca 10200
 ggttcctgag cagctgcgac ttaccgcagc cggtagggcc gtaaatacaca cctattaccg 10260
 ggtgcaactg gtagttaaga gagctgcagc tgccgtcatc cctgagcagg ggggccactt 10320
 cgttaagcat gtccctgact cgcattgttt ccctgaccaa atccgccaga aggcgctcgc 10380
 cgcccagcga tagcagttct tgcaaggaag caaagttttt caacggtttg agaccgtccg 10440
 ccgtaggcat gcttttgagc gtttgaccaa gcagttccag gcggtcccac agctcgttca 10500
 cctgctctac ggcattctga tccagcatat ctctcgttt cgcggggttg ggcggctttc 10560
 gctgtacggc agtagtcggt gctcgtccag acgggccagg gtcattgttt tccacgggag 10620
 cagggtcctc gtcagcgtag tctgggtcac ggtgaagggg tgcgctccgg gctgcgcgct 10680
 ggccaggggt cgcttgaggc tggctcgtgt ggtgctgaag cgctgccgggt cttcgccctg 10740
 cgcgctcggc aggtagcatt tgaccatggt gtcattgtcc agccccctcg cggcgtggcc 10800
 cttggcgcgc agcttgccct tggaggaggc gccgcacgag gggcagtgca gacttttgag 10860
 ggcgtagagc ttgggcgcga gaaataccga ttccggggag taggcatccg cgccgcaggc 10920
 cccgcagacg gtctcgcatt ccacgagcca ggtgagctct ggccgttcgg ggtcaaaaac 10980
 caggtttccc ccatgctttt tgatgcgttt cttacctctg gtttccatga gccggtgtcc 11040
 acgctcgggt acgaaaaggc tgtccgtgtc cccgtataca gacttgagag gcctgtcctc 11100
 gaccgatgcc cttgagagcc ttcaaccag tcagctcctt ccggtgggag cggggcatga 11160
 ctatcgtcgc cgcacttatg actgtcttct ttatcatgca actcgtagga cagggtgccg 11220
 cagcgtctgt ggtcattttc ggcgaggacc gctttcgtg gagcgcgacg atgatcggcc 11280
 tgtcgcttgc ggtattcggg atcttgacg ccctcgtca agccttcgtc actggtcccc 11340
 ccaccaaacg tttcggcgag aagcaggcca ttatcgccgg catggcggcc gacgcgctgg 11400

gctacgtctt gctggcggtc gcgacgcgag gctggatggc cttccccatt atgattcttc 11460
 tcgcttccgg cggcatcggg atgcccgcgt tgcaggccat gctgtccagg caggtagatg 11520
 acgaccatca gggacagctt caaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt 11580
 tgctggcggtt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgtcaa 11640
 gtcagagggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct 11700
 ccctcgtagc ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc 11760
 cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg 11820
 tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgac cgctgcgcct 11880
 tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaaagaca cgacttatcg cactggcag 11940
 cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga 12000
 agtgggtggc taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggatatctgc gctctgtga 12060
 agccagttac cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaaca accaccgctg 12120
 gtagcgggtg ttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaa ggatctcaag 12180
 aagatccttt gatcttttct acggggtctg acgctcagt gaacgaaaac tcacgttaag 12240
 ggattttggt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat 12300
 gaagtttta atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct 12360
 taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttctg ttcattcata gttgcctgac 12420
 tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa 12480
 tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc cagatttatc agcaataaac cagccagccg 12540
 gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt 12600
 gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcca 12660
 ttgctgcagg catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcattc agctccggtt 12720
 cccaacgatc aaggcgagtt acatgatccc ccatgttgtg caaaaaagcg gttagctcct 12780
 tcggtcctcc gatcgttgctc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg 12840
 cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactgggtg 12900
 agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg 12960
 cgtcaacacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa 13020
 aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgaagt 13080
 aaccactcg tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt 13140
 gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aaggcgaca cggaaatgtt 13200
 gaatactcat actcttcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca 13260
 tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaa 13294

<210> 2
 <211> 13333
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic hIL-12 and hIL-21

<400> 2

taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgacg tctaagaaac	60
cattattatc atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc acgaggccct ttcgtcttca	120
attaatcgca ccggtatcta tgtcgggtgc ggagaaagag gtaatgaaat ggcagctagc	180
atcatcaata atatacctta ttttggattg aagccaatat gataatgagg ggggtggagt	240
tgtgacgtgg cgcggggcgt gggaacgggg cgggtgacgt agtagtgtgg cggaagtgtg	300
atgttgcaag tgtggcggaa cacatgtaag cgacggatgt ggcaaaagtg acgtttttgg	360
tgtgcgccgg tgtacacagg aagtgacaat tttcgcgcgg ttttaggcgg atgttgtagt	420
aaatttgggc gtaaccgagt aagatttggc cattttcgcg ggaaaactga ataagaggaa	480
gtgaaatctg aataattttg tgttactcat agcgcgtaat atttgtctag ggagatccgg	540
taccgatatc ctagacaacg atgctgagct aactataacg gtcctaaggt agcgaccgcg	600
gagactaggt gtatttatct aagcgatcgc ttaattaagg ccggccgccc caataaaata	660
tctttatfff cattacatct gtgtgttggg tttttgtgtg aatccatagt actaacatac	720
gctctccatc aaaacaaaac gaaacaaaac aaactagcaa aataggctgt cccagtgca	780
agtccaggtg ccagaacatt tctctatcca taatgcaggg gtaccgggtg atgacgggtga	840
aaacctccaa ttgcggagta ctgtcctccg agcggagtac tgtcctccga gcggagtact	900
gtcctccgag cggagtactg tcctccgagc ggagtactgt cctccgagcg gagtactgtc	960
ctccgagcgg agagtccccg gggacctaga gggatatataa tgggtgcctt agctgggtgtg	1020
tgacctcatc ttcctgtacg cccctgcagg ggcgcgccac gcgtcgaaga aggtgagtaa	1080
tcttaacatg ctcttttttt ttttttttgc taatcccttt tgtgtgctga tgttaggatg	1140
acatttaca caaatgtttg ttcctgacag gaaaaacctt gctgggtacc ttcgttgccg	1200
gacacttctt gtcctctact ttggaaaaaa ggaattgaga gccgctagcc caccatgggt	1260
caccagcagt tggatcatctc ttggttttcc ctggtttttc tggcatctcc cctcgtggcc	1320
atatgggaac tgaagaaaga tgtttatgtc gtagaattgg attggtatcc ggatgcccct	1380
ggagaaatgg tggcctcac ctgtgacacc cctgaagaag atggtatcac ctggaccttg	1440
gaccagagca gtgaggtctt aggtcttggc aaaacctga ccatccaagt caaagagttt	1500
ggagatgctg gccagtacac ctgtcacaaa ggaggcgagg ttctaagcca ttcgctcctg	1560
ctgcttcaca aaaaggaaga tggaatttgg tccactgata ttttaaagga ccagaaagaa	1620
cccaaaaata agacctttct aagatgcgag gccaagaatt attctggacg tttcacctgc	1680
tggtggctga cgacaatcag tactgatttg acattcagtg tcaaaagcag cagaggctct	1740
tctgaccccc aaggggtgac gtgcggagct gctacactct ctgcagagag agtcagaggg	1800
gacaacaagg agtatgagta ctcagtggag tgccaggagg acagtgcctg cccagctgct	1860

gaggagagtc tgcccattga ggtcatggtg gatgccgttc acaagctcaa gtatgaaaac	1920
tacaccagca gcttcttcat cagggacatc atcaaacctg acccacccaa gaacttgag	1980
ctgaagccat taaagaattc tcggcaggtg gaggtcagct gggagtaccc tgacacctg	2040
agtactccac attcctactt ctccctgaca ttctgcgttc aggtccaggg caagagcaag	2100
agagaaaaga aagatagagt cttcacggac aagacctcag ccacgggtcat ctgccgcaaa	2160
aatgccagca ttagcgtgcg ggcccaggac cgctactata gtcactcttg gagcgaatgg	2220
gcatctgtgc cctgcagtta gatcgattgc gcaaagctcc ccctctccct ccccccccc	2280
taacgttact ggccgaagcc gcttgggaata aggccggtgt gcgtttgtct atatgttatt	2340
ttccaccata ttgccgtctt ttggcaatgt gagggcccg aaacctggcc ctgtcttctt	2400
gacgagcatt cctaggggtc tttcccctct cgccaaagga atgcaaggtc tgttgaatgt	2460
cgtgaaggaa gcagttcctc tggaagcttc ttgaagacaa acaacgtctg tagcgacct	2520
ttgcaggcag cggaaccccc cacctggcga caggtgcctc tgcggccaaa agccacgtgt	2580
ataagataca cctgcaaagg cggcacaacc ccagtgccac gttgtgagtt ggatagttgt	2640
ggaaagagtc aaatggctct cctcaagcgt attcaacaag gggctgaagg atgccagaa	2700
ggtaccccat tgtatgggat ctgatctggg gcctcgggtc acatgcttta catgtgttta	2760
gtcgaggtta aaaaacgtct agggcccccg aaccacgggg acgtggtttt ctttgaaaa	2820
acacgatctc ttaagtctag cgccaccatg ggtccagcgc gcagcctcct cttgtggct	2880
acctgggtcc tcctggacca cctcagtttg gccagaaacc tccccgtggc cactccagac	2940
ccaggaatgt tcccatgcct tcaccactcc caaaacctgc tgagggccgt cagcaacatg	3000
ctccagaagg ccagacaaac tctagaattt tacccttgca cttctgaaga gattgatcat	3060
gaagatatca caaaagataa aaccagcaca gtggaggcct gtttaccatt ggaattaacc	3120
aagaatgaga gttgcctaaa ttccagagag acctctttca taactaatgg gagttgcctg	3180
gcctccagaa agacctcttt tatgatggcc ctgtgcctta gtagtattta tgaagacttg	3240
aagatgtacc aggtggagtt caagaccatg aatgcaaagc ttctgatgga tcctaagagg	3300
cagatctttc tagatcaaaa catgctggca gttattgatg agctgatgca ggccctgaat	3360
ttcaacagtg agactgtgcc acaaaaatcc tcccttgaag aaccggattt ttataaaact	3420
aaaatcaagc tctgcatact tcttcatgct ttcagaattc gggcagtgac tattgataga	3480
gtgatgagct atctgaatgc ttctaaatc gaatgcgcac tcgagtggta ttacgctcaa	3540
cttcagaatc tcactaaaag aatagatagt cttccttta ctgaaaattt ttccttaca	3600
acagatatgg acgtcactag caccaccatg agaagcagcc ccggcaacat ggagagaatc	3660
gtgatctgcc tgatggtgat cttcctgggc accctggtgc ataagagcag cagccagggc	3720
caggacagac acatgatccg catgagacag ctgatcgaca tcgtggacca gctgaagaac	3780
tacgtgaacg acctggtgcc cgagttcctg cccgcccccg aggacgtgga gaccaactgc	3840
gagtggagcg cttcagctg cttccagaag gccagctga agtccgcaa caccggcaac	3900

aacgagagaa tcatcaacgt gagcatcaag aagctgaagc ggaagcccc cagcaccaac	3960
gccggaagaa gacagaagca cagactgacc tgtcccagct gcgacagcta cgagaagaag	4020
cccccaagg agttcctgga gagattcaag agcctgctgc aaaagatgat ccaccagcac	4080
ctgagcagca gaaccacg cagcgaggac agctgaatcg cctgcgcagc atgctcgcga	4140
cctaagtcgg ccgctaaagt ttacgtagcg gccgcgtcga cgatagcttg atgggtggca	4200
tccctgtgac ccctccccag tgcctctcct ggccctggaa gttgccactc cagtgccac	4260
cagccttgct ctaataaaat taagttgcat catTTTgtct gactaggtgt cttctataa	4320
tattatgggg tggagggggg tggtagggag caaggggcaa gttgggaaga caacctgtag	4380
ggcctgcggg gtctattggg aaccaagctg gaggcagtg gcacaatctt ggctcactgc	4440
aatctccgcc tcctgggttc aagcgattct cctgcctcag cctcccgagt tgttgggatt	4500
ccaggcatgc atgaccaggc tcagctaatt tttgtttttt tggtagagac ggggtttcac	4560
catattggcc aggctggtct ccaactccta atctcaggtg atctaccac cttggcctcc	4620
caaattgctg ggattacagg cgtgaaccac tgctcccttc cctgtccttc tgattttaaa	4680
ataactatac cagcaggagg acgtccagac acagcatagg ctacctggcc atgccaacc	4740
ggtgggacat ttgagttgct tgcttggcac tgcctctca tgcgttgggt ccactcagta	4800
gatgcctgtt gaattctgat ttaaactcgg cgcgtacgg cgtggtaggt ccgaacgaat	4860
ccatggatta ccctgttata cctatccgga gttaacctc aggacttcgg aacttctaga	4920
accagaccgt tcagtttaaa cgctcttctc cccctcgagg gcctccgcgc cgggttttgg	4980
cgctccgcgc gggcgcccc ctcctcacgg cgagcgctgc cacgtcagac gaagggcgca	5040
gcgagcgctc tgatccttc gcccgacgc tcaggacagc ggcccgctgc tcataagact	5100
cggccttaga accccagtat cagcagaagg acattttagg acgggacttg ggtgactcta	5160
gggcactggg tttctttcca gagagcgga caggcgagga aaagtagtcc cttctcggcg	5220
attctgcgga gggatctccg tggggcggtg aacgccgatg attatataag gacgcgccg	5280
gtgtggcaca gctagttccg tcgcagccgg gatttgggtc gcggttcttg tttgtggatc	5340
gctgtgatcg tcacttggtg agtagcggc tgctgggctg ggtacgtgcg ctcggggtg	5400
gcgagtgtgt tttgtgaagt tttttaggca cttttgaaa tgtaatcatt tgggtcaata	5460
tgtaattttc agtgtagac tagtaaattg tccgctaaat tctggccgtt tttggctttt	5520
ttgttagacg gcatgcgggg gggggggggg gcaattggcc accatgggccc ccaagaagaa	5580
aaggaagggtg gccccccca ccgacgtgag cctgggcgac gagctgcacc tggacggcga	5640
ggacgtggcc atggcccacg ccgacgccct ggacgacttc gacctggaca tgctgggcga	5700
cggcgacagc cccggcccc gcttcacccc ccacgacagc gccccctacg gcgccctgga	5760
catggccgac ttcgagttcg agcagatgtt caccgacgcc ctgggcatcg acgagtacgg	5820
cggccatatg gagatgcccg tggacaggat tctggaggcc gaactcgccg tggagcagaa	5880
aagcgaccag ggcgtggagg gccccggcg aaccggcggc agcggcagca gcccacga	5940

ccccgtgacc aacatctgcc aggccgccga caagcagctg ttcaccctgg tggagtgggc	6000
caagaggatt ccccaacttca gcagcctgcc cctggacgac caggtgatcc tgctgagggc	6060
cggatggaac gagctgctga tcgccagctt cagccacagg agcatcgacg tgagggacgg	6120
catcctgctg gccaccggcc tgcacgtcca taggaacagc gcccacagcg ccggagtggg	6180
cgccatcttc gacaggggtgc tgaccgagct ggtgagcaag atgagggaca tgaggatgga	6240
caagaccgag ctgggctgcc tgagggccat catcctgttc aaccccagg tgaggggctt	6300
gaaaagcgcc caggaggtgg agctgctgag ggagaagggtg tacgccgccc tggaggagta	6360
caccaggacc acccaccctcg acgagcccgg cagattcgcc aagctgctgc tgaggctgcc	6420
cagcctgagg agcatcggcc tgaagtgcct ggagcacctg ttcttcttca ggctgatcgg	6480
cgacgtgccc atcgacacct tcctgatgga gatgctggag agccccagcg acagctgagc	6540
cggcaactcg ctgtagtaat tccagcgaga ggcagagggg gcgagcgggc ggcgggctag	6600
ggtggaggag cccggcgagc agagctgcgc tgcgggcgtc ctgggaaggg agatccggag	6660
cgaatagggg gcttcgcctc tggcccagcc ctcccgtga tccccagcc agcggtcgc	6720
aaccctagcc gcatccacga aactttgccc atagcagcgg gcgggcactt tgcactggaa	6780
cttacaacac ccgagcaagg acgcgactct cccgacgcgg ggaggctatt ctgcccattt	6840
ggggacactt ccccgccgtc gccaggacct gcttctctga aaggctctcc ttgcagctgc	6900
ttagacgtg gatttttttc gggtagtgga aaaccagcag cctcccgcga ccagatctgc	6960
caccatgaag ctgctgagca gcatcgagca ggcttgcgac atctgcaggc tgaagaagct	7020
gaagtgcagc aaggagaagc ccaagtgcgc caagtgcctg aagaacaact gggagtgcag	7080
atacagcccc aagaccaaga ggagccccct gaccagggcc cacctgaccg aggtggagag	7140
caggctggag aggttgagc agctgttcct gctgatcttc cccagggagg acctggacat	7200
gatcctgaag atggacagcc tgcaagacat caaggccctg ctgaccggcc tgttcgtgca	7260
ggacaacgtg aacaaggacg ccgtgaccga caggctggcc agcgtggaga ccgacatgcc	7320
cctgaccctg aggcagcaca ggatcagcgc caccagcagc agcagggaga gcagcaacaa	7380
gggccagagg cagctgaccg tgagccccga gtttcccggg atcaggcccc agtgcggtgt	7440
gcccagagacc cagtgcgcca tgaaaaggaa ggagaagaag gcccagaagg agaaggacaa	7500
gctgcccgtg agcaccacca ccgtcgatga ccacatgccc cccatcatgc agtgcgagcc	7560
cccccccccc gaggccgcca ggattcacga ggtcgtgccc aggttcctga gcgacaagct	7620
gctggtgacc aacaggcaga agaacatccc ccagctgacc gccaaccagc agttcctgat	7680
cgccaggctg atctggtatc aggacggcta cgagcagccc agcgacgagg acctgaaaag	7740
gatcacccag acctggcagc aggccgacga cgagaacgag gagagcgaca cccccttcag	7800
gcagatcacc gagatgacca tcctgaccgt gcagctgac gtggagtctg ccaagggcct	7860
gcccggattc gccaagatca gccagcccga ccagatcacc ctgctgaagg cttgcagcag	7920
cgaggtgatg atgctgaggg tggccaggag gtacgacgcc gccagcgaca gcatcctgtt	7980

cgccaacaac caggcttaca ccagggacaa ctacaggaag gctggcatgg ccgaggtgat	8040
cgaggacctc ctgcacttct gcagatgtat gtacagcatg gccctggaca acatccacta	8100
cgccctgctg accgccgtgg tgatcttcag 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 agatttggga cgtggccgac atgagccaca cccagcccc	8400
ccccatcctg gagagcccca ccaacctgtg aatcgattag acatgataag atacattgat	8460
gagtttggac aaaccacaac tagaatgcag tgaaaaaaat gcttaatttg tgaaatttgt	8520
gatgctattg cttaatttgt aaccattata agctgcaata aacaagttaa taaaacattt	8580
gcattcattt tatgtttcag gttcaggggg agatgtggga ggttttttaa agcaagtaaa	8640
acctctacaa atgtggtatc tagagctctt ccaaatagat ctggaagggtg ctgaggtacg	8700
atgagacccg caccaggtgc agaccctgcg agtgtggcgg taaacatatt aggaaccagc	8760
ctgtgatgct ggatgtgacc gaggagctga ggcccgatca cttggtgctg gcctgcaccc	8820
gcgctgagtt tggctctagc gatgaagata cagattgagg tactgaaatg tgtgggcgtg	8880
gcttaagggg gggaaagaat atataagggtg ggggtcttat gtagttttgt atctgttttg	8940
cagcagccgc cgccgccatg agcaccaact cgtttgatgg aagcatttg agctcatatt	9000
tgacaacgcg catgccccca tgggcccggg tgcgtcagaa tgtgatgggc tccagcattg	9060
atggtcgccc cgtcctgccc gcaaactcta ctaccttgac ctacgagacc gtgtctggaa	9120
cgccgttga gactgcagcc tccgccgcg cttcagccgc tgcagccacc gcccgcgga	9180
ttgtgactga ctttgctttc ctgagcccgc ttgcaagcag tgcagcttcc cgttcatccg	9240
cccgcgatga caagttgacg gctcttttgg cacaattgga ttctttgacc cgggaactta	9300
atgtcgtttc tcagcagctg ttggatctgc gccagcaggt ttctgacctg aaggcttcct	9360
cccctcccaa tgcggtttta aacataaata aaaaaccaga ctctgttttg atttgatca	9420
agcaagtgtc ttgctgtctt tatttagggg ttttgcgcgc gcggtaggcc cgggaccagc	9480
ggtctcggtc gttgaggggtc ctgtgtattt tttccaggac gtggtaaagg tgactctgga	9540
tgttcagata catgggcata agcccgtctc tgggggtggag gtagcaccac tgcagagctt	9600
catgctgcgg ggtggtgttg tagatgatcc agtcgtagca ggagcgctgg gcgtggtgcc	9660
taaaaatgtc tttcagtagc aagctgattg ccagggggcag gcccttggtg taagtgttta	9720
caaagcgggt aagctgggat ggggtgcatac gtggggatat gagatgcatc ttggactgta	9780
tttttaggtt ggctatgttc ccagccatat ccctccgggg attcatgttg tgcagaacca	9840
ccagcacagt gtatccggtg cacttgggaa atttgtcatg tagcttagaa ggaaatgcgt	9900
ggaagaactt ggagacgccc ttgtgacctc caagattttc catgcattcg tccataatga	9960
tggcaatggg cccacgggcg gcggcctggg cgaagatatt tctgggatca ctaacgtcat	10020

agttgtgttc caggatgaga tcgtcatagg ccattttttac aaagcgcggg cggaggggtgc 10080
 cagactgcgg tataatgggt ccacccggcc caggggcgta gttaccctca cagatttgca 10140
 tttcccacgc tttgagttca gatgggggga tcatgtctac ctgcggggcg atgaagaaaa 10200
 cggtttccgg ggtaggggag atcagctggg aagaaagcag gttcctgagc agctgcgact 10260
 taccgcagcc ggtgggccc taaatcacac ctattaccgg gtgcaactgg tagttaagag 10320
 agctgcagct gccgtcatcc ctgagcaggg gggccacttc gttaagcatg tccctgactc 10380
 gcatgttttc cctgaccaa tccgccagaa ggcgctcgcc gccagcgat agcagttctt 10440
 gcaaggaagc aaagtttttc aacggtttga gaccgtccgc cgtaggcatg cttttgagcg 10500
 tttgaccaag cagttccagg cgggtcccaca gctcgggtcac ctgctctacg gcatctcgat 10560
 ccagcatatc tcctcgtttc gcgggttggg gcggctttcg ctgtacggca gtagtcggtg 10620
 ctcgtccaga cgggccaggg tcatgtcttt ccacgggccc agggctcctg tcagcgtagt 10680
 ctgggtcacg gtgaaggggt gcgctccggg ctgcgcgctg gccaggggtg gcttgaggct 10740
 ggtcctgctg gtgctgaagc gctgccggtc ttcgccctgc gcgtcggcca ggtagcattt 10800
 gaccatggtg tcatagtcca gcccctccgc ggcgtggccc ttggcgcgca gcttgccctt 10860
 ggaggaggcg ccgcacgagg ggcagtgcag acttttgagg gcgtagagct tgggcgcgag 10920
 aaataccgat tccggggagt aggcacccgc gccgcaggcc ccgcagacgg tctcgcattc 10980
 cacgagccag gtgagctctg gccgttcggg gtcaaaaacc aggtttcccc catgcttttt 11040
 gatgcgtttc ttacctctgg tttccatgag ccggtgtcca cgctcgggtga cgaaaaggct 11100
 gtccgtgtcc ccgtatacag acttgagagg cctgtcctcg accgatgcc ttgagagcct 11160
 tcaaccagc cagctccttc cgggtgggccc ggggcatgac tatcgtcgcc gcacttatga 11220
 ctgtcttctt tatcatgcaa ctcgtaggac aggtgccggc agcgtctctg gtcattttcg 11280
 gcgaggaccg ctttcgctgg agcgcgacga tgatcggcct gtcgcttgcg gtattcgga 11340
 tcttgacgc cctcgtcaa gccttcgtca ctgggtcccgc caccaaactg ttcggcgaga 11400
 agcaggccat tatcgccggc atggcgggcg acgcgctggg ctacgtcttg ctggcggtcg 11460
 cgacgcgagg ctggatggcc ttccccatta tgattcttct cgcttcgggc ggcacggga 11520
 tgcccgcgtt gcaggccatg ctgtccaggc aggtagatga cgaccatcag ggacagcttc 11580
 aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcggt gctggcggtt ttccataggc 11640
 tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgtcaag tcagagggtg cgaaacccga 11700
 caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc 11760
 cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt 11820
 ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtagt cgttcgctcc aagctgggct 11880
 gtgtgcacga accccccgtt cagcccagc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg 11940
 agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggg aacaggatta 12000
 gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct 12060

aactagaag gacagtatgt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa 12120
 gagttggtag ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcgggtgg ttttttggtt 12180
 gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta 12240
 cggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat 12300
 caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa 12360
 gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagtga gacacctatct 12420
 cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact ccccgctcgt tagataacta 12480
 cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga gaccacgct 12540
 caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg 12600
 gtcctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa 12660
 gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctgcaggc atcgtggtgt 12720
 cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta 12780
 catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggtcctccg atcgttgtca 12840
 gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta 12900
 ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct 12960
 gagaatagtg tatgcccga ccgagttgct cttgcccggc gtcaacacgg gataataccg 13020
 cgccacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac 13080
 tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcaccaact 13140
 gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa 13200
 atgccgcaaa aaaggggaata agggcgacac ggaaatgttg aatactcata ctcttccttt 13260
 ttcaatatta 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

<400> 3
 taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgacg tctaagaaac 60
 cattattatc atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc acgaggccct ttcgtcttca 120
 attaatcgca ccggtatcta tgtcgggtgc ggagaaagag gtaatgaaat ggcagctagc 180
 atcatcaata atatacctta ttttgattg aagccaatat gataatgagg ggggtggagt 240
 tgtgacgtgg cgcggggctg gggaacgggg cgggtgacgt agtagtgtgg cggaagtgtg 300
 atgttgcaag tgtggcgga ccatgtgaag cgacggatgt ggcaaaagtg acgtttttgg 360
 tgtgcgccgg tgtacacagg aagtgacaat tttcgcgcgg ttttaggcgg atgttgtagt 420

aaatttgggc gtaaccgagt aagatttggc catttttcgcg ggaaaactga ataagaggaa	480
gtgaaatctg aataattttg tgttactcat agcgcgtaat atttgtctag ggagatccgg	540
taccgatatc ctagacaacg atgctgagct aactataacg gtcctaaggt agcgaccgcg	600
gagactaggt gtatttatct aagcgatcgc ttaattaagg ccggccgccg caataaaata	660
tctttatttt cattacatct gtgtgttggg tttttgtgtg aatcgatagt actaacatac	720
gctctccatc aaaacaaaac gaaacaaaac aaactagcaa aataggctgt ccccgatgca	780
agtgcagggt ccagaacatt tctctatcga taatgcagggt cggagtactg tcctccgagc	840
ggagtactgt cctccgagcg gagtactgtc ctccgagcgg agtactgtcc tccgagcgga	900
gtactgtcct ccgagcggag tactgtcctc cgagcggaga ctcttcgaag gaagaggggc	960
ggggtcgatc gaccccgccc ctcttccttc gaaggaagag gggcggggtc gaagacctag	1020
agggtatata atgggtgcct tagctgggtg gtgagctcat ctctctgtag atcacgcgtc	1080
gaagaagggt agtaatctta acatgctctt tttttttttt tttgctaata ccttttgtgt	1140
gctgatgtta ggatgacatt tacaacaaat gtttgttcct gacaggaaaa accttgctgg	1200
gtaccttcgt tgccggacac ttcttgtcct ctactttgga aaaaaggaat tgagagccgc	1260
tagcgccacc atggagagga ccctgggtgt cctgggtggg atcttcctgg gcaccgtggc	1320
ccacaagagc agcccccagg gacccgacag gctgctgac cggctgagac acctgatcga	1380
catcgtggag cagctgaaga ttacgagaa cgacctggac cccgagctgc tgtccgcccc	1440
ccaggacgtg aagggccact gcgagcacgc cgccttcgcc tgcttcagga aggccaagct	1500
gaagcccagc aacccccgca acaacaagac cttcatcatc gacctgggtg cccagctgag	1560
aaggaggctg cccgccagga ggggcggcaa gaagcagaag cacatcgcca agtgccccag	1620
ctgcgacagc tacgagaagc ggacccccaa ggagttcctg gagaggctga agtggtgct	1680
gcaaaagatg atccaccagc acctgagctg agttgggcca gctcgaattc attgatcccc	1740
cgggctgcag gaattcgata tcaagctcgg gatccgaatt cggccccccc ccccccccc	1800
cccctaacgt tactggccga agccgcttg aataaggccg gtgtgcgttt gtctatatgt	1860
tattttccac catattgccg tcttttggca atgtgagggc ccggaaacct ggccctgtct	1920
tcttgacgag cattcctagg ggtctttccc ctctcgccaa aggaatgcaa ggtctgttga	1980
atgtcgtgaa ggaagcagtt cctctggaag cttcttgaag acaaacaacg tctgtagcga	2040
ccctttgcag gcagcggaac cccccacctg gcgacagggt cctctgcggc caaaagccac	2100
gtgtataaga tacacctgca aaggcggcac aaccccagtg ccacgttgtg agttggatag	2160
ttgtggaaag agtcaaattg ctctcctcaa gcgtattcaa caaggggctg aaggatgccc	2220
agaaggtagc ccattgtatg ggatctgac tggggcctcg gtgcacatgc ttacatgtg	2280
tttagtcgag gttaaaaaaa cgtctaggcc ccccgaacca cggggacgtg gttttcctt	2340
gaaaaacacg atgataatat ggccacaacc atgaagatcc tgaagcccta catgaggaac	2400
accagcatca gctgttacct gtgcttcctg ctgaacagcc acttcctgac cgaggccgga	2460

atccacgtct tcacccctggg ctgcgtgagc gtgggcctgc ccaagaccga ggccaactgg	2520
atcgacgtga ggtacgacct 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
ttataatggg taaaaataaa gcaatagcat caaaaatttc aaaaataaag cttttttttc	3000
actgcattct agttgtgggt tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tctcgtacgg	3060
cgtggtaggt ccgaacgaat ccatggatta ccctgttatc cctatccgga gttaacctcg	3120
aggacttcgg aacttctaga accagacctg tcagtttaaa cgctcttctc cccctcgagg	3180
gcctccgcgc cgggttttgg cgctcccgc gggcgcccc ctcctcacgg cgagcgctgc	3240
cacgtcagac gaagggcgca gcgagcgctc tgatccttc gcccgacgc tcaggacagc	3300
ggcccgctgc tcataagact cggccttaga accccagtat cagcagaagg acatttttagg	3360
acgggacttg ggtgactcta gggcactggg tttctttcca gagagcgga caggcgagga	3420
aaagtagtcc cttctcggcg attctgcgga gggatctccg tggggcggtg aacgccgatg	3480
attatataag gacgcgccgg gtgtggcaca gctagttccg tcgcagccgg gatttggtc	3540
gcggttcttg tttgtggatc gctgtgatcg tcacttgggt agtagcgggc tgctgggctg	3600
ggtacgtgcg ctcgggggtg gcgagtgtgt tttgtgaagt tttttaggca cttttgaaa	3660
tgtaatcatt tgggtcaata tgtaattttc agtgtttagac tagtaaattg tccgctaaat	3720
tctggccggt tttggctttt ttgttagacg gcatgcgggg gggggggggg gcaattggcc	3780
accatgggccc ccaagaagaa aaggaagggt gcccccccca ccgacgtgag cctgggcgac	3840
gagctgcacc tggacggcga ggacgtggcc atggcccacg ccgacgccct ggacgacttc	3900
gacctggaca tgctgggcga cggcgacagc cccggccccg gcttcacccc ccacgacagc	3960
gccccctacg gcgcccctgga catggccgac ttcgagttcg agcagatgtt caccgacgcc	4020
ctgggcatcg acgagtacgg cgcccatatg gagatgcccg tggacaggat tctggaggcc	4080
gaactcgccg tggagcagaa aagcgaccag ggcgtggagg gccccggcgg aaccggcggc	4140
agcggcagca gcccacga ccccgtagc aacatctgcc aggccgccga caagcagctg	4200
ttcacctgg tggagtgggc caagaggatt cccacttca gcagcctgcc cctggacgac	4260
caggtgatcc tgctgagggc cggtatggaac gagctgctga tcgccagctt cagccacagg	4320
agcatcgacg tgagggacgg catcctgctg gccaccggcc tgcacgtcca taggaacagc	4380
gcccacagcg ccggagtggg cgccatcttc gacaggggtg tgaccgagct ggtgagcaag	4440
atgagggaca tgaggatgga caagaccgag ctgggctgcc tgagggccat catcctgttc	4500

aacccccgagg tgaggggacct gaaaagcgcc caggaggtgg agctgctgag ggagaagggtg	4560
tacgccgccc tggaggagta caccaggacc acccaccgcc acgagcccg cagattcgcc	4620
aagctgctgc tgaggctgcc cagcctgagg agcatcgcc tgaagtgcct ggagcacctg	4680
ttcttcttca ggctgatcgg cgacgtgccc atcgacacct tcctgatgga gatgctggag	4740
agccccagcg acagctgagc cggcaactcg ctgtagtaat tccagcgaga ggcagagggga	4800
gcgagcgggc ggcgggctag ggtggaggag cccggcgagc agagctgcgc tgcgggcgtc	4860
ctgggaaggg agatccggag cgaatagggg gcttcgcctc tggcccagcc ctcccgtga	4920
tccccagcc agcggcgcc aaccctagcc gcatccacga aactttgccc atagcagcgg	4980
gcgggcactt tgcactggaa cttacaacac ccgagcaagg acgcgactct cccgacgcgg	5040
ggaggctatt ctgcccattt ggggacactt ccccgccgct gccaggacc gcttctctga	5100
aaggctctcc ttgcagctgc ttagacgctg gatttttttc gggtagtgga aaaccagcag	5160
cctcccgca ccagatctgc caccatgaag ctgctgagca gcatcgagca ggcttgcgac	5220
atctgcaggc tgaagaagct gaagtgcagc aaggagaagc ccaagtgcgc caagtgcctg	5280
aagaacaact gggagtgcag atacagcccc aagaccaaga ggagccccct gaccagggcc	5340
cacctgaccg aggtggagag caggctggag aggtggagc agctgttcct gctgatcttc	5400
cccagggagg acctggacat gatcctgaag atggacagcc tgcaagacat caaggccctg	5460
ctgaccggcc tgttcgtgca ggacaacgtg aacaaggacg ccgtgaccga caggctggcc	5520
agcgtggaga ccgacatgcc cctgaccctg aggcagcaca ggatcagcgc caccagcagc	5580
agcgaggaga gcagcaacaa gggccagagg cagctgaccg tgagccccga gtttcccg	5640
atcaggcccc agtgcgtggt gcccagagcc cagtgcgcca tgaaaaggaa ggagaagaag	5700
gcccagaagg agaaggacaa gctgcccgtg agcaccacca ccgtcgatga ccacatgccc	5760
cccatcatgc agtgcgagcc ccccccccc gagggcgcca ggattcacga ggtcgtgccc	5820
aggttcctga gcgacaagct gctggtgacc aacaggcaga agaacatccc ccagctgacc	5880
gccaaaccagc agttcctgat cgccaggctg atctggtatc aggacggcta cgagcagccc	5940
agcgacgagg acctgaaaag gatcaccag acctggcagc aggccgacga cgagaacgag	6000
gagagcgaca ccccttcag gcagatcacc gagatgacca tcctgaccgt gcagctgac	6060
gtggagtctg ccaagggcct gcccggattc gccaaagatca gccagcccga ccagatcacc	6120
ctgctgaagg cttgcagcag cgaggctgat atgctgaggg tggccaggag gtacgacgcc	6180
gccagcgaca gcatcctgtt cgccaacaac caggcttaca ccagggacaa ctacaggaag	6240
gctggcatgg ccgaggtgat cgaggacctc ctgcacttct gcagatgtat gtacagcatg	6300
gccctggaca acatccacta cgccctgctg accgccgtgg tgatcttcag cgacaggccc	6360
ggcctggagc agccccagct ggtggaggag atccagaggt actacctgaa caccctgagg	6420
atctacatcc tgaaccagct gagcggcagc gccaggagca gcgtgatcta cggcaagatc	6480
ctgagcatcc tgagcgagct gaggaccctg ggaatgcaga acagcaatat gtgtatcagc	6540

ctgaagctga agaacaggaa gctgcccccc ttcctggagg agatttgga cgtggccgac	6600
atgagccaca cccagcccc cccatcctg gagagcccca ccaacctgtg aatcgattag	6660
acatgataag atacattgat gagtttgac aaaccacaac tagaatgcag tgaaaaaat	6720
gcttaatttg tgaaatttgt gatgctattg cttaatttgt aaccattata agctgcaata	6780
aacaagttaa taaaacattt gcattcattt tatgtttcag gttcaggggg agatgtggga	6840
ggttttttaa agcaagtaaa acctctacaa atgtggtatc tagagctctt ccaaatagat	6900
ctggaagggtg ctgaggtagc atgagacccg caccagggtg agaccctgcg agtgtggcgg	6960
taaacatatt aggaaccagc ctgtgatgct ggatgtgacc gaggagctga ggcccgatca	7020
cttggtgctg gcctgcaccc gcgctgagtt tggctctagc gatgaagata cagattgagg	7080
tactgaaatg tgtgggcgtg gcttaagggt gggaaagaat atataagggtg ggggtcttat	7140
gtagttttgt atctgttttg cagcagccgc cgccgccatg agcaccaact cgtttgatgg	7200
aagcattgtg agctcatatt tgacaacgcg catgccccca tgggcccggg tgcgtcagaa	7260
tgtgatgggc tccagcattg atggtcgccc cgtcctgccc gcaaactcta ctacctgac	7320
ctacgagacc gtgtctggaa cgccgttga gactgcagcc tccgccgcg cttcagccgc	7380
tgcagccacc gcccgcgga ttgtgactga ctttgctttc ctgagccgc ttgcaagcag	7440
tgcagcttcc cgttcatccg cccgcgatga caagttgacg gctcttttg cacaattgga	7500
ttctttgacc cgggaactta atgtcgtttc tcagcagctg ttggatctgc gccagcaggt	7560
ttctgccctg aaggcttcct cccctcccaa tgcggtttta aacataaata aaaaaccaga	7620
ctctgttttg atttgatca agcaagtgtc ttgctgtctt tatttagggg ttttgcgcgc	7680
gcggtaggcc cgggaccagc ggtctcggtc gttgaggggtc ctgtgtattt tttccaggac	7740
gtggtaaagg tgactctgga tgttcagata catgggcata agcccgtctc tggggtggag	7800
gtagcaccac tgcagagctt catgctgcgg ggtggtgttg tagatgatcc agtcgtagca	7860
ggagcgctgg gcgtggtgcc taaaaatgtc tttcagtagc aagctgattg ccaggggcag	7920
gcccttggtg taagtgttta caaagcggtt aagctgggat ggggtgcatac gtggggatat	7980
gagatgcac tttgactgta tttttagggt ggctatgttc ccagccatat ccctccgggg	8040
attcatgttg tgcagaacca ccagcacagt gtatccggtg cacttgggaa atttgtcatg	8100
tagcttagaa ggaaatgcgt ggaagaactt ggagacgccc ttgtgacctc caagattttc	8160
catgcattcg tccataatga tggcaatggg cccacgggcg gcggcctggg cgaagatatt	8220
tctgggatca ctaacgtcat agttgtgttc caggatgaga tcgtcatagg ccatttttac	8280
aaagcgcggg cggagggtgc cagactgcgg tataatggtt ccatccggcc caggggcgta	8340
gttaccctca cagatttgca tttcccacgc tttgagttca gatgggggga tcatgtctac	8400
ctgcggggcg atgaagaaaa cggtttccgg ggtaggggag atcagctggg aagaaagcag	8460
gttctgagc agctgcgact taccgcagcc ggtgggccc taaatcacac ctattaccgg	8520
gtgcaactgg tagttaagag agctgcagct gccgtcatcc ctgagcaggg gggccacttc	8580

gttaagcatg tccctgactc gcatgttttc cctgaccaa tccgccagaa ggcgctcgcc 8640
 gcccagcgat agcagttctt gcaaggaagc aaagtttttc aacggtttga gaccgtccgc 8700
 cgtaggcatg cttttgagcg tttgaccaag cagttccagg cgggtcccaca gctcggtcac 8760
 ctgctctacg gcatctcgat ccagcatatc tcctcgtttc gcgggttggg gcggctttcg 8820
 ctgtacggca gtagtcggtg ctcgtccaga cgggccaggg tcatgtcttt ccacgggcgc 8880
 agggctcctg tcagcgtagt ctgggtcacg gtgaaggggt gcgctccggg ctgcgcgctg 8940
 gccaggggtg gcttgaggct ggtcctgctg gtgctgaagc gctgccgggtc ttcgccctgc 9000
 gcgtcggcca ggtagcattt gaccatggtg tcatagtcca gcccctccgc ggcgtggccc 9060
 ttggcgcgca gcttgccctt ggaggaggcg ccgcacgagg ggcagtgcag acttttgagg 9120
 gcgtagagct tgggcgcgag aaataccgat tccggggagt aggcattccgc gccgcaggcc 9180
 ccgcagacgg tctcgattc cacgagccag gtgagctctg gccgttcggg gtcaaaaacc 9240
 aggtttcccc catgttttt gatgcgtttc ttacctctgg tttccatgag ccggtgtcca 9300
 cgctcgggtg cgaaaaggct gtccgtgtcc ccgtatacag acttgagagg cctgtcctcg 9360
 accgatgccc ttgagagcct tcaaccagt cagctccttc cgggtgggcgc ggggcatgac 9420
 tatcgtcgcc gcacttatga ctgtcttctt tatcatgcaa ctcgtaggac aggtgccggc 9480
 agcgctctgg gtcattttcg gcgaggaccg ctttcgctgg agcgcgacga tgatcggcct 9540
 gtcgcttgcg gtattcgga tcttgacgc cctcgctcaa gccttcgtca ctgggtccgc 9600
 caccaaactg ttcggcgaga agcaggccat tatcgccggc atggcgggcg acgcgctggg 9660
 ctacgtcttg ctggcgctcg cgacgcgagg ctggatggcc ttccccatta tgattcttct 9720
 cgcttcggc ggcattcgga tgcccgctt gcaggccatg ctgtccaggc aggtagatga 9780
 cgaccatcag ggacagcttc aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt 9840
 gctggcgctt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgtcaag 9900
 tcagaggtgg cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc 9960
 cctcgtcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc 10020
 ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt 10080
 cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt cagcccagacc gctgcgcctt 10140
 atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc 10200
 agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa 10260
 gtgggtggct aactacggct aactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa 10320
 gccagttacc ttcggaaaaa gagttgtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg 10380
 tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga 10440
 agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtg aacgaaaact cacgttaagg 10500
 gatcttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg 10560
 aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt 10620

```

aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact 10680
ccccgtcgtg tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat 10740
gataccgcga gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg 10800
aagggccgag cgcagaagtg gtcctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg 10860
ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat 10920
tgctgcaggc atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggttc 10980
ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttgatgc aaaaaagcgg ttagctcctt 11040
cggtcctccg atcgttgtca gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc 11100
agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga 11160
gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc 11220
gtcaacacgg gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgtcga tcattggaaa 11280
acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta 11340
accactcgt gcaccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg 11400
agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggaata agggcgacac ggaaatgttg 11460
aatactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat 11520
gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaa 11553

```

```

<210> 4
<211> 12279
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Synthetic mIL-12

```

```

<400> 4
taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgacg tctaagaaac 60
cattattatc atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc acgaggccct ttcgtcttca 120
attaatcgca ccggtatcta tgtcgggtgc ggagaaagag gtaatgaaat ggcagctagc 180
atcatcaata atatacctta ttttggtatg aagccaatat gataatgagg ggggtggagtt 240
tgtgacgtgg cgcggggcgt ggggaacggg cgggtgacgt agtagtgtgg cggaagtgtg 300
atgttgcaag tgtggcgga ccatgtaag cgacggatgt ggcaaaagtg acgtttttgg 360
tgtgcgccgg tgtacacagg aagtgacaat tttcgcgcgg ttttaggcgg atgttgtagt 420
aaatttgggc gtaaccgagt aagatttggc cattttcgcg ggaaaactga ataagaggaa 480
gtgaaatctg aataattttg tgttactcat agcgcgtaat atttgtctag ggagatccgg 540
taccgatatc ctagacaacg atgctgagct aactataacg gtcctaaggt agcgaccgcg 600
gagactaggt gtatttatct aagcgatcgc ttaattaagg ccggccgccg caataaaata 660
tctttatttt cattacatct gtgtgttggg tttttgtgtg aatcgatagt actaacatac 720
gctctccatc aaaacaaaac gaaacaaaac aaactagcaa aataggctgt cccagtgca 780

```

agtgcagggtg ccagaacatt tctctatcga taatgcagggt cggagtactg tcctccgagc	840
ggagtactgt cctccgagcg gagtactgtc ctccgagcgg agtactgtcc tccgagcggg	900
gtactgtcct ccgagcggag tactgtcctc cgagcggaga ctcttcgaag gaagaggggc	960
ggggtcgatc gacccccgcc ctcttccttc gaaggaagag gggcggggtc gaagacctag	1020
agggatatata atgggtgcct tagctgggtg gtgagctcat cttcctgtag atcacgcgtc	1080
gaagaagggtg agtaatctta acatgctctt tttttttttt ttgctaatac ctttttgtgt	1140
gctgatgtta ggatgacatt tacaacaaat gtttgttcct gacaggaaaa accttgctgg	1200
gtaccttcgt tgccggacac ttcttgtcct ctactttgga aaaaaggaat tgagagccgc	1260
tagcgccacc atgtgcccc agaagctgac catcagctgg ttcgccatcg tgctgctgg	1320
gagccccctg atggccatgt gggagctgga gaaggacgtg tacgtgggtg aggtggactg	1380
gacccccgac gccccggcg agaccgtgaa cctgacttgc gacacccccg aggaggacga	1440
catcacctgg accagcgacc agagacacgg cgtcatcggc agcggcaaga ccctgaccat	1500
caccgtgaag gagttcctgg acgccggaca gtacacctgt cacaagggcg gcgagacct	1560
gagccacagc cacctgttgc tgcacaagaa ggagaacggc atctggagca ccgagatcct	1620
gaagaacttc aagaacaaga ccttcctgaa gtgcgaggcc cccaactaca gcggcagatt	1680
cacctgtagc tggctggtgc agagaaacat ggacctgaag ttcaacatca agagcagcag	1740
cagcagcccc gacagcagag ccgtgacatg cggcatggcc agcctgagcg ccgagaaggt	1800
gaccctggac cagagagact acgagaagta cagcgtgagc tgccaggagg acgtgacctg	1860
tcccaccgcc gaggagaccc tgcccatcga gcttgccctg gaagccagac agcagaacaa	1920
gtacgagaac tacagcacca gcttcttcat cagagacatc atcaagcccc acccccccaa	1980
gaacctccag atgaagcccc tgaagaacag ccagggtggag gtgtcctggg agtaccgccga	2040
cagctggagc accccccaca gctacttcag cctgaagtgc ttcgtgagaa tccagagaaa	2100
gaaggagaag atgaaggaga ccgaggaggg ctgcaaccag aagggcgctt tcctgggtga	2160
gaaaaccagc accgaggtgc agtgcaaggg cggcaacgtg tgtgtgcagg cccaggacag	2220
atactacaac agcagctgct ccaagtgggc ctgctgccc tgccgcgtga gaagctgagt	2280
tgggcgagct cgaattcatt gatcccccg gctgcaggaa ttcgatatca agctcgggat	2340
ccgaattccg cccccccccc cccccccccc ctaacgttac tggccgaagc cgcttggaat	2400
aaggccggtg tgcgtttgtc tatatgttat tttccaccat attgccgtct tttggcaatg	2460
tgagggcccc gaaacctggc cctgtcttct tgacgagcat tcctaggggt ctttcccctc	2520
tcgccaaagg aatgcaaggt ctgttgaatg tcgtgaagga agcagttcct ctggaagctt	2580
cttgaagaca aacaacgtct gtagcgacct tttgcaggca gcggaacccc ccacctggcg	2640
acaggtgcct ctgcggccaa aagccacgtg tataagatac acctgcaaag gcggcacaac	2700
cccagtgcca cgttgtgagt tggatagttg tggaaagagt caaatggctc tcctcaagcg	2760
tattcaacaa ggggctgaag gatgccaga aggtacccca ttgtatggga tctgatctgg	2820

ggccctcggtg cacatgcttt acatgtgttt agtcgaggtt aaaaaaacgt ctaggccccc 2880
 cgaaccacgg ggacgtgggtt ttcctttgaa aaacacgatg ataatatggc cacaaccatg 2940
 tgccagagca gatacctgtt gttcctggct accctggccc tgctgaacca cctgagcctg 3000
 gcccgcgtga tccccgtgag cggccccgcc agatgcctga gccagagcag aaacctgttg 3060
 aaaacaaccg acgacatggt gaaaaccgcc agagagaagc tgaagcacta cagctgcacc 3120
 gccgaggaca tcgaccacga ggacatcacc agagaccaga ccagcaccct gaaaacctgt 3180
 ctgcccctgg agctgcacaa gaacgagagc tgcctggcta ccagagagac cagcagcacc 3240
 accagaggca gctgcctgcc cccccagaaa accagcctga tgatgaccct gtgcctgggc 3300
 agcatctacg aggacctgaa gatgtaccag accgagttcc aggccatcaa cgccgccctg 3360
 caaaaccaca accaccagca gatcatcctg gacaagggca tgttggtggc catcgacgag 3420
 ctgatgcaga gcctgaacca caacggcgag accctgagac agaagccccc cgtgggagcag 3480
 gccgaccctt acagagtga gatgaagctg tgcacccctg tgcacgcctt cagcaccaga 3540
 gtggtgacca tcaacagagt gatgggctac ctgagcagcg cctgaatcga ttgcgcaaag 3600
 ctttcgcgat aggcgagacc aatgggtgtg tacgtagcgg ccgctcgaga acttgtttat 3660
 tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt 3720
 tttttcactg cattctagtt gtggtttgtc caaactcatc aatgtatctt atcatgtctc 3780
 gtacggcgtg gtaggtccga acgaatccat ggattaccct gttatcccta tccggagtta 3840
 acctcgagga cttcggaact tctagaacca gaccgttcag tttaaacgct cttctcccc 3900
 tcgagggcct ccgcgccggg ttttgccgcc tcccgcgggc gccccctcc tcacggcgag 3960
 cgctgccacg tcagacgaag ggcgcagcga gcgtcctgat ccttccgccc ggacgctcag 4020
 gacagcggcc cgctgctcat aagactcggc cttagaacct cagtatcagc agaaggacat 4080
 tttaggacgg gacttggttg actctagggc actggttttc tttccagaga gcggaacagg 4140
 cgaggaaaag tagtcccttc tcggcgattc tgcggagggg tctccgtggg gcggtgaacg 4200
 ccgatgatta tataaggacg cgccgggtgt ggcacagcta gttccgtcgc agccgggatt 4260
 tgggtcgcgg ttcttggttg tggatcgctg tgatcgctac ttggtgagta gcgggctgct 4320
 gggctgggta cgtgcgctcg gggttggcga gtgtgttttg tgaagttttt taggcacctt 4380
 ttgaaatgta atcatttggg tcaatatgta attttcagtg ttagactagt aaattgtccg 4440
 ctaaattctg gccgtttttg gcttttttgt tagacggcat gcgggggggg gggggggcaa 4500
 ttggccacca tgggcccacaa gaagaaaagg aaggtggccc cccccaccga cgtgagcctg 4560
 ggcgacgagc tgcacctgga cggcgaggac gtggccatgg cccacgccga cgccctggac 4620
 gacttcgacc tggacatgct gggcgacggc gacagccccg gccccggctt cccccccac 4680
 gacagcggcc cctacggcgc cctggacatg gccgacttcg agttcgagca gatgttcacc 4740
 gacgccctgg gcatcgacga gtacggcggc catatggaga tgcccgtgga caggattctg 4800
 gaggccgaac tcgccgtgga gcagaaaagc gaccagggcg tggagggccc cggcggaacc 4860

ggcggcagcg gcagcagccc caacgacccc gtgaccaaca tctgccaggc cgccgacaag 4920
 cagctgttca ccctggtgga gtgggccaag aggattcccc acttcagcag cctgcccctg 4980
 gacgaccagg tgatcctgct gagggccgga tggaacgagc tgctgatcgc cagcttcagc 5040
 cacaggagca tcgacgtgag ggacggcatc ctgctggcca ccggcctgca cgtccatagg 5100
 aacagcgccc acagcgccgg agtgggcgcc atcttcgaca gggtgctgac cgagctggtg 5160
 agcaagatga gggacatgag gatggacaag accgagctgg gctgcctgag ggccatcatc 5220
 ctgttcaacc ccgaggtgag gggcctgaaa agcgcccagg aggtggagct gctgaggagg 5280
 aaggtgtacg ccgcccctgga ggagtacacc aggaccaccc accccgacga gcccggcaga 5340
 ttcgccaagc tgctgctgag gctgcccagc ctgaggagca tcggcctgaa gtgcctggag 5400
 cacctgttct tcttcaggct gatcggcgac gtgcccacgc acaccttcct gatggagatg 5460
 ctggagagcc ccagcgacag ctgagccggc aactcgctgt agtaattcca gcgagaggca 5520
 gagggagcga gcgggcgggc ggctaggggtg gaggagcccc gcgagcagag ctgctgctgcg 5580
 ggcgtcctgg gaaggagat ccggagcgaa tagggggctt cgcctctggc ccagccctcc 5640
 cgctgatccc ccagccagcg gtgcgcaacc ctagccgcac ccacgaaact ttgcccatag 5700
 cagcggggcg gcactttgca ctggaactta caacacccga gcaaggacgc gactctcccc 5760
 acgcggggag gctattctgc ccatttgggg acacttcccc gccgctgcca ggaccgctt 5820
 ctctgaaagg ctctccttgc agctgcttag acgtggatt ttttctgggt agtggaaaac 5880
 cagcagcctc ccgcgaccag atctgccacc atgaagctgc tgagcagcat cgagcaggct 5940
 tgcgacatct gcaggctgaa gaagctgaag tgcagcaagg agaagcccaa gtgcgccaag 6000
 tgcctgaaga acaactggga gtgcagatac agccccaaga ccaagaggag cccctgacc 6060
 agggcccacc tgaccgaggt ggagagcagg ctggagaggc tggagcagct gttcctgctg 6120
 atcttccccca gggaggacct ggacatgac ctgaagatgg acagcctgca agacatcaag 6180
 gccctgctga ccggcctggt cgtgcaggac aacgtgaaca aggacgccgt gaccgacagg 6240
 ctggccagcg tggagaccga catgcccctg accctgaggc agcacaggat cagcgccacc 6300
 agcagcagcg aggagagcag caacaagggc cagaggcagc tgaccgtgag ccccgagttt 6360
 cccgggatca ggcccagtg cgtggtgccc gagaccaggt gcgccatgaa aaggaaggag 6420
 aagaaggccc agaaggagaa ggacaagctg cccgtgagca ccaccaccgt cgatgaccac 6480
 atgcccccca tcatgcagtg cgagcccccc cccccgagg ccgccaggat tcacgaggtc 6540
 gtgcccaggt tcctgagcga caagctgctg gtgaccaaca ggcagaagaa catccccag 6600
 ctgaccgcca accagcagtt cctgatcgcc aggctgatct ggtatcagga cggctacgag 6660
 cagcccagcg acgaggacct gaaaaggatc acccagacct ggcagcaggc cgacgacgag 6720
 aacgaggaga gcgacacccc cttcaggcag atcaccgaga tgaccatcct gaccgtgcag 6780
 ctgatcgtgg agttcgccaa gggcctgccc ggattcgcca agatcagcca gcccgaccag 6840
 atcacctgc tgaaggcttg cagcagcgag gtgatgatgc tgagggtggc caggaggtag 6900

gacgccgcca gcgacagcat cctgttcgcc aacaaccagg cttacaccag ggacaactac	6960
aggaaggctg gcatggccga ggtgatcgag gacctcctgc acttctgcag atgtatgtac	7020
agcatggccc tggacaacat ccactacgcc ctgctgaccg ccgtgggtgat cttcagcgac	7080
agggccggcc tggagcagcc ccagctggtg gaggagatcc agaggtagta cctgaacacc	7140
ctgaggatct acatcctgaa ccagctgagc ggcagcgcca ggagcagcgt gatctacggc	7200
aagatcctga gcatcctgag cgagctgagg accctgggaa tgcagaacag caatatgtgt	7260
atcagcctga agctgaagaa caggaagctg ccccccttcc tggaggagat ttgggacgtg	7320
gccgacatga gccacacca gcccccccc atcctggaga gccccacca cctgtgaatc	7380
gattagacat gataagatac attgatgagt ttggacaaac cacaactaga atgcagtga	7440
aaaaatgctt aatttgtgaa atttgtgatg ctattgctta atttgtaacc attataagct	7500
gcaataaaca agttaataaa acatttgcac tcattttatg tttcaggttc agggggagat	7560
gtgggagggt ttttaaagca agtaaacct ctacaaatgt ggtatctaga gctcttccaa	7620
atagatctgg aagggtgctga ggtacgatga gaccgcacc aggtgcagac cctgcgagt	7680
tggcggtaaa catattagga accagcctgt gatgctggat gtgaccgagg agctgaggcc	7740
cgatcacttg gtgctggcct gcacccgcgc tgagtttggc tctagcgatg aagatacaga	7800
ttgaggtact gaaatgtgtg ggcgtggctt aagggtggga aagaatatat aagggtgggg	7860
tcttatgtag ttttgtatct gttttgcagc agccgccgcc gccatgagca ccaactcgtt	7920
tgatggaagc attgtgagct catatttgac aacgcgcag ccccatggg ccggggtgcg	7980
tcagaatgtg atgggctcca gcattgatgg tcgccccgtc ctgcccgcaa actctactac	8040
cttgacctac gagaccgtgt ctggaacgcc gttggagact gcagcctccg ccgccgcttc	8100
agccgctgca gccaccgccc gcgggattgt gactgacttt gctttcctga gcccgcttgc	8160
aagcagtgca gcttcccgtt catccgcccg cgatgacaag ttgacggctc ttttggcaca	8220
attggattct ttgaccggg aacttaatgt cgtttctcag cagctgttgg atctgcgcca	8280
gcaggtttct gccctgaagg cttcctcccc tccaatgcg gtttaaaaca taaataaaaa	8340
accagactct gtttggattt ggatcaagca agtgtcttgc tgtctttatt taggggtttt	8400
gcgcgcgcgg tagggccggg accagcggtc tcggctcgtt agggtcctgt gtattttttc	8460
caggacgtgg taaaggtag tctggatgtt cagatacatg ggcataagcc cgtctctggg	8520
gtggaggtag caccactgca gagcttcatg ctgcggggtg gtgtttaga tgatccagtc	8580
gtagcaggag cgctgggctg ggtgcctaaa aatgtctttc agtagcaagc tgattgccag	8640
gggcaggccc ttggtgtaag tgtttacaaa gcggttaagc tgggatgggt gcatacgtgg	8700
ggatatgaga tgcatttgg actgtatttt taggttggct atgttcccag ccatatccct	8760
ccggggattc atgttgtgca gaaccaccag cacagtgtat ccggtgcact tgggaaattt	8820
gtcatgtagc ttagaaggaa atgcgtggaa gaacttggag acgcccttgt gacctcaaag	8880
attttccatg cattcgtcca taatgatggc aatgggcccc cgggcggcgg cctgggcgaa	8940

gatatttctg ggatcactaa cgtcatagtt gtgttccagg atgagatcgt cataggccat	9000
ttttacaaag cgcgggcgga ggggtgccaga ctgcggtata atgggtccat ccggcccagg	9060
ggcgtagtta ccctcacaga tttgcatttc ccacgctttg agttcagatg gggggatcat	9120
gtctacctgc ggggcgatga agaaaacggt ttccggggta ggggagatca gctgggaaga	9180
aagcaggttc ctgagcagct gcgacttacc gcagccggtg ggcccgtaaa tcacacctat	9240
taccgggtgc aactggtagt taagagagct gcagctgccg tcatccctga gcaggggggc	9300
cacttcgtta agcatgtccc tgactcgcat gttttccctg accaaatccg ccagaaggcg	9360
ctcgccgcc agcgatagca gttcttgcaa ggaagcaaag tttttcaacg gtttgagacc	9420
gtccgccgta ggcatgcttt tgagcgtttg accaagcagt tccaggcggt cccacagctc	9480
ggtcacctgc tctacggcat ctcgatccag catatctcct cgtttcgcgg gttggggcgg	9540
ctttcgctgt acggcagtag tcggtgctcg tccagacggg ccagggtcat gtctttccac	9600
gggcgcaggg tcctcgtcag cgtagtctgg gtcacggtga aggggtgcgc tccgggctgc	9660
gcgctggcca ggggtgcgctt gaggtggtc ctgctggtgc tgaagcgctg ccggtcttcg	9720
ccctgcgcgt cgccaggtg gcatttgacc atgggtgtcat agtccagccc ctccgcggcg	9780
tggcccttgg cgcgagctt gcccttggag gaggcgccgc acgaggggca gtgcagactt	9840
ttgagggcgt agagcttggg cgcgagaaat accgattccg gggagtaggc atccgcgccg	9900
caggccccgc agacggtctc gcattccacg agccaggtga gctctggccg ttcggggtca	9960
aaaaccaggt ttcccccatg ctttttgatg cgtttcttac ctctggtttc catgagccgg	10020
tgtccacgct cggtgacgaa aaggctgtcc gtgtccccgt atacagactt gagaggcctg	10080
tcctcgaccg atgcccttga gagccttcaa cccagtcagc tccttccggt gggcgcgggg	10140
catgactatc gtcgccgcac ttatgactgt cttctttatc atgcaactcg taggacaggt	10200
gccggcagcg ctctgggtca ttttcggcga ggaccgcttt cgctggagcg cgacgatgat	10260
cggcctgtcg cttgcggtat tcggaatctt gcacgccctc gctcaagcct tcgtcactgg	10320
tcccgccacc aaacgtttcg gcgagaagca ggccattatc gccggcatgg cggccgacgc	10380
gctgggctac gtcttgctgg cgttcgcgac gcgaggctgg atggccttcc ccattatgat	10440
tcttctcgct tccggcgga tcgggatgcc cgcgttgca gccatgctgt ccaggcaggt	10500
agatgacgac catcagggac agcttcaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc	10560
cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg	10620
ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt tccccctgg	10680
aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt	10740
tctcccttcg ggaagcgtag cgctttctca tagctcacgc ttaggtatc tcagttcggt	10800
gtaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaacct cccgttcagc ccgaccgctg	10860
cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact	10920
ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggat gtaggcggtg ctacagagtt	10980

```

cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaaggaca gtatttggtgta tctgcgctct 11040
gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac 11100
cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc 11160
tcaagaagat cctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg 11220
ttaagggatt ttggatcatga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta 11280
aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa acttgggtctg acagttacca 11340
atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc 11400
ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat acgggagggc ttaccatctg gccccagtgc 11460
tgcaatgata ccgcgagacc cacgctcacc ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc 11520
agccggaagg gccgagcgca gaagtgggtcc tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat 11580
taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt 11640
tgccattgct gcaggcatcg tgggtgtcacg ctcgctggtt ggtatggctt cattcagctc 11700
cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg atccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag 11760
ctccttcggt cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat cactcatggt 11820
tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac 11880
tgggtgagtac tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg 11940
cccggcgtca acacgggata ataccgcgcc acatagcaga actttaaaaag tgctcatcat 12000
tgaaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga gatccagttc 12060
gatgtaacct actcgtgcac ccaactgatc ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc 12120
tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggg cgacacggaa 12180
atgttgaata ctcatactct tcctttttca atattattga agcatttatc agggttattg 12240
tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaa 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 ttttggattg aagccaatat gataatgagg ggggtggagtt 240
tgtgacgtgg cgcggggctg gggaacgggg cgggtgacgt agtagtgtgg cggaagtgtg 300
atgttgcaag tgtggcgga ccatgtgaag cgacggatgt ggcaaaagt acgttttttg 360
tgtgcgccgg tgtacacagg aagtgacaat tttcgcgcgg ttttaggcgg atgttgtagt 420

```

aaatttgggc gtaaccgagt aagatttggc cattttcgcg ggaaaactga ataagaggaa	480
gtgaaatctg aataattttg tgttactcat agcgcgtaat atttgtctag ggagatccgg	540
taccgatatc ctagacaacg atgctgagct aactataacg gtcctaaggt agcgaccgcg	600
gagactaggt gtatttatct aagcgatcgc ttaattaagg ccggccgccg caataaaata	660
tctttatfff cattacatct gtgtgttggg tttttgtgtg aatcgatagt actaacatac	720
gctctccatc aaaacaaaac gaaacaaaac aaactagcaa aataggctgt ccccgagtga	780
agtgcagggt ccagaacatt tctctatcga taatgcagggt cggagtactg tcctccgagc	840
ggagtactgt cctccgagcg gagtactgtc ctccgagcgg agtactgtcc tccgagcgga	900
gtactgtcct ccgagcggag tactgtcctc cgagcggaga ctcttcgaag gaagaggggc	960
ggggtcgatc gaccccgccc ctcttccttc gaaggaagag gggcggggtc gaagacctag	1020
agggtatata atgggtgcct tagctggtgt gtgagctcat cttcctgtag atcacgcgtc	1080
gaagaagggt agtaatctta acatgctctt tttttttttt tttgctaate ctttttgtgt	1140
gctgatgtta ggatgacatt tacaacaaat gtttgttctt gacaggaaaa accttgctgg	1200
gtaccttcgt tgccggacac ttcttgtcct ctactttgga aaaaagggaat tgagagccgc	1260
tagcgccacc atgagaagca gccccggcaa catggagaga atcgtgatct gcctgatggt	1320
gatcttcctg ggcaccctgg tgcataagag cagcagccag ggccaggaca gacacatgat	1380
ccgcatgaga cagctgatcg acatcgtgga ccagctgaag aactacgtga acgacctggt	1440
gccccgagttc ctgccccccc ccgaggacgt ggagaccaac tgcgagtgga gcgcttcag	1500
ctgcttccag aaggcccagc tgaagtccgc caacaccggc aacaacgaga gaatcatcaa	1560
cgtgagcatc aagaagctga agcgggaagc ccccgaccac aacgccggaa gaagacagaa	1620
gcacagactg acctgtccca gctgcgacag ctacgagaag aagcccccca aggagttcct	1680
ggagagattc aagagcctgc tgcaaaagat gatccaccag cacctgagca gcagaaccca	1740
cggcagcgag gacagctgag ttgggagcgc tcgaattcat tgatcccccg ggctgcagga	1800
attcgatata aagctcggga tccgaattcc gccccccccc ccccccccc cctaacgtta	1860
ctggccgaag ccgcttgga taaggccggt gtgcgtttgt ctatatgtta ttttccacca	1920
tattgccgtc ttttggaat gtgagggccc ggaaacctgg ccctgtcttc ttgacgagca	1980
ttcctagggg tctttccct ctcgccaaag gaatgcaagg tctgttgaat gtcgtgaagg	2040
aagcagttcc tctggaagct tcttgaagac aaacaacgtc tgtagcgacc ctttgcaggc	2100
agcggaaacc cccacctggc gacaggtgcc tctgcggcca aaagccacgt gtataagata	2160
cacctgcaaa ggcggcacia ccccgatgcc acgttgtgag ttggatagtt gtggaaagag	2220
tcaaatggct ctctcaagc gtattcaaca aggggctgaa ggatgcccag aaggtacccc	2280
attgtatggg atctgatctg gggcctcggg gcacatgctt tacatgtgtt tagtcgagg	2340
taaaaaaacg tctaggcccc ccgaaccacg gggacgtggg tttcctttga aaaacacgat	2400
gataatatgg ccacaaccat gagaatcagc aagccccacc tgagaagcat cagcatccag	2460

tgttacctgt gcctgctgct gaacagccac ttcctgaccg aggccggtat ccacgtcttc	2520
atcctgggct gcttcagcgc cggactgccc aagaccgagg ccaactgggt gaacgtgatc	2580
tctgacctga agaagatcga ggacctgatc cagtccatgc acatcgacgc caccctgtac	2640
accgagagcg acgttcatcc cagctgcaag gtgaccgcc a tgaagtgctt cctgctggag	2700
ctgcaagtga tctccctgga gagcggcgac gccagcatcc acgacaccgt ggagaacctg	2760
attatcctgg ctaacaacag cctgagcagc aacggcaacg tgaccgagag cggctgcaag	2820
gagtgtgagg agctggagga gaagaacatc aaggagtctc tccagagctt cgtgcatatc	2880
gtccagatgt tcatcaacac cagctgaatc gattgcgcaa agctttcgcg ataggcgaga	2940
ccaatgggtg tgtacgtagc ggccgctcga gaacttgctt attgcagctt ataatgggta	3000
caaataaagc aatagcatca caaatttcac aaataaagca tttttttcac tgcattctag	3060
ttgtgggttg tccaaactca tcaatgtatc ttatcatgtc tcgtacggcg tggtaggtcc	3120
gaacgaatcc atggattacc ctgttatccc tatccggagt taacctcgag gacttcggaa	3180
cttctagaac cagaccgttc agtttaaacg ctcttctccc cctcgagggc ctccgcgccg	3240
ggttttggcg cctcccgcg ggcggggcct cctcacggcg agcgctgcc cgtcagacga	3300
agggcgagc gagcgtcctg atccttccgc ccggacgctc aggacagcgg cccgctgctc	3360
ataagactcg gccttagaac ccagtatca gcagaaggac attttaggac gggacttggg	3420
tgactctagg gcaactggtt tctttccaga gagcggaaaca ggcgaggaaa agtagtccct	3480
tctcggcgat tctgcggagg gatctccgtg gggcggtgaa cgccgatgat tatataagga	3540
cgcgccgggt gtggcacagc tagttccgtc gcagccggga tttgggtcgc gggtcttggt	3600
tgtggatcgc tgtgatcgtc acttggtgag tagcgggctg ctgggctggg tacgtgcgct	3660
cgggggtggc gagtgtggtt tgtgaagttt tttaggcacc ttttgaaatg taatcatttg	3720
ggccaatatg taattttcag tgtagacta gtaaatgtc cgctaaattc tggccgtttt	3780
tggctttttt gtagacggc atgcgggggg gggggggggc aattggccac catgggcccc	3840
aagaagaaaa ggaagggtgg cccccccacc gacgtgagcc tgggcgacga gctgcacctg	3900
gacggcgagg acgtggccat ggcccacgcc gacgccctgg acgacttcga cctggacatg	3960
ctgggcgacg gcgacagccc cggccccggc ttcaccccc acgacagcgc cccctacggc	4020
gccctggaca tggccgactt cgagttcgag cagatgttca ccgacgccct gggcatcgac	4080
gagtacggcg gccatatgga gatgccctg gacaggattc tggaggccga actcgccgtg	4140
gagcagaaaa gcgaccaggg cgtggagggc cccggcgga cggcgggcag cggcagcagc	4200
cccaacgacc ccgtgaccaa catctgccag gccgccgaca agcagctgtt caccctggtg	4260
gagtgggcca agaggattcc ccacttcagc agcctgcccc tggacgacca ggtgatcctg	4320
ctgagggccg gatggaacga gctgctgatc gccagcttca gccacaggag catcgacgtg	4380
agggacggca tcctgctggc caccggcctg cacgtccata ggaacagcgc ccacagcgcc	4440
ggagtgggcg ccattctcga cagggtgctg accgagctgg tgagcaagat gagggacatg	4500

aggatggaca agaccgagct gggctgcctg agggccatca tcctgttcaa ccccgaggtg	4560
aggggcctga aaagcgccca ggaggtggag ctgctgaggg agaaggtgta cgccgccctg	4620
gaggagtaca ccaggaccac ccaccccgac gagcccgga gattcgccaa gctgctgctg	4680
aggctgcca gcctgaggag catcggcctg aagtgcctgg agcacctgtt cttcttcagg	4740
ctgatcggcg acgtgcccac cgacaccttc ctgatggaga tgctggagag cccagcgac	4800
agctgagccg gcaactcgct gtagtaattc cagcgagagg cagagggagc gagcgggagg	4860
cgggctaggg tggaggagcc cggcgagcag agctgcgctg cgggcgtcct gggaaggag	4920
atccggagcg aatagggggc ttcgcctctg gccagccct cccgctgatc cccagccag	4980
cgggtgcgaa ccctagccgc atccacgaaa ctttgcccat agcagcgggc gggcactttg	5040
cactggaact tacaacaccc gagcaaggac gcgactctcc cgacgcgggg aggctattct	5100
gcccatttg ggacacttcc ccgccgctgc caggaccgc ttctctgaaa ggctctcctt	5160
gcagctgctt agacgctgga tttttttcgg gtagtggaacc accagcagcc tcccgcgacc	5220
agatctgcca ccatgaagct gctgagcagc atcgagcagg cttgcgacat ctgcaggctg	5280
aagaagctga agtgcagcaa ggagaagccc aagtgcgcca agtgcctgaa gaacaactgg	5340
gagtgcagat acagcccca gaccaagagg agccccctga ccagggccca cctgaccgag	5400
gtggagagca ggctggagag gctggagcag ctgttcctgc tgatcttccc cagggaggac	5460
ctggacatga tcctgaagat ggacagcctg caagacatca aggccctgct gaccggcctg	5520
ttcgtgcagg acaacgtgaa caaggacgcc gtgaccgaca ggctggccag cgtggagacc	5580
gacatgcccc tgaccctgag gcagcacagg atcagcgcca ccagcagcag cgaggagagc	5640
agcaacaagg gccagaggca gctgaccgtg agccccgagt tccccgggat caggccccgag	5700
tgcggtgtgc ccgagaccca gtgcgcatg aaaaggaagg agaagaaggc ccagaaggag	5760
aaggacaagc tgcccgtgag caccaccacc gtcgatgacc acatgcccc catcatgcag	5820
tgcgagcccc cccccccga ggccgcccagg attcacgagg tcgtgcccag gttcctgagc	5880
gacaagctgc tggtagcaaa caggcagaag aacatcccc agctgaccgc caaccagcag	5940
ttcctgatcg ccaggctgat ctggtatcag gacggctacg agcagcccag cgacaggac	6000
ctgaaaagga tcaccagac ctggcagcag gccgacgacg agaacgagga gagcgacacc	6060
cccttcaggc agatcaccga gatgaccatc ctgaccgtgc agctgatcgt ggagtctgcc	6120
aagggcctgc ccgattcgc caagatcagc cagcccgacc agatcacct gctgaaggct	6180
tgacgagcgc aggtgatgat gctgaggggt gccaggaggt acgacgccgc cagcgacagc	6240
atcctgttcg ccaacaacca ggcttacacc agggacaact acaggaaggc tggcatggcc	6300
gaggtgatcg aggacctcct gcacttctgc agatgtatgt acagcatggc cctggacaac	6360
atccactacg ccctgctgac cgccgtggtg atcttcagcg acaggcccg cctggagcag	6420
ccccagctgg tggaggagat ccagaggtac tacctgaaca ccctgaggat ctacatcctg	6480
aaccagctga gcggcagcgc caggagcagc gtgatctacg gcaagatcct gagcatcctg	6540

agcgagctga	ggaccctggg	aatgcagaac	agcaatatgt	gtatcagcct	gaagctgaag	6600
aacaggaagc	tgccccctt	cctggaggag	atttgggacg	tggccgacat	gagccacacc	6660
cagccccccc	ccatcctgga	gagccccacc	aacctgtgaa	tcgattagac	atgataagat	6720
acattgatga	gtttggacaa	accacaacta	gaatgcagtg	aaaaaaatgc	ttaatttgtg	6780
aaatttgtga	tgctattgct	taatttgtaa	ccattataag	ctgcaataaa	caagttaata	6840
aaacatttgc	attcatttta	tgtttcaggt	tcagggggag	atgtgggagg	ttttttaaag	6900
caagtaaaac	ctctacaaat	gtggtatcta	gagctcttcc	aaatagatct	ggaagggtgct	6960
gaggtacgat	gagaccgcga	ccaggtgcag	accctgcgag	tgtggcggta	aacatattag	7020
gaaccagcct	gtgatgctgg	atgtgaccga	ggagctgagg	cccgatcact	tggtgctggc	7080
ctgcacccgc	gctgagtttg	gctctagcga	tgaagataca	gattgaggta	ctgaaatgtg	7140
tgggcgtggc	ttaaggggtg	gaaagaatat	ataaggtggg	ggctttatgt	agttttgtat	7200
ctgttttgca	gcagccgccg	ccgccatgag	caccaactcg	tttgatggaa	gcattgtgag	7260
ctcatatttg	acaacgcgca	tgccccatg	ggccgggggtg	cgtcagaatg	tgatgggctc	7320
cagcattgat	ggtcgccccg	tcctgccccg	aaactctact	accttgacct	acgagaccgt	7380
gtctggaacg	ccgttgagga	ctgcagcctc	cgccgccgct	tcagccgctg	cagccaccgc	7440
ccgcgggatt	gtgactgact	ttgctttcct	gagcccgtt	gcaagcagtg	cagcttccccg	7500
ttcatccgcc	cgcgatgaca	agttgacggc	tcttttgcca	caattggatt	ctttgacccg	7560
ggaacttaat	gtcgtttctc	agcagctggt	ggatctgcgc	cagcagggtt	ctgccctgaa	7620
ggcttcctcc	cctcccaatg	cggttttaaa	cataaataaa	aaaccagact	ctgtttggat	7680
ttggatcaag	caagtgtctt	gctgtcttta	tttaggggtt	ttgcgcgcgc	ggtaggccccg	7740
ggaccagcgg	tctcggtcgt	tgagggtcct	gtgtatTTTT	tccaggacgt	ggtaaagggtg	7800
actctggatg	ttcagataca	tgggcataag	cccgtctctg	gggtggagggt	agcaccactg	7860
cagagcttca	tgctgcgggg	tgggtgtgta	gatgatccag	tcgtagcagg	agcgctgggc	7920
gtggtgccta	aaaatgtctt	tcagtagcaa	gctgattgcc	aggggcaggc	ccttgggtgta	7980
agtgtttaca	aagcgggttaa	gctgggatgg	gtgcatacgt	ggggatatga	gatgcatctt	8040
ggactgtatt	tttaggttgg	ctatgttccc	agccatatcc	ctccggggat	tcattgttgtg	8100
cagaaccacc	agcacagtgt	atccggtgca	cttgggaaat	ttgtcatgta	gcttagaagg	8160
aaatgcgtgg	aagaacttgg	agacgccctt	gtgacctcca	agattttcca	tgcattcgtc	8220
cataatgatg	gcaatgggcc	cacgggcggc	ggcctgggcg	aagatatattc	tgggatcact	8280
aacgtcatag	ttgtgttcca	ggatgagatc	gtcataggcc	atttttacia	agcgcgggcg	8340
gagggtgcca	gactgcggta	taatggttcc	atccggccca	ggggcgtagt	taccctcaca	8400
gatttgcatt	tcccacgctt	tgagttcaga	tggggggatc	atgtctacct	gcggggcgat	8460
gaagaaaacg	gtttccgggg	taggggagat	cagctgggaa	gaaagcagggt	tcctgagcag	8520
ctgcgactta	ccgcagccgg	tgggccccta	aatcacacct	attaccgggt	gcaactggta	8580

gttaagagag ctgcagctgc cgtcatccct gagcaggggg gccacttcgt taagcatgtc	8640
cctgactcgc atgttttccc tgaccaaadc cgccagaagg cgctcgccgc ccagcgatag	8700
cagttcttgc aaggaagcaa agtttttcaa cggtttgaga ccgtccgccg taggcatgtc	8760
tttgagcgtt tgaccaagca gttccaggcg gtcccacagc tcggtcacct gctctacggc	8820
atctcgatcc agcatatctc ctcgtttcgc gggttggggc ggctttcgtc gtacggcagt	8880
agtcggtgct cgtccagacg ggccagggtc atgtctttcc acggggcgag ggtcctcgtc	8940
agcgtagtct gggtcacggg gaaggggtgc gctccgggct gcgcgctggc caggggtgcgc	9000
ttgaggctgg tcctgctggg gctgaagcgc tgccggtctt cgccctgcgc gtcggccagg	9060
tagcatttga ccatggtgtc atagtccagc ccctccgcgc cgtggccctt ggcgcgcagc	9120
ttgcccttgg aggaggcgcc gcacgagggg cagtgcagac ttttgagggc gtagagcttg	9180
ggcgcgagaa ataccgattc cggggagtag gcatccgcgc cgcaggcccc gcagacggtc	9240
tcgcattcca cgagccaggg gagctctggc cgttcggggg caaaaaccag gtttcccca	9300
tgctttttga tgcgtttctt acctctggtt tccatgagcc ggtgtccacg ctcggtgacg	9360
aaaaggctgt ccgtgtcccc gtatacagac ttgagaggcc tgtcctcgac cgatgccctt	9420
gagagccttc aaccagtcg gctccttcgc gtgggcgcgc ggcatgacta tcgtcgccgc	9480
acttatgact gtcttcttta tcatgcaact cgtaggacag gtgccggcag cgctctgggt	9540
cattttcggc gaggaccgct ttcgctggag cgcgacgatg atcggcctgt cgcttgcggt	9600
attcggaatc ttgcacgccc tcgctcaagc cttcgtcact ggtcccgcga ccaaacgttt	9660
cggcgagaag caggccatta tcgccggcat ggccggccgac gcgctgggct acgtcttgct	9720
ggcgttcgcg acgcgaggct ggatggcctt cccattatg attcttctcg cttccggcgc	9780
catcgggatg cccgcgttgc aggccatgct gtccaggcag gtagatgacg accatcaggg	9840
acagcttcaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt	9900
ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agagggtggcg	9960
aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc	10020
tcctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt	10080
ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa	10140
gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggtaacta	10200
tcgtcttgag tccaacccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag cactggtaa	10260
caggattagc agagcgaggg atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa	10320
ctacggctac actagaagga cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt	10380
cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta gcggtggttt	10440
ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaggga tctcaagaag atcctttgat	10500
cttttctacg gggctctgacg ctcagtggaa cgaaaactca cgttaaggga ttttggtcat	10560
gagattatca aaaaggatct tcacctagat 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 ccgggtccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg 10860
cagaagtggc cctgcaactt tatccgcctc catccagtct attaattgtt gccgggaagc 10920
tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt gcgcaacggt gttgccattg ctgcaggcat 10980
cgtggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc tccggttccc aacgatcaag 11040
gcgagttaca tgatcccca tgttggtgcaa aaaagcgggt agctccttcg gtcctccgat 11100
cgttgtcaga agtaagtgg ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa 11160
ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa 11220
gtcattctga gaatagtgtg tgccggcgacc gagttgctct tgcccggcgt caacacggga 11280
taataccgcg ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac gttcttcggg 11340
gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc 11400
acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg 11460
aaggcaaaat gccgcaaaaa agggaataag ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact 11520
cttccttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat 11580
at ttgaaatgt atttagaaaa a 11601

```

```

<210> 6
<211> 12270
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Synthetic hIL-12

```

```

<400> 6
taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgacg tctaagaaac 60
cattattatc atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc acgaggccct ttcgtcttca 120
attaatcgca ccggtatcta tgtcgggtgc ggagaaagag gtaatgaaat ggcagctagc 180
atcatcaata atatacctta ttttggtattg aagccaatat gataatgagg ggggtggagtt 240
tgtgacgtgg cgcgggggcgt gggaaacgggg cgggtgacgt agtagtgtgg cggaagtgtg 300
atgttgcaag tgtggcggaa cacatgtaag cgacggatgt ggcaaaagtg acgttttttg 360
tgtgcgccgg tgtacacagg aagtgacaat tttcgcgcgg ttttaggcgg atgttgtagt 420
aaatttgggc gtaaccgagt aagatttggc ctttttcgcg ggaaaactga ataagaggaa 480
gtgaaatctg aataattttg tggtactcat agcgcgtaat atttgtctag ggagatccgg 540
taccgatatc ctagacaacg atgctgagct aactataacg gtcctaaggt agcgaccgcg 600
gagactaggt gtatttatct aagcgatcgc ttaattaagg ccggccgccg caataaaata 660
tctttatttt cattacatct gtgtgttggg tttttgtgtg aatcgatagt actaacatac 720

```

gctctccatc	aaaacaaaac	gaaacaaaac	aaactagcaa	aataggctgt	ccccagtgca	780
agtgacaggtg	ccagaacatt	tctctatcga	taatgcaggt	cggagtactg	tcctccgagc	840
ggagtactgt	cctccgagcg	gagtactgtc	ctccgagcgg	agtactgtcc	tccgagcgga	900
gtactgtcct	ccgagcgagg	tactgtcctc	cgagcggaga	ctcttcgaag	gaagaggggc	960
ggggtcgatc	gaccccgccc	ctcttccttc	gaaggaagag	gggcggggtc	gaagacctag	1020
agggtatata	atgggtgcct	tagctgggtg	gtgagctcat	cttcctgtag	atcacgcgtc	1080
gaagaaggtg	agtaatctta	acatgctctt	tttttttttt	tttgctaata	ccttttgtgt	1140
gctgatgtta	ggatgacatt	tacaacaaat	gtttgttcct	gacaggaaaa	accttgctgg	1200
gtaccttcgt	tgccggacac	ttcttgtcct	ctactttgga	aaaaaggaat	tgagagccgc	1260
tagcgccacc	atgggtcacc	agcagttggg	catctcttgg	ttttccctgg	tttttctggc	1320
atctcccctc	gtggccatat	gggaactgaa	gaaagatggt	tatgtcgtag	aattggattg	1380
gtatccggat	gcccctggag	aaatgggtgg	cctcacctgt	gacaccctg	aagaagatgg	1440
tatcacctgg	accttgacc	agagcagtga	ggtcttaggc	tctggcaaaa	ccctgaccat	1500
ccaagtcaaa	gagtttggag	atgctggcca	gtacacctgt	cacaaaggag	gagaggttct	1560
aagccattcg	ctcctgctgc	ttcacaaaaa	ggaagatgga	atttggtcca	ctgatatttt	1620
aaaggaccag	aaagaacca	aaaataagac	ctttctaaga	tgagaggcca	agaattattc	1680
tggacgtttc	acctgctggg	ggctgacgac	aatcagtact	gatttgacat	tcagtgtcaa	1740
aagcagcaga	ggctcttctg	acccccagg	ggtgacgtgc	ggagctgcta	cactctctgc	1800
agagagagtc	agaggggaca	acaaggagta	tgagtactca	gtggagtgcc	aggaggacag	1860
tgcctgcca	gctgctgagg	agagtctgcc	cattgaggtc	atggtggatg	ccgttcacaa	1920
gctcaagtat	gaaaactaca	ccagcagctt	cttcacaggg	gacatcatca	aacctgacct	1980
acccaagaac	ttgcagctga	agccattaaa	gaattctcgg	caggtggagg	tcagctggga	2040
gtaccctgac	acctggagta	ctccacattc	ctacttctcc	ctgacattct	gcgttcagggt	2100
ccagggcaag	agcaagagag	aaaagaaaga	tagagtcttc	acggacaaga	cctcagccac	2160
ggtcatctgc	cgcaaaaatg	ccagcattag	cgtgcggggc	caggaccgct	actatagctc	2220
atcttggagc	gaatgggcat	ctgtgccctg	cagttagggt	gggcgagctc	gaattcattg	2280
atccccggg	ctgcaggaat	tcgatataca	gctcgggatc	cgaattccgc	cccccccccc	2340
cccccccccc	taacgttact	ggccgaagcc	gcttgggaata	aggccgggtg	gcgtttgtct	2400
atatgttatt	ttccaccata	ttgccgtctt	ttggcaatgt	gagggcccgg	aaacctggcc	2460
ctgtcttctt	gacgagcatt	cctaggggtc	tttcccctct	cgccaaagga	atgcaaggctc	2520
tgttgaatgt	cgtgaaggaa	gcagttcctc	tggagcttc	ttgaagacaa	acaacgtctg	2580
tagcgaccct	ttgcaggcag	cggaaccccc	cacctggcga	caggtgcctc	tgcggccaaa	2640
agccacgtgt	ataagataca	cctgcaaagg	cggcacaacc	ccagtgccac	gttgtgagtt	2700
ggatagttgt	ggaaagagtc	aaatggctct	cctcaagcgt	attcaacaag	gggctgaagg	2760

atgcccagaa ggtaccccat tgtatgggat ctgatctggg gcctcgggtgc acatgcttta	2820
catgtgttta gtcgaggta aaaaaacgtc taggcccccc gaaccacggg gacgtggttt	2880
tcctttgaaa aacacgatga taatatggcc acaaccatgg gtccagcgcg cagcctcctc	2940
cttgtggcta ccctggtcct cctggaccac ctcagtttgg ccagaaacct ccccgaggcc	3000
actccagacc caggaatgtt cccatgcctt caccactccc aaaacctgct gagggccgtc	3060
agcaacatgc tccagaaggc cagacaaact ctagaatttt acccttgacac ttctgaagag	3120
attgatcatg aagatatcac aaaagataaa accagcacag tggaggcctg tttaccattg	3180
gaattaacca agaattgagag ttgcctaaat tccagagaga cctctttcat aactaatggg	3240
agttgcctgg cctccagaaa gacctctttt atgatggccc tgtgccttag tagtatttat	3300
gaagacttga agatgtacca ggtggagttc aagaccatga atgcaaagct tctgatggat	3360
cctaagaggc agatctttct agatcaaac atgctggcag ttattgatga gctgatgcag	3420
gccctgaatt tcaacagtga gactgtgcca caaaaatcct cccttgaaga accggatttt	3480
tataaaacta aaatcaagct ctgcatactt cttcatgctt tcagaattcg ggcagtgact	3540
attgatagag tgatgagcta tctgaatgct tcctaaatcg attgcgcaaa gctttcgca	3600
taggcgagac caatgggtgt gtacgtagcg gccgctcgag aacttgttta ttgcagctta	3660
taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca aataaagcat ttttttact	3720
gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct tatcatgtct cgtacggcgt	3780
ggtaggtccg aacgaatcca tggattacc cgttatccct atccggagtt aacctcgagg	3840
acttcggaac ttctagaacc agaccgttca gtttaaacgc tcttctcccc ctcgagggcc	3900
tccgcgccgg gttttggcgc ctcccgcggg cgccccctc ctcacggcga gcgctgccac	3960
gtcagacgaa gggcgagcg agcgtcctga tccttcgcc cgacgctca ggacagcggc	4020
ccgctgctca taagactcgg ccttagaacc ccagtatcag cagaaggaca ttttaggacg	4080
ggacttggtg gactctaggg cactgggttt ctttccagag agcgggaacag gcgaggaaaa	4140
gtagtccctt ctgpgcatt ctgpgaggg atctccgtgg ggcgggtgac gccgatgatt	4200
atataaggac gcgcccgggtg tggcacagct agttccgtcg cagccgggat ttgggtcgcg	4260
gttcttggtt gtggatcgct gtgatcgta cttggtgagt agcgggctgc tgggctgggt	4320
acgtgcgctc ggggttggtg agtggtgttt gtgaagtgtt ttaggcacct tttgaaatgt	4380
aatcatttgg gtcaatatgt aattttcagt gttagactag taaattgtcc gctaaattct	4440
ggccgttttt ggcttttttg ttagacggca tgcggggggg ggggggggca attggccacc	4500
atgggcccc aagaagaaaag gaagggtggc cccccaccg acgtgagcct gggcgacgag	4560
ctgcacctgg acggcgagga cgtggccatg gccacgccc acgcccgtga cgacttcgac	4620
ctggacatgc tgggcgacgg cgacagcccc ggccccggct tcacccccca cgacagcgcc	4680
ccctacggcg ccctggacat ggccgacttc gagttcgagc agatgttcac cgacgccctg	4740
ggcatcgacg agtacggcgg ccatatggag atgcccgtgg acaggattct ggaggccgaa	4800

ctcgccgtgg agcagaaaag cgaccagggc gtggagggcc ccggcggaac cggcggcagc	4860
ggcagcagcc ccaacgaccc cgtgaccaac atctgccagg ccgccgacaa gcagctgttc	4920
accctggtgg agtggggcaa gaggattccc cacttcagca gcctgcccct ggacgaccag	4980
gtgatcctgc tgagggccgg atggaacgag ctgctgatcg ccagcttcag ccacaggagc	5040
atcgacgtga gggacggcat cctgctggcc accggcctgc acgtccatag gaacagcgcc	5100
cacagcgccg gagtgggccc catcttcgac aggggtgctga ccgagctggg gagcaagatg	5160
agggacatga ggatggacaa gaccgagctg ggctgcctga gggccatcat cctgttcaac	5220
cccagaggtga ggggcctgaa aagcgcccag gaggtggagc tgctgagggg gaaggtgtac	5280
gccgccctgg aggagtacac caggaccacc caccgacg agcccgagc attcgccaag	5340
ctgctgctga ggctgcccag cctgaggagc atcggcctga agtgccctga gcacctgttc	5400
ttcttcaggc tgatcggcga cgtgcccac gacaccttc tgatggagat gctggagagc	5460
cccagcgaca gctgagccgg caactcgctg tagtaattcc agcgagaggc agagggagcg	5520
agcgggcccg gggctagggg ggaggagccc ggcgagcaga gctgcgctgc gggcgctcctg	5580
ggaagggaga tccggagcga atagggggct tcgcctctgg ccagccctc ccgctgatcc	5640
cccagccagc ggtgcgcaac cctagccgca tccacgaaac ttgcccata gcagcgggcg	5700
ggcactttgc actggaactt acaacacccg agcaaggacg cgactctccc gacgcgggga	5760
ggctattctg cccatttggg gacacttccc cgccgctgcc aggacccgct tctctgaaag	5820
gctctccttg cagctgctta gacgctggat ttttttcggg tagtgaaaaa ccagcagcct	5880
cccgcgacca gatctgccac catgaagctg ctgagcagca tcgagcaggc ttgcgacatc	5940
tgcaggctga agaagctgaa gtgcagcaag gagaagccca agtgcgccaa gtgcctgaag	6000
aacaactggg agtgcagata cagccccaag accaagagga gccccctgac cagggcccac	6060
ctgaccgagg tggagagcag gctggagagg ctggagcagc tgttcctgct gatcttcccc	6120
agggaggacc tggacatgat cctgaagatg gacagcctgc aagacatcaa ggccctgctg	6180
accggcctgt tcgtgcagga caacgtgaac aaggacgccg tgaccgacag gctggccagc	6240
gtggagaccg acatgcccct gaccctgagg cagcacagga tcagcgccac cagcagcagc	6300
gaggagagca gcaacaaggg ccagaggcag ctgaccgtga gccccgagtt tcccgggatac	6360
agggccgagt gcgtggtgcc cgagaccagc tgcgccatga aaaggaagga gaagaaggcc	6420
cagaaggaga aggacaagct gcccgtgagc accaccaccg tcgatgacca catgcccccc	6480
atcatgcagt gcgagcccc ccccccgag gccgccagga ttcacgaggt cgtgcccagg	6540
ttcctgagcg acaagctgct ggtgaccaac aggcagaaga acatccccca gctgaccgcc	6600
aaccagcagt tcctgatcgc caggctgata tggtatcagg acggctacga gcagcccagc	6660
gacgaggacc tgaaaaggat caccagacc tggcagcagg ccgacgacga gaacgaggag	6720
agcgacaccc ccttcaggca gatcaccgag atgaccatcc tgaccgtgca gctgatcgtg	6780
gagttcgcca agggcctgcc cggattcgcc aagatcagcc agcccgacca gatcacccctg	6840

ctgaaggctt	gcagcagcga	ggtgatgatg	ctgaggggtg	ccaggaggta	cgacgccgcc	6900
agcgacagca	tcctgttcgc	caacaaccag	gcttacacca	gggacaacta	caggaaggct	6960
ggcatggccg	aggtgatcga	ggacctcctg	cacttctgca	gatgtatgta	cagcatggcc	7020
ctggacaaca	tccactacgc	cctgctgacc	gccgtggtga	tcttcagcga	caggccccgc	7080
ctggagcagc	cccagctggt	ggaggagatc	cagagggtact	acctgaacac	cctgaggatc	7140
tacatcctga	accagctgag	cggcagcgcc	aggagcagcg	tgatctacgg	caagatcctg	7200
agcatcctga	gcgagctgag	gaccctggga	atgcagaaca	gcaatatgtg	tatcagcctg	7260
aagctgaaga	acaggaagct	gcccccttc	ctggaggaga	tttgggacgt	ggccgacatg	7320
agccacaccc	agccccccc	catcctggag	agccccacca	acctgtgaat	cgattagaca	7380
tgataagata	cattgatgag	tttggacaaa	ccacaactag	aatgcagtga	aaaaaatgct	7440
taattttgtga	aattttgtgat	gctattgctt	aattttgtaac	cattataagc	tgcaataaac	7500
aagttaataa	aacattttgca	ttcatTTTTat	gtttcagggtt	caggggggaga	tgtgggaggt	7560
tttttaaagc	aagtaaaacc	tctacaaatg	tggtatctag	agctcttcca	aatagatctg	7620
gaagggtgctg	aggtacgatg	agaccgcgac	cagggtgcaga	ccctgcgagt	gtggcggtaa	7680
acatattagg	aaccagcctg	tgatgctgga	tgtgaccgag	gagctgaggc	ccgatcactt	7740
ggtgctggcc	tgcacccgcg	ctgagtttgg	ctctagcgat	gaagatacag	attgaggtac	7800
tgaaatgtgt	gggcgtggct	taagggtggg	aaagaatata	taagggtggg	gtcttatgta	7860
gttttgtatc	tgttttgcag	cagccgccgc	cgccatgagc	accaactcgt	ttgatggaag	7920
cattgtgagc	tcataattga	caacgcgcat	gcccccatgg	gccgggggtgc	gtcagaatgt	7980
gatgggctcc	agcattgatg	gtcgccccgt	cctgccccga	aactctacta	ccttgacctt	8040
cgagaccgtg	tctggaacgc	cgttggagac	tgcagcctcc	gccgccgctt	cagccgctgc	8100
agccaccgcc	cgcggggattg	tgactgactt	tgctttcctg	agcccgttg	caagcagtg	8160
agcttcccgt	tcattccgcc	gcgatgacaa	gttgacggct	cttttggcac	aattggattc	8220
tttgacccgg	gaacttaatg	tcgtttctca	gcagctgttg	gatctgcgcc	agcaggtttc	8280
tgccctgaag	gtttcctccc	ctcccaatgc	ggtttaaaac	ataaataaaa	aaccagactc	8340
tgtttgatt	tggatcaagc	aagtgtcttg	ctgtctttat	ttaggggttt	tgcgcgcgcg	8400
gtaggcccgg	gaccagcgg	ctcggtcggt	gagggtcctg	tgtatTTTT	ccaggacgtg	8460
gtaaagggtga	ctctggatgt	tcagatacat	gggcataagc	ccgtctctgg	ggtggaggta	8520
gcaccactgc	agagcttcat	gctgcgggg	ggtgtttag	atgatccagt	cgtagcagga	8580
gcgctggg	tggtgcctaa	aaatgtcttt	cagtagcaag	ctgattgcca	ggggcaggcc	8640
cttggtgtaa	gtgtttacaa	agcggttaag	ctgggatggg	tgcatacgtg	gggatatgag	8700
atgcatcttg	gactgtatTT	ttaggttggc	tatgttccca	gccatatccc	tccggggatt	8760
catgttgtgc	agaaccacca	gcacagtgt	tccggtgcac	ttgggaaatt	tgatcatgtag	8820
cttagaagga	aatgcgtgga	agaacttgga	gacgcccttg	tgacctccaa	gattttccat	8880

gcattcgtcc	ataatgatgg	caatgggccc	acgggcgggc	gcctgggcga	agatatttct	8940
gggatcacta	acgtcatagt	tgtgttccag	gatgagatcg	tcataggcca	tttttacaaa	9000
gcgcgggcgg	aggggtgccag	actgcggtat	aatgggtcca	tccggcccag	gggcgtagtt	9060
accctcacag	atttgcattt	cccacgcttt	gagttcagat	gggggggatca	tgtctacctg	9120
cggggcgatg	aagaaaacgg	tttccggggg	aggggagatc	agctgggaag	aaagcagggt	9180
cctgagcagc	tgcgacttac	cgcagccggt	gggcccgtaa	atcacaccta	ttaccgggtg	9240
caactggtag	ttaagagagc	tgcagctgcc	gtcatccctg	agcagggggg	ccacttcggt	9300
aagcatgtcc	ctgactcgca	tgttttccct	gaccaaattc	gccagaaggc	gctcgccgcc	9360
cagcgatagc	agttcttgca	aggaagcaaa	gtttttcaac	ggtttgagac	cgtccgccgt	9420
aggcatgctt	ttgagcgttt	gaccaagcag	ttccaggcgg	tcccacagct	cggtcacctg	9480
ctctacggca	tctcgatcca	gcatactctc	tcgtttcgcg	ggttggggcg	gctttcgctg	9540
tacggcagta	gtcggtgctc	gtccagacgg	gccagggtca	tgtctttcca	cgggcgcagg	9600
gtcctcgtca	gcgtagtctg	ggtcacgggt	aaggggtgcg	ctccgggctg	cgcgctggcc	9660
aggggtgcgt	tgaggctggt	cctgctgggt	ctgaagcgct	gccgggtctt	gccctgcgcg	9720
tcggccaggt	agcatttgac	catggtgtca	tagtccagcc	cctccgcggc	gtggcccttg	9780
gcgcgcagct	tgcccttgga	ggaggcgccg	cacgaggggc	agtgcagact	tttgagggcg	9840
tagagcttgg	gcgcgagaaa	taccgattcc	ggggagtagg	catccgcgcc	gcaggccccg	9900
cagacgggtc	cgcattccac	gagccagggt	agctctggcc	gttcgggggt	aaaaaccagg	9960
tttcccccat	gctttttgat	gcgtttctta	cctctggttt	ccatgagccg	gtgtccacgc	10020
tcggtgacga	aaaggctgtc	cgtgtccccg	tatacagact	tgagaggcct	gtcctcgacc	10080
gatgcccttg	agagccttca	accagtcag	ctccttccgg	tgggcgcggg	gcatgactat	10140
cgtcgccgca	cttatgactg	tcttctttat	catgcaactc	gtaggacagg	tgccggcagc	10200
gctctgggtc	attttcgggc	aggaccgctt	tcgctggagc	gcgacgatga	tcggcctgtc	10260
gcttgcggtg	ttcgggaatct	tgcacgccct	cgtcaagcc	ttcgtcactg	gtcccgccac	10320
caaacgtttc	ggcgagaagc	aggccattat	cgccggcatg	gcggccgacg	cgtggggcta	10380
cgtcttgctg	gcgttcgcga	cgcgaggctg	gatggccttc	cccattatga	ttcttctcgc	10440
ttccggcggc	atcgggatgc	ccgcgttgca	ggccatgctg	tccaggcagg	tagatgacga	10500
ccatcagggg	cagcttcaag	gccagcaaaa	ggccaggaac	cgtaaaaagg	ccgcgttgct	10560
ggcgtttttc	cataggctcc	gccccctga	cgagcatcac	aaaaatcgac	gctcaagtca	10620
gaggtggcga	aaccgcagag	gactataaag	ataccaggcg	tttccccctg	gaagctccct	10680
cgtgcgctct	cctgttccga	ccctgccgct	taccggatac	ctgtccgcct	ttctcccttc	10740
gggaagcggt	gcgctttctc	atagctcacg	ctgtaggtat	ctcagttcgg	tgtaggctcgt	10800
tcgctccaag	ctgggctgtg	tgcacgaacc	ccccgttcag	cccgaccgct	gcgccttatc	10860
cggttaactat	cgtcttgagt	ccaaccgggt	aagacacgac	ttatcgccac	tggcagcagc	10920

cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg 10980
 gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc 11040
 agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag 11100
 cgggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga 11160
 tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaaac gaaaactcac gttaagggat 11220
 tttggctatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag 11280
 ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttgggtc gacagttacc aatgcttaat 11340
 cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc 11400
 cgctcgttag ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat 11460
 accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag 11520
 ggccgagcgc agaagtgggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg 11580
 ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc 11640
 tgcaggcatc gtggtgtcac gctcgtcgtt tgggtatggc tcattcagct ccggttccca 11700
 acgatcaagg cgagttacat gatcccccgt gttgtgcaaa aaagcgggta gtccttcggg 11760
 tcctccgatc gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta tcactcatgg ttatggcagc 11820
 actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta 11880
 ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc 11940
 aacacgggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg 12000
 ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc 12060
 cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc 12120
 aaaaacagga aggcaaatg ccgcaaaaaa ggggaataagg gcgacacgga aatgttgaat 12180
 actcatactc ttcctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag 12240
 cggatacata tttgaatgta tttagaaaaa 12270

<210> 7
 <211> 10404
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic mIL-21

<400> 7
 taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgacg tctaagaaac 60
 cattattatc atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc acgaggccct ttcgtcttca 120
 attaatcgca ccggtatcta tgtcgggtgc ggagaaagag gtaatgaaat ggcagctagc 180
 atcatcaata atatacctta ttttggattg aagccaatat gataatgagg ggggtggagtt 240
 tgtgacgtgg cgcggggcgt ggggaacgggg cgggtgacgt agtagtgtgg cggaagtgtg 300
 atgttgcaag tgtggcgga ccatgtgaag cgacggatgt ggcaaaagtg acgttttttg 360

tgtgcgccgg	tgtacacagg	aagtgacaat	tttcgcgcg	ttttaggcgg	atgttgtagt	420
aaatttgggc	gtaaccgagt	aagatttggc	cattttcgcg	ggaaaactga	ataagaggaa	480
gtgaaatctg	aataattttg	tgttactcat	agcgcgtaat	atttgtctag	ggagatccgg	540
taccgatatc	ctagacaacg	atgctgagct	aactataacg	gtcctaaggt	agcgaccgcg	600
gagactaggt	gtatttatct	aagcgatcgc	ttaattaagg	ccggccgccc	caataaaata	660
tctttatatt	cattacatct	gtgtgttggt	tttttgtgtg	aatcgatagt	actaacatac	720
gctctccatc	aaaacaaaac	gaaacaaaac	aaactagcaa	aataggctgt	ccccagtgca	780
agtgcaggtg	ccagaacatt	tctctatcga	taatgcaggt	cggagtactg	tcctccgagc	840
ggagtactgt	cctccgagcg	gagtactgtc	ctccgagcgg	agtactgtcc	tccgagcgga	900
gtactgtcct	ccgagcggag	tactgtcctc	cgagcggaga	ctcttcgaag	gaagaggggc	960
ggggtcgatc	gaccccgccc	ctcttccttc	gaaggaagag	gggcgggggc	gaagacctag	1020
aggggtatata	atgggtgcct	tagctggtgt	gtgagctcat	cttcctgtag	atcacgcgtc	1080
gaagaaggtg	agtaatctta	acatgctctt	tttttttttt	tttgctaata	ccttttgtgt	1140
gctgatgtta	ggatgacatt	tacaacaaat	gtttgttcct	gacaggaaaa	accttgctgg	1200
gtaccttcgt	tgccggacac	ttcttgtcct	ctactttgga	aaaaaggaat	tgagagccgc	1260
tagcccacca	tggagaggac	cctggtgtgc	ctggtggtga	tcttcctggg	caccgtggcc	1320
cacaagagca	gccccagggg	acccgacagg	ctgctgatcc	ggctgagaca	cctgatcgac	1380
atcgtaggagc	agctgaagat	ttacgagaac	gacctggacc	ccgagctgct	gtccgcccc	1440
caggacgtga	agggccactg	cgagcacgcc	gccttcgcct	gcttcagaa	ggccaagctg	1500
aagcccagca	accccggaac	caacaagacc	ttcatcatcg	acctggtggc	ccagctgaga	1560
aggaggctgc	ccgccaggag	gggcggcaag	aagcagaagc	acatcgccaa	gtgccccagc	1620
tgcgacagct	acgagaagcg	gaccccccaag	gagttcctgg	agaggctgaa	gtggctgctg	1680
caaaagatga	tccaccagca	cctgagctga	atcgattgcg	caaagctttc	gcgataggcg	1740
agaccaatgg	gtgtgtacgt	agcggccgct	cgagaacttg	tttattgcag	cttataatgg	1800
ttacaaataa	agcaatagca	tcacaaattt	cacaaataaa	gcattttttt	cactgcattc	1860
tagttgtggt	ttgtccaaac	tcatcaatgt	atcttatcat	gtctcgtag	gcgtggtagg	1920
tccgaacgaa	tccatggatt	accctgttat	ccctatccgg	agttaacctc	gaggacttcg	1980
gaacttctag	aaccgagacc	ttcagtttaa	acgctcttct	ccccctcgag	ggcctccgcg	2040
ccgggttttg	gcgcctcccc	cgggcgcccc	cctcctcacg	gcgagcgctg	ccacgtcaga	2100
cgaagggcgc	agcgagcgct	ctgatccttc	cgcccggacg	ctcaggacag	cggcccgcgtg	2160
ctcataagac	tcggccttag	aaccccagta	tcagcagaag	gacatttttag	gacgggactt	2220
gggtgactct	agggcactgg	ttttctttcc	agagagcgga	acaggcgagg	aaaagtagtc	2280
ccttctcggc	gattctgcgg	agggatctcc	gtggggcggt	gaacgccgat	gattatataa	2340
ggacgcgcgg	ggtgtggcac	agctagttcc	gtcgcagccg	ggatttgggg	cgcggttctt	2400

gtttgtggat	cgctgtgatc	gtcacttggt	gagtagcggg	ctgctgggct	gggtacgtgc	2460
gctcgggggt	ggcgagtgtg	ttttgtgaag	tttttttaggc	accttttgaa	atgtaatcat	2520
ttgggtcaat	atgtaatttt	cagtgttaga	ctagtaaatt	gtccgctaaa	ttctggccgt	2580
ttttggcttt	tttgtttagac	ggcatgcggg	gggggggggg	ggcaattggc	caccatgggc	2640
cccaagaaga	aaaggaaggt	ggcccccccc	accgacgtga	gcctggggcg	cgagctgcac	2700
ctggacggcg	aggacgtggc	catggcccac	gccgacgccc	tggacgactt	cgacctggac	2760
atgctggggc	acggcgacag	ccccggcccc	ggcttcaccc	cccacgacag	cgccccctac	2820
ggcgccctgg	acatggccga	cttcgagttc	gagcagatgt	tcaccgacgc	cctgggcatc	2880
gacgagtacg	gcggccatat	ggagatgccc	gtggacagga	ttctggaggc	cgaactcgcc	2940
gtggagcaga	aaagcgacca	gggcgtggag	ggccccggcg	gaaccggcgg	cagcggcagc	3000
agccccaacg	accccgtagc	caacatctgc	caggccgccc	acaagcagct	gttcaccctg	3060
gtggagtggg	ccaagaggat	tccccacttc	agcagcctgc	ccctggacga	ccagggtgatc	3120
ctgctgaggg	ccggatggaa	cgagctgctg	atcgccagct	tcagccacag	gagcatcgac	3180
gtgagggacg	gcatcctgct	ggccaccggc	ctgcacgtcc	ataggaacag	cgcccacagc	3240
gccggagtgg	gcgccatctt	cgacaggggtg	ctgaccgagc	tggtgagcaa	gatgagggac	3300
atgaggatgg	acaagaccga	gctgggctgc	ctgagggcca	tcctcctgtt	caacccccgag	3360
gtgagggggc	tgaagagcgc	ccaggagggtg	gagctgctga	gggagaaggt	gtacgccgcc	3420
ctggaggagt	acaccaggac	caccaccccc	gacgagcccc	gcagattcgc	caagctgctg	3480
ctgaggctgc	ccagcctgag	gagcatcggc	ctgaagtgcc	tggagcacct	gttcttcttc	3540
aggctgatcg	gcgacgtgcc	catcgacacc	ttcctgatgg	agatgctgga	gagccccagc	3600
gacagctgag	ccggcaactc	gctgtagtaa	ttccagcgag	aggcagaggg	agcgagcggg	3660
cggcgggcta	gggtggagga	gcccggcgag	cagagctgcg	ctgcgggctg	cctgggaagg	3720
gagatccgga	gcgaataggg	ggcttcgcct	ctggcccagc	cctcccgtg	atcccccagc	3780
cagcggtgcg	caaccctagc	cgcatccacg	aaactttgcc	catagcagcg	ggcgggcact	3840
ttgcactgga	acttacaaca	cccagcaag	gacgcgactc	tcccagcgcg	gggaggctat	3900
tctgcccatt	tggggacact	tccccgccgc	tgccaggacc	cgcttctctg	aaaggctctc	3960
cttgacgtg	cttagacgct	ggattttttt	cgggtagtgg	aaaaccagca	gcctcccgcg	4020
accagatctg	ccaccatgaa	gctgctgagc	agcatcgagc	aggcttgcca	catctgcagg	4080
ctgaagaagc	tgaagtgcag	caaggagaag	cccaagtgcg	ccaagtgcct	gaagaacaac	4140
tgggagtgca	gatacagccc	caagaccaag	aggagccccc	tgaccagggc	ccacctgacc	4200
gaggtgagga	gcaggctgga	gaggctggag	cagctgttcc	tgctgatctt	ccccagggag	4260
gacctggaca	tgatcctgaa	gatggacagc	ctgcaagaca	tcaaggccct	gctgaccggc	4320
ctgttcgtgc	aggacaacgt	gaacaaggac	gccgtgaccg	acaggctggc	cagcgtggag	4380
accgacatgc	ccctgaccct	gaggcagcac	aggatcagcg	ccaccagcag	cagcagggag	4440

agcagcaaca	agggccagag	gcagctgacc	gtgagccccg	agtttcccgg	gatcaggccc	4500
gagtgcgtgg	tgcccagac	ccagtgcgcc	atgaaaagga	aggagaagaa	ggcccagaag	4560
gagaaggaca	agctgcccgt	gagcaccacc	accgtcgatg	accacatgcc	ccccatcatg	4620
cagtgcgagc	ccccccccc	cgaggccgcc	aggattcacg	aggtcgtgcc	caggttcctg	4680
agcgacaagc	tgctggtgac	caacaggcag	aagaacatcc	cccagctgac	cgccaaccag	4740
cagttcctga	tcgccaggct	gatctggtat	caggacggct	acgagcagcc	cagcgacgag	4800
gacctgaaaa	ggatcaccca	gacctggcag	caggccgacg	acgagaacga	ggagagcgac	4860
accccttca	ggcagatcac	cgagatgacc	atcctgaccg	tgcagctgat	cgtggagtcc	4920
gccaagggcc	tgcccggatt	cgccaagatc	agccagcccc	accagatcac	cctgctgaag	4980
gcttgacgca	gcgaggtgat	gatgctgagg	gtggccagga	ggtacgacgc	cgccagcgac	5040
agcatcctgt	tcgccaacaa	ccaggcttac	accagggaca	actacaggaa	ggctggcatg	5100
gccgaggtga	tcgaggacct	cctgcacttc	tgcagatgta	tgtacagcat	ggccctggac	5160
aacatccact	acgccctgct	gaccgccgtg	gtgatcttca	gcgacaggcc	cggcctggag	5220
cagccccagc	tggtggagga	gatccagagg	tactacctga	acaccctgag	gatctacatc	5280
ctgaaccagc	tgagcggcag	cgccaggagc	agcgtgatct	acggcaagat	cctgagcatc	5340
ctgagcgagc	tgaggaccct	gggaatgcag	aacagcaata	tgtgtatcag	cctgaagctg	5400
aagaacagga	agctgcccc	cttcctggag	gagatttggg	acgtggccga	catgagccac	5460
acccagcccc	ccccatcct	ggagagcccc	accaacctgt	gaatcgatta	gacatgataa	5520
gatacattga	tgagtttgga	caaaccacaa	ctagaatgca	gtgaaaaaaaa	tgcttaattt	5580
gtgaaatttg	tgatgctatt	gcttaatttg	taaccattat	aagctgcaat	aaacaagtta	5640
ataaaacatt	tgcattcatt	ttatgtttca	ggttcagggg	gagatgtggg	aggtttttta	5700
aagcaagtaa	aacctctaca	aatgtggtat	ctagagctct	tccaaataga	tctggaaggt	5760
gctgaggtac	gatgagaccc	gcaccagggtg	cagaccctgc	gagtgtggcg	gtaaacatat	5820
taggaaccag	cctgtgatgc	tggatgtgac	cgaggagctg	aggcccgatc	acttggtgct	5880
ggcctgcacc	cgcgctgagt	ttggctctag	cgatgaagat	acagattgag	gtactgaaat	5940
gtgtgggctg	ggcttaaggg	tgggaaagaa	tatataaggt	gggggtctta	tgtagttttg	6000
tatctgtttt	gcagcagccg	ccgccgccat	gagcaccaac	tcgtttgatg	gaagcattgt	6060
gagctcatat	ttgacaacgc	gcatgcccc	atgggcccgg	gtgcgtcaga	atgtgatggg	6120
ctccagcatt	gatggtcgcc	ccgtcctgcc	cgcaaactct	actaccttga	cctacgagac	6180
cgtgtctgga	acgccgttgg	agactgcagc	ctccgccgcc	gcttcagccg	ctgcagccac	6240
cgcccgccgg	attgtgactg	actttgcttt	cctgagcccc	cttgcaagca	gtgcagcttc	6300
ccgttcatcc	gcccgcgatg	acaagttgac	ggctcttttg	gcacaattgg	attctttgac	6360
ccgggaactt	aatgtcgttt	ctcagcagct	gttggtatctg	cgccagcagg	tttctgcctt	6420
gaaggcttcc	tcccctccca	atgcggttta	aaacataaat	aaaaaaccag	actctgtttg	6480

gatttggatc aagcaagtgt cttgctgtct ttatttaggg gttttgcgcg cgcggtaggc	6540
ccgggaccag cggctctcggc cgttgagggc cctgtgtatt ttttccagga cgtggtaaag	6600
gtgactctgg atgttcagat acatgggcat aagcccgtct ctgggggtgga ggtagcacca	6660
ctgcagagct tcatgctgcg ggggtgggtgt gtagatgac cagtcgtagc aggagcgctg	6720
ggcgtgggtgc ctaaaaatgt ctttcagtag caagctgatt gccaggggca ggcccttggt	6780
gtaagtgttt acaaagcggc taagctggga tgggtgcata cgtggggata tgagatgcat	6840
cttggaactgt attttttaggt tggctatgtt cccagccata tccctccggg gattcatgtt	6900
gtgcagaacc accagcacag tgtatccggc gcacttggga aatttgtcat gtagcttaga	6960
aggaaatgcg tggaagaact tggagacgcc cttgtgacct ccaagatatt ccatgcattc	7020
gtccataatg atggcaatgg gccacgggc ggcggcctgg gcgaagatat ttctgggatc	7080
actaacgtca tagttgtgtt ccaggatgag atcgtcatag gccattttta caaagcgcg	7140
gcggagggtg ccagactgcg gtataatggc tccatccggc ccaggggctg agttaccctc	7200
acagatttgc atttcccacg ctttgagttc agatgggggg atcatgtcta cctgcggggc	7260
gatgaagaaa acggtttccg gggtagggga gatcagctgg gaagaaagca ggttcctgag	7320
cagctgcgac ttaccgcagc cgggtggggc gtaaatacaca cctattaccg ggtgcaactg	7380
gtagttaaga gagctgcagc tgccgtcatc cctgagcagg ggggccactt cgtaaagcat	7440
gtccctgact cgcattgttt ccctgaccaa atccgccaga aggcgctcgc cggccagcga	7500
tagcagttct tgcaaggaag caaagttttt caacgggttg agaccgtccg ccgtaggcat	7560
gcttttgagc gtttgaccaa gcagttccag gcgggtccac agctcgggtca cctgctctac	7620
ggcatctcga tccagcatat ctcctcgttt cgcgggttg ggcggctttc gctgtacggc	7680
agtagtcggc gctcgtccag acggggccagg gtcattgtct tccacgggcg cagggtcctc	7740
gtcagcgtag tctgggtcac ggtgaagggg tgcgtccgg gctgcgcgct ggccagggtg	7800
cgcttgaggc tggtcctgct ggtgctgaag cgctgccggc cttcgccctg cgcgtcggcc	7860
aggtagcatt tgaccatggc gtcattagtc agcccctccg cggcgtggcc cttggcgcgc	7920
agcttgccct tggaggaggc gccgcacgag gggcagtgca gacttttgag ggcgtagagc	7980
ttgggcgcga gaaataaccg ttccggggag taggcatccg cggcgcaggc cccgcagacg	8040
gtctcgatt ccacgagcca ggtgagctct ggccgttcgg ggtcaaaaac cagggtttccc	8100
ccatgctttt tgatgcgttt cttacctctg gtttccatga gccgggtgtcc acgctcgggtg	8160
acgaaaaggc tgtccgtgtc cccgtataca gacttgagag gcctgtcctc gaccgatgcc	8220
cttgagagcc ttcaaccag tcagctcctt ccgggtgggcg cggggcatga ctatcgtcgc	8280
cgcacttatg actgtcttct ttatcatgca actcgtagga cagggtgccg cagcgtctgt	8340
ggtcattttc ggcgaggacc gctttcgctg gagcgcgacg atgatcggcc tgcgcttgc	8400
ggatttcgga atcttgacg ccctcgctca agccttcgtc actgggtccc caccaaaacg	8460
tttcggcgag aagcaggcca ttatcgccgg catggcggcc gacgcgctgg gctacgtctt	8520

gctggcgcttc gcgacgcgag gctggatggc cttccccatt atgattcttc tcgcttccgg 8580
 cggcatcggg atgcccgcgt tgcaggccat gctgtccagg caggtagatg acgaccatca 8640
 gggacagctt caaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggtt 8700
 tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagagggtg 8760
 gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg 8820
 ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcggaag 8880
 cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc 8940
 caagctgggc tgtgtgcacg aacccccctg tcagcccagc cgctgcgcct tatccggtaa 9000
 ctatcgtctt gagtccaacc cggtaaagaca cgacttatcg cactggcag cagccactgg 9060
 taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga agtggtggcc 9120
 taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggatatctgc gctctgctga agccagttac 9180
 cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaaaa accaccgctg gtagcggtgg 9240
 tttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt 9300
 gatcttttct acgggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt 9360
 catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat gaagttttta 9420
 atcaatctaa agtatatatg agtaaaactg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga 9480
 ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg ttcattccata gttgcctgac tccccgctgt 9540
 gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcg 9600
 agaccacgc tcaccggctc cagattttatc agcaataaac cagccagccg gaagggccga 9660
 gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgccggga 9720
 agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcca ttgctgcagg 9780
 catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcattc agctccggtt cccaacgatc 9840
 aaggcgagtt acatgatccc catgtttgtg caaaaaagcg gttagctcct tcggtcctcc 9900
 gatcgttgtc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg cagcactgca 9960
 taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactggtg agtactcaac 10020
 caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg cgtcaacacg 10080
 ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa aacgttcttc 10140
 ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt aaccactcgt 10200
 tgcaccaaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac 10260
 aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aaggcgaca cggaatgtt gaatactcat 10320
 actcttcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca tgagcggata 10380
 catatttgaa tgtatttaga aaaa 10404

<210> 8
 <211> 10452
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic hIL-21

<400> 8

taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgacg tctaagaaac	60
cattattatc atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc acgaggccct ttcgtcttca	120
attaatcgca ccggtatcta tgtcgggtgc ggagaaagag gtaatgaaat ggcagctagc	180
atcatcaata atatacctta ttttggtattg aagccaatat gataatgagg ggggtggagtt	240
tgtgacgtgg cgcggggcgt ggggaacgggg cgggtgacgt agtagtgtgg cggaagtgtg	300
atgttgcaag tgtggcggaa cacatgtaag cgacggatgt ggcaaaagtg acgttttttg	360
tgtgcgccgg tgtacacagg aagtgacaat tttcgcgcgg ttttaggcgg atgttgtagt	420
aaatttgggc gtaaccgagt aagatttggc cattttcgcg ggaaaactga ataagaggaa	480
gtgaaatctg aataattttg tgttactcat agcgcgtaat atttgtctag ggagatccgg	540
taccgatatc ctagacaacg atgctgagct aactataacg gtcctaaggt agcgaccgcg	600
gagactaggt gtatttatct aagcgatcgc ttaattaagg ccggccgcgg caataaaata	660
tctttatctt cattacatct gtgtgttggg tttttgtgtg aatcgatagt actaacatac	720
gctctccatc aaaacaaaac gaaacaaaac aaactagcaa aataggctgt cccagtgca	780
agtgcagggt ccagaacatt tctctatcga taatgcagggt cggagtactg tcctccgagc	840
ggagtactgt cctccgagcg gagtactgtc ctccgagcgg agtactgtcc tccgagcgga	900
gtactgtcct ccgagcggag tactgtcctc cgagcggaga ctcttcgaag gaagaggggc	960
gggggtcgatc gaccccgccc ctcttccttc gaaggaagag gggcggggtc gaagacctag	1020
agggatatata atgggtgcct tagctggtgt gtgagctcat ctctctgtag atcacgcgtc	1080
gaagaagggtg agtaatctta acatgctctt tttttttttt tttgctaata ccttttgtgt	1140
gctgatgtta ggatgacatt tacaacaaat gtttgttcct gacaggaaaa accttgctgg	1200
gtaccttcgt tgccggacac ttcttgtcct ctactttgga aaaaaggaaat tgagagccgc	1260
tagcccacca tgagaagcag ccccggaac atggagagaa tcgtgatctg cctgatgggtg	1320
atcttcctgg gcaccctggg gcataagagc agcagccagg gccaggacag acacatgac	1380
cgcattgagac agctgatcga catcgtggac cagctgaaga actacgtgaa cgacctgggtg	1440
cccgagttcc tgcccgcccc cgaggacgtg gagaccaact gcgagtggag cgccttcagc	1500
tgcttcacga agggccagct gaagtccgcc aacaccggca acaacgagag aatcatcaac	1560
gtgagcatca agaagctgaa gcggaagccc cccagcacca acgcccgaag aagacagaag	1620
cacagactga cctgtcccag ctgcgacagc tacgagaaga agcccccaa ggagttcctg	1680
gagagattca agagcctgct gcaaaagatg atccaccagc acctgagcag cagaaccac	1740
ggcagcgagg acagctgaat cgattgcgca aagctttcgc gataggcgag accaatgggt	1800
gtgtacgtag cggccgctcg agaacttggt tattgcagct tataatgggt acaataaag	1860

caatagcatc	acaaatttca	caaataaagc	atTTTTttca	ctgcattcta	gttgtggttt	1920
gtccaaactc	atcaatgtat	cttatcatgt	ctcgtacggc	gtggtagggtc	cgaacgaatc	1980
catggattac	cctgttatcc	ctatccggag	ttaacctcga	ggacttcgga	acttctagaa	2040
ccagaccgtt	cagtttaaac	gctcttctcc	ccctcgaggg	cctccgcgcc	gggttttggc	2100
gcctccccgc	ggcgcccccc	tcctcacggc	gagcgctgcc	acgtcagacg	aagggcgag	2160
cgagcgtcct	gatccttccg	cccggacgct	caggacagcg	gcccgtgct	cataagactc	2220
ggccttagaa	ccccagtatc	agcagaagga	catttttagga	cgggacttgg	gtgactctag	2280
ggcactgggt	ttctttccag	agagcggaac	aggcgaggaa	aagtagtccc	ttctcggcga	2340
ttctgcggag	ggatctccgt	ggggcggtga	acgccgatga	ttatataagg	acgcgccggg	2400
tgtggcacag	ctagtccgt	cgagccggg	atTTgggtcg	cggttcttgt	ttgtggatcg	2460
ctgtgatcgt	cacttggtga	gtagcgggct	gctgggctgg	gtacgtgcgc	tcggggttgg	2520
cgagtgtgtt	ttgtgaagtt	ttttaggcac	cttttgaaat	gtaatcattt	gggtcaatat	2580
gtaattttca	gtgttagact	agtaaattgt	ccgctaaatt	ctggccgttt	ttggcttttt	2640
tgtagacgg	catgcggggg	gggggggggg	caattggcca	ccatgggccc	caagaagaaa	2700
aggaaggtgg	cccccccac	cgacgtgagc	ctgggcgacg	agctgcacct	ggacggcgag	2760
gacgtggcca	tggcccacgc	cgacgccctg	gacgacttcg	acctggacat	gctgggcgac	2820
ggcgacagcc	ccggccccgg	cttcaccccc	cacgacagcg	ccccctacgg	cgccctggac	2880
atggccgact	tcgagttcga	gcagatgttc	accgacgccc	tgggcatcga	cgagtacggc	2940
ggccatatgg	agatgcccgt	ggacaggatt	ctggaggccg	aactcgccgt	ggagcagaaa	3000
agcgaccagg	gcgtggaggg	ccccggcgga	accggcggca	gcggcgagcag	ccccaacgac	3060
cccgtgacca	acatctgcca	ggccgccgac	aagcagctgt	tcaccctggt	ggagtgggcc	3120
aagaggattc	cccacttcag	cagcctgccc	ctggacgacc	aggtgatcct	gctgagggcc	3180
ggatggaacg	agctgctgat	cgccagcttc	agccacagga	gcatcgacgt	gagggacggc	3240
atcctgctgg	ccaccggcct	gcacgtccat	aggaacagcg	cccacagcgc	cggagtgggc	3300
gccatcttcg	acagggtgct	gaccgagctg	gtgagcaaga	tgagggacat	gaggatggac	3360
aagaccgagc	tgggctgcct	gagggccatc	atcctgttca	accccgaggt	gaggggcctg	3420
aaaagcgccc	aggaggtgga	gctgctgagg	gagaagggtgt	acgccgccct	ggaggagtac	3480
accaggacca	cccaccccgga	cgagcccggc	agattcgcca	agctgctgct	gaggctgccc	3540
agcctgagga	gcatcggcct	gaagtgcctg	gagcacctgt	tcttcttcag	gctgatcggc	3600
gacgtgcccc	tcgacacctt	cctgatggag	atgctggaga	gccccagcga	cagctgagcc	3660
ggcaactcgc	tgtagtaatt	ccagcgagag	gcagagggag	cgagcgggcg	gcgggctagg	3720
gtggaggagc	ccggcgagca	gagctgcgct	gcgggcgtcc	tgggaaggga	gatccggagc	3780
gaataggggg	cttcgcctct	ggcccagccc	tcccgtgat	ccccagcca	gcggtgcgca	3840
accctagccg	catccacgaa	actttgcca	tagcagcggg	cgggcacttt	gcactggaac	3900

ttacaacacc	cgagcaagga	cgcgactctc	ccgacgcggg	gaggctattc	tgcccatttg	3960
gggacacttc	cccgccgctg	ccaggacccg	cttctctgaa	aggctctcct	tgacgctgct	4020
tagacgctgg	atTTTTTTTcg	ggtagtgga	aaccagcagc	ctcccgcgac	cagatctgcc	4080
accatgaagc	tgctgagcag	catcgagcag	gcttgcgaca	tctgcaggct	gaagaagctg	4140
aagtgcagca	aggagaagcc	caagtgcgcc	aagtgcctga	agaacaactg	ggagtgcaga	4200
tacagcccca	agaccaagag	gagccccctg	accagggccc	acctgaccga	ggtggagagc	4260
aggctggaga	ggctggagca	gctgttctctg	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
ggccagaggc	agctgaccgt	gagccccgag	tttcccgga	tcaggcccga	gtgcgtggtg	4560
cccagagacc	agtgcgccat	gaaaaggaag	gagaagaagg	cccagaagga	gaaggacaag	4620
ctgcccgtga	gcaccaccac	cgtcgatgac	cacatgcccc	ccatcatgca	gtgcgagccc	4680
cccccccccg	aggccgccag	gattcacgag	gtcgtgccca	ggttcctgag	cgacaagctg	4740
ctggtgacca	acaggcagaa	gaacatcccc	cagctgaccg	ccaaccagca	gttcctgatc	4800
gccaggctga	tctggtatca	ggacggctac	gagcagccca	gcgacgagga	cctgaaaagg	4860
atcaccaga	cctggcagca	ggccgacgac	gagaacgagg	agagcgacac	ccccttcagg	4920
cagatcaccc	agatgaccat	cctgaccgtg	cagctgatcg	tggagttcgc	caagggcctg	4980
cccggattcg	ccaagatcag	ccagcccgc	cagatcaccc	tgctgaaggc	ttgcagcagc	5040
gaggtgatga	tgctgagggg	ggccaggagg	tacgacgccg	ccagcgacag	catcctgttc	5100
gccaacaacc	aggcttacac	cagggacaac	tacaggaagg	ctggcatggc	cgaggtgatc	5160
gaggacctcc	tgactttctg	cagatgtatg	tacagcatgg	ccctggacaa	catccactac	5220
gccctgctga	ccgccgtggt	gatcttcagc	gacaggcccc	gcctggagca	gccccagctg	5280
gtggaggaga	tccagaggta	ctacctgaac	accctgagga	tctacatcct	gaaccagctg	5340
agcggcagcg	ccaggagcag	cgtgatctac	ggcaagatcc	tgagcatcct	gagcgagctg	5400
aggaccctgg	gaatgcagaa	cagcaatatg	tgtatcagcc	tgaagctgaa	gaacaggaag	5460
ctgccccctt	tcctggagga	gatttgggac	gtggccgaca	tgagccacac	ccagcccccc	5520
cccatcctgg	agagccccac	caacctgtga	atcgattaga	catgataaga	tacattgatg	5580
agtttgagca	aaccacaact	agaatgcagt	gaaaaaatg	cttaatttgt	gaaatttgtg	5640
atgctattgc	ttaatttgta	accattataa	gctgcaataa	acaagttaat	aaaacatttg	5700
cattcatttt	atgtttcagg	ttcaggggga	gatgtgggag	gttttttaaa	gcaagtaaaa	5760
cctctacaaa	tgtggtatct	agagctcttc	caaatagata	tggaagggtg	tgaggtagca	5820
tgagacccgc	accagggtgca	gaccctgcga	gtgtggcggt	aaacatatta	ggaaccagcc	5880
tgtgatgctg	gatgtgaccg	aggagctgag	gcccgatcac	ttggtgctgg	cctgcacccg	5940

cgctgagttt	ggctctagcg	atgaagatac	agattgaggt	actgaaatgt	gtgggcgtgg	6000
cttaaggggtg	ggaaagaata	tataaggtgg	gggtcttatg	tagttttgta	tctgttttgc	6060
agcagccgcc	gccgccatga	gcaccaactc	gtttgatgga	agcattgtga	gctcatattt	6120
gacaacgcgc	atgcccccat	gggccgggggt	gcgtcagaat	gtgatgggct	ccagcattga	6180
tggtcgcccc	gtcctgcccc	caaactctac	taccttgacc	tacgagaccg	tgtctggaac	6240
gccgttgag	actgcagcct	ccgccgccgc	ttcagccgct	gcagccaccg	cccgcgggat	6300
tgtgactgac	tttgctttcc	tgagcccgct	tgcaagcagt	gcagcttccc	gttcattccgc	6360
ccgcgatgac	aagttgacgg	ctcttttggc	acaattggat	tctttgaccc	gggaacttaa	6420
tgtcgtttct	cagcagctgt	tggatctgcg	ccagcaggtt	tctgccctga	aggcttcctc	6480
ccctcccaat	gcggtttaaa	acataaataa	aaaaccagac	tctgtttgga	tttgatcaa	6540
gcaagtgtct	tgctgtcttt	atthaggggt	tttgcgcgcg	cggtagggcc	gggaccagcg	6600
gtctcggtcg	ttgaggggtcc	tgtgtatttt	ttccaggacg	tggtaaaggt	gactctggat	6660
gttcagatac	atgggcataa	gcccgtctct	ggggtggagg	tagcaccact	gcagagcttc	6720
atgctgcggg	gtggtgttgt	agatgatcca	gtcgtagcag	gagcgctggg	cgtggtgcct	6780
aaaaatgtct	ttcagtagca	agctgattgc	caggggcagg	cccttggtgt	aagtgtttac	6840
aaagcggtta	agctgggatg	ggtgcatacg	tggggatatg	agatgcatct	tggactgtat	6900
ttttaggttg	gctatgttcc	cagccatatc	cctccgggga	ttcatgttgt	gcagaaccac	6960
cagcacagtg	tatccggtgc	acttgggaaa	tttgtcatgt	agcttagaag	gaaatgcgtg	7020
gaagaacttg	gagacgccct	tgtgacctcc	aagattttcc	atgcattcgt	ccataatgat	7080
ggcaatgggc	ccacgggcgg	cggcctgggc	gaagatatat	ctgggatcac	taacgtcata	7140
gttgtgttcc	aggatgagat	cgtcataggc	cattttttaca	aagcgcgggc	ggaggggtgcc	7200
agactgcggt	ataatggttc	catccggccc	aggggcgtag	ttaccctcac	agatttgcat	7260
ttcccacgct	ttgagttcag	atggggggat	catgtctacc	tgcggggcga	tgaagaaaac	7320
ggtttccggg	gtaggggaga	tcagctggga	agaaagcagg	ttcctgagca	gctgcgactt	7380
accgcagccg	gtgggcccgt	aaatcacacc	tattaccggg	tgcaactggt	agttaagaga	7440
gctgcagctg	ccgtcatccc	tgagcagggg	ggccacttcg	ttaagcatgt	ccctgactcg	7500
catgttttcc	ctgaccaaat	ccgccagaag	gcgctcgccg	cccagcgata	gcagttcttg	7560
caaggaagca	aagtttttca	acggtttgag	accgtccgcc	gtaggcattgc	ttttgagcgt	7620
ttgaccaagc	agttccaggc	ggtcccacag	ctcggtcacc	tgctctacgg	catctcgatc	7680
cagcatatct	cctcgtttcg	cgggttgggg	cggctttcgc	tgtacggcag	tagtcggtgc	7740
tcgtccagac	gggccagggt	catgtctttc	cacgggcgca	gggtcctcgt	cagcgtagtc	7800
tgggtcacgg	tgaaggggtg	cgctccgggc	tgcgcgctgg	ccaggggtcg	cttgaggctg	7860
gtcctgctgg	tgctgaagcg	ctgccgggtct	tcgccctgcg	cgtcggccag	gtagcatttg	7920
accatggtgt	catagtccag	cccctccgcg	gcgtggccct	tggcgcgag	cttgcccttg	7980

gaggaggcgc	cgcacgaggg	gcagtgcaga	cttttgaggg	cgtagagctt	gggcgcgaga	8040
aataccgatt	ccggggagta	ggcatccgcg	ccgcaggccc	cgcacacggt	ctcgcattcc	8100
acgagccagg	tgagctctgg	ccgttcgggg	tcaaaaacca	ggtttcccc	atgctttttg	8160
atgcgtttct	tacctctggt	ttccatgagc	cggtgtccac	gctcggtgac	gaaaaggctg	8220
tccgtgtccc	cgtatacaga	cttgagaggg	ctgtcctcga	ccgatgccct	tgagagcctt	8280
caaccagtc	agctccttcc	ggtgggcgcg	gggcatgact	atcgctcgccg	cacttatgac	8340
tgtcttcttt	atcatgcaac	tcgtaggaca	ggtgccggca	gcgctctggg	tcattttcgg	8400
cgaggaccgc	tttcgctgga	gcgcgacgat	gatcggcctg	tcgcttgccg	tattcggaat	8460
cttgcacgcc	ctcgtcgaag	ccttcgtcac	tggtcccgcc	accaaacggt	tcggcgagaa	8520
gcaggccatt	atcgccggca	tggcggccga	cgcgctgggc	tacgtcttgc	tggcgttcgc	8580
gacgcgaggg	tggtatggct	tccccattat	gattcttctc	gcttcggcg	gcatcgggat	8640
gcccgcgttg	caggccatgc	tgtccaggca	ggtagatgac	gaccatcagg	gacagcttca	8700
aggccagcaa	aaggccagga	accgtaaaaa	ggccgcgttg	ctggcgtttt	tccataggct	8760
ccgccccct	gacgagcatc	acaaaaatcg	acgtcaagt	cagaggtggc	gaaacccgac	8820
aggactataa	agataccagg	cgtttcccc	tggaagctcc	ctcgtgcgct	ctcctgttcc	8880
gaccctgccg	cttaccggat	acctgtccgc	ctttctccct	tcgggaagcg	tggcgctttc	8940
tcatagctca	cgctgtaggt	atctcagttc	ggtgtaggtc	gttcgctcca	agctgggctg	9000
tgtgcacgaa	cccccgttc	agcccgaccg	ctgcgcctta	tccggttaact	atcgtcttga	9060
gtccaacccg	gtaagacacg	acttatcgcc	actggcagca	gccactggta	acaggattag	9120
cagagcgagg	tatgtaggcg	gtgctacaga	gttcttgaag	tggtggccta	actacggcta	9180
cactagaagg	acagtatttg	gtatctgcgc	tctgctgaag	ccagttacct	tcggaaaaag	9240
agttggtagc	tcttgatccg	gcaaacaac	caccgctggt	agcgggtggt	tttttgtttg	9300
caagcagcag	attacgcgca	gaaaaaaagg	atctcaagaa	gatcctttga	tcttttctac	9360
ggggtctgac	gctcagtgga	acgaaaactc	acgttaaggg	attttggtca	tgagattatc	9420
aaaaaggatc	ttcacctaga	tccttttaaa	ttaaaaatga	agttttaaat	caatctaaag	9480
tatatatgag	taaacttggt	ctgacagtta	ccaatgctta	atcagtgagg	cacctatctc	9540
agcgatctgt	ctatttcggt	catccatagt	tgctgactc	cccgtcgtgt	agataactac	9600
gatacgggag	ggcttaccat	ctggccccag	tgctgcaatg	ataccgcgag	accacgctc	9660
accggctcca	gatttatcag	caataaacca	gccagccgga	agggccgagc	gcagaagtgg	9720
tcctgcaact	ttatccgcct	ccatccagtc	tattaattgt	tgccgggaag	ctagagtaag	9780
tagttcgcca	gttaatagtt	tgcgcaacgt	tggtgccatt	gctgcaggca	tcgtgggtgtc	9840
acgctcgtcg	tttggtatgg	cttcattcag	ctccggttcc	caacgatcaa	ggcgagttac	9900
atgatcccc	atgttggtgca	aaaaagcggg	tagctccttc	ggtcctccga	tcgttgctcag	9960
aagtaagtgg	gccgcagtgt	tatcactcat	ggttatggca	gcactgcata	attctcttac	10020

```

tgtcatgccca tccgtaagat gcttttctgt gactggtgag tactcaacca agtcattctg 10080
agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc ttgcccggcg tcaacacggg ataataccgc 10140
gccacatagc agaactttta aagtgtcat cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact 10200
ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa cccactctgt cacccaactg 10260
atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa 10320
tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg gaaatgttga atactcatac tcttcctttt 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 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
 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>

<221> CDS

<222> (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 48
 Met Cys Pro Gln Lys Leu Thr Ile Ser Trp Phe Ala Ile Val Leu Leu
 1 5 10 15
 gtg agc ccc ctg atg gcc atg tgg gag ctg gag aag gac gtg tac gtg 96
 Val Ser Pro Leu Met Ala Met Trp Glu Leu Glu Lys Asp Val Tyr Val
 20 25 30
 gtg gag gtg gac tgg acc ccc gac gcc ccc ggc gag acc gtg aac ctg 144
 Val Glu Val Asp Trp Thr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Thr Val Asn Leu
 35 40 45
 act tgc gac acc ccc gag gag gac gac atc acc tgg acc agc gac cag 192
 Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Asp Ile Thr Trp Thr Ser Asp Gln
 50 55 60

aga Arg 65	cac His	ggc Gly	gtc Val	atc Ile	ggc Gly 70	agc Ser	ggc Gly	aag Lys	acc Thr	ctg Leu 75	acc Thr	atc Ile	acc Thr	gtg Val	aag Lys 80	240
gag Glu	ttc Phe	ctg Leu	gac Asp	gcc Ala 85	gga Gly	cag Gln	tac Tyr	acc Thr	tgt Cys 90	cac His	aag Lys	ggc Gly	ggc Gly	gag Glu 95	acc Thr	288
ctg Leu	agc Ser	cac His	agc Ser 100	cac His	ctg Leu	ttg Leu	ctg Leu	cac His 105	aag Lys	aag Lys	gag Glu	aac Asn	ggc Gly 110	atc Ile	tgg Trp	336
agc Ser	acc Thr	gag Glu 115	atc Ile	ctg Leu	aag Lys	aac Asn	ttc Phe 120	aag Lys	aac Asn	aag Lys	acc Thr	ttc Phe 125	ctg Leu	aag Lys	tgc Cys	384
gag Glu	gcc Ala 130	ccc Pro	aac Asn	tac Tyr	agc Ser	ggc Gly 135	aga Arg	ttc Phe	acc Thr	tgt Cys	agc Ser 140	tgg Trp	ctg Leu	gtg Val	cag Gln	432
aga Arg 145	aac Asn	atg Met	gac Asp	ctg Leu	aag Lys 150	ttc Phe	aac Asn	atc Ile	aag Lys	agc Ser 155	agc Ser	agc Ser	agc Ser	agc Ser	ccc Pro 160	480
gac Asp	agc Ser	aga Arg	gcc Ala	gtg Val 165	aca Thr	tgc Cys	ggc Gly	atg Met	gcc Ala 170	agc Ser	ctg Leu	agc Ser	gcc Ala	gag Glu 175	aag Lys	528
gtg Val	acc Thr	ctg Leu	gac Asp 180	cag Gln	aga Arg	gac Asp	tac Tyr	gag Glu 185	aag Lys	tac Tyr	agc Ser	gtg Val	agc Ser 190	tgc Cys	cag Gln	576
gag Glu	gac Asp	gtg Val 195	acc Thr	tgt Cys	ccc Pro	acc Thr	gcc Ala 200	gag Glu	gag Glu	acc Thr	ctg Leu	ccc Pro 205	atc Ile	gag Glu	ctt Leu	624
gcc Ala 210	ctg Leu	gaa Glu	gcc Ala	aga Arg	cag Gln	cag Gln 215	aac Asn	aag Lys	tac Tyr	gag Glu	aac Asn 220	tac Tyr	agc Ser	acc Thr	agc Ser	672
ttc Phe 225	ttc Phe	atc Ile	aga Arg	gac Asp	atc Ile 230	atc Ile	aag Lys	ccc Pro	gac Asp	ccc Pro 235	ccc Pro	aag Lys	aac Asn	ctc Leu	cag Gln 240	720
atg Met	aag Lys	ccc Pro	ctg Leu	aag Lys 245	aac Asn	agc Ser	cag Gln	gtg Val	gag Glu 250	gtg Val	tcc Ser	tgg Trp	gag Glu	tac Tyr 255	ccc Pro	768
gac Asp	agc Ser	tgg Trp	agc Ser 260	acc Thr	ccc Pro	cac His	agc Ser	tac Tyr 265	ttc Phe	agc Ser	ctg Leu	aag Lys	ttc Phe 270	ttc Phe	gtg Val	816
aga Arg	atc Ile	cag Gln 275	aga Arg	aag Lys	aag Lys	gag Glu	aag Lys 280	atg Met	aag Lys	gag Glu	acc Thr	gag Glu 285	gag Glu	ggc Gly	tgc Cys	864
aac Asn 290	cag Gln	aag Lys	ggc Gly	gct Ala	ttc Phe	ctg Leu 295	gtg Val	gag Glu	aaa Lys	acc Thr	agc Ser 300	acc Thr	gag Glu	gtg Val	cag Gln	912
tgc Cys 305	aag Lys	ggc Gly	ggc Gly	aac Asn	gtg Val 310	tgt Cys	gtg Val	cag Gln	gcc Ala	cag Gln 315	gac Asp	aga Arg	tac Tyr	tac Tyr	aac Asn 320	960
agc Ser	agc Ser	tgc Cys	tcc Ser	aag Lys 325	tgg Trp	gcc Ala	tgc Cys	gtg Val	ccc Pro 330	tgc Cys	cgc Arg	gtg Val	aga Arg	agc Ser 335	tga	1008

<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 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 Lys Gly Gly Asn Val Cys Val Gln Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Asn
 305 310 315 320
 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 48
 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 96
 Asn His Leu Ser Leu Ala Arg Val Ile Pro Val Ser Gly Pro Ala Arg
 20 25 30
 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					160					
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	ggc	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 48
 Met Arg Ser Ser Pro Gly Asn Met Glu Arg Ile Val Ile Cys Leu Met
 1 5 10 15

gtg atc ttc ctg ggc acc ctg gtg cat aag agc agc agc cag ggc cag 96
 Val Ile Phe Leu Gly Thr Leu Val His Lys Ser Ser Ser Gln Gly Gln
 20 25 30

gac aga cac atg atc cgc atg aga cag ctg atc gac atc gtg gac cag 144
 Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp Gln
 35 40 45

ctg aag aac tac gtg aac gac ctg gtg ccc gag ttc ctg ccc gcc ccc 192
 Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala Pro
 50 55 60

gag gac gtg gag acc aac tgc gag tgg agc gcc ttc agc tgc ttc cag 240
 Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys Phe Gln
 65 70 75 80

aag gcc cag ctg aag tcc gcc aac acc ggc aac aac gag aga atc atc 288
 Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile Ile
 85 90 95

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		
					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		
					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 ctg aac agc cac ttc ctg acc gag gcc ggt atc cac 96
 Leu Cys Leu 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 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

48

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	96
gta gaa ttg gat tgg tat ccg gat gcc cct gga gaa atg gtg gtc ctc Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu	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	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	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	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	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	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	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	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	528
gca gag aga gtc aga ggg gac aac aag gag tat gag tac tca gtg gag Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu	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	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	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	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	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	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	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 cgg 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 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 gcg cgc agc ctc ctc ctt gtg gct acc ctg gtc ctc ctg 48
Met Gly Pro Ala Arg Ser Leu Leu Leu Val Ala Thr Leu Val Leu Leu
1 5 10

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 ctg 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 65 70 75 80			240
aca gtg gag gcc tgt 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 85 90 95			288
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 100 105 110			336
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 115 120 125			384
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 130 135 140			432
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 145 150 155 160			480
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 165 170 175			528
gtg cca caa aaa tcc tcc ctt gaa gaa ccg gat ttt tat aaa act aaa Val Pro Gln Lys Ser Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys 180 185 190			576
atc aag ctc tgc ata ctt ctt cat gct ttc aga att cgg gca gtg act Ile Lys Leu Cys Ile Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr 195 200 205			624
att gat aga gtg atg agc tat ctg aat gct tcc taa Ile Asp Arg Val Met Ser Tyr Leu Asn Ala Ser 210 215			660

<210> 24
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 24

Met Gly Pro Ala Arg Ser Leu Leu Leu Val Ala Thr Leu Val Leu Leu
1 5 10 15

Asp His Leu Ser Leu Ala Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro
20 25 30

Gly Met Phe Pro Cys Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val
35 40 45

Ser Asn Met Leu Gln Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys
50 55 60

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

aggtcanagg tca	13
<210> 27	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Drosophila melanogaster	
<400> 27	
gggttgaatg aattt	15
<210> 28	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic homing endonuclease (HE) enzyme (I-SceI)	
<400> 28	
taggataac agggtaat	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 ggggtggagt	60
ttgtgacgtg gcgcggggcg tgggaacggg gcgggtgacg tagtagtgtg gcggaagtgt	120
gatgttgcaa gtgtggcgga acacatgtaa gcgacggatg tggcaaaagt gacgtttttg	180
gtgtgcgccg gtgtacacag gaagtgacaa ttttcgcgcg gttttaggcg gatgtttag	240
taaatttggg cgtaaccgag taagatttgg ccattttcgc gggaaaactg aataagagga	300
agtgaatct gaataatttt gtgttactca tagcgcgtaa tttttgtcta gggagatccg	360
gtaccggcgc gcgcgccgtt tggccgcctc gagtctagag atccggtgag tattaggcgc	420
gcaccagggtg ccgcaataaa atatctttat tttcattaca tctgtgtgtt ggttttttgt	480
gtgaatcgat agtactaaca tacgctctcc atcaaaacaa aacgaaacaa aacaaactag	540
caaaataggc tgtccccagt gcaagtgcag gtgccagaac atttctctat cgataatgca	600
ggtcggagta ctgtcctccg agcggagtag tgtcctccga gcggagtact gtcctccgag	660
cggagtactg tcctccgagc ggagtactgt cctccgagcg gagtactgtc ctccgagcgg	720
agactcttcg aaggaagagg ggcggggctg atcgaccccg cccctcttcc ttcgaaggaa	780
gaggggaggc gtcgaagacc tagaggggtat ataatgggtg ccttagctgg tgtgtgagct	840
catcttcctg tagatcacgc gtgccaccat gggtcaccag cagttgggtc tctcttgggt	900
ttccctgggt tttctggcat ctccccctcg ggccatatgg gaactgaaga aagatgttta	960
tgtcgtagaa ttggattggg atccggatgc ccctggagaa atgggtgggtc tcacctgtga	1020
caccctgaa gaagatggta tcacctggac cttggaccag agcagtgagg tcttaggctc	1080

tggtcaaaacc	ctgaccatcc	aagtcaaaga	gtttggagat	gctggccagt	acacctgtca	1140
caaaggaggc	gaggttctaa	gccattcgct	cctgctgctt	cacaaaaagg	aagatggaat	1200
ttggtccact	gatattttta	aggaccagaa	agaacccaaa	aataagacct	ttctaagatg	1260
cgaggccaag	aattattctg	gacgtttcac	ctgctggtgg	ctgacgacaa	tcagtactga	1320
tttgacattc	agtgtcaaaa	gcagcagagg	ctcttctgac	cccccaagggg	tgacgtgcgg	1380
agctgtctaca	ctctctgcag	agagagtcag	aggggacaa	aaggagtatg	agtactcagt	1440
ggagtgccag	gaggacagtg	cctgcccagc	tgctgaggag	agtctgcca	ttgaggatcat	1500
ggtggatgcc	gttcacaagc	tcaagtatga	aaactacacc	agcagcttct	tcatacaggga	1560
catcatcaaa	cctgaccac	ccaagaactt	gcagctgaag	ccattaaaga	attctcggca	1620
ggtggaggtc	agctgggagt	accctgacac	ctggagtact	ccacattcct	acttctccct	1680
gacattctgc	gttcagggtcc	agggcaagag	caagagagaa	aagaaagata	gagtcttcac	1740
ggacaagacc	tcagccacgg	tcattctgccg	caaaaatgcc	agcattagcg	tgcgggccca	1800
ggaccgctac	tatagctcat	cttgagcga	atgggcatct	gtgccctgca	gttaggttgg	1860
gcgagctcga	attcattgat	cccccggtct	gcaggaattc	gatatacagc	tcgggatccg	1920
aattccgccc	cccccccccc	cccccccta	acgttactgg	ccgaagccgc	ttggaataag	1980
gccggtgtgc	gtttgtctat	atgttatttt	ccaccatatt	gccgtctttt	ggcaatgtga	2040
gggcccggaa	acctggccct	gtcttcttga	cgagcattcc	taggggtctt	ttccctctcg	2100
ccaaaggaat	gcaagggtctg	ttgaatgtcg	tgaaggaagc	agttcctctg	gaagcttctt	2160
gaagacaaac	aacgtctgta	gcgacccttt	gcaggcagcg	gaacccccca	cctggcgaca	2220
ggtgcctctg	cggccaaaag	ccacgtgtat	aagatacacc	tgcaaaggcg	gcacaacccc	2280
agtgccacgt	tgtgagttgg	atagttgtgg	aaagagtcaa	atggctctcc	tcaagcgtat	2340
tcaacaaggg	gctgaaggat	gcccagaagg	tacccattg	tatgggatct	gatctggggc	2400
ctcggtgcac	atgctttaca	tgtgtttagt	cgagggttaa	aaaacgtcta	ggccccccga	2460
accacgggga	cgtgggtttt	ctttgaaaaa	cacgatgata	atatggccac	aaccatgggt	2520
ccagcgcgca	gcctcctcct	tgtggctacc	ctggctctcc	tgaccacct	cagtttgccc	2580
agaaacctcc	ccgtggccac	tccagaccca	ggaatgttcc	catgccttca	ccactcccaa	2640
aacctgctga	gggccgtcag	caacatgctc	cagaaggcca	gacaaactct	agaattttac	2700
ccttgcaactt	ctgaagagat	tgatcatgaa	gatatacaca	aagataaaa	cagcacagtg	2760
gaggcctggt	taccattgga	attaaccaag	aatgagagtt	gcctaaattc	cagagagacc	2820
tctttcataa	ctaattgggag	ttgcctggcc	tccagaaaga	cctcttttat	gatggccctg	2880
tgcttagta	gtatttatga	agacttgaag	atgtaccagg	tgagattcaa	gaccatgaat	2940
gcaaagcttc	tgatggatcc	taagaggcag	atctttctag	atcaaaacat	gctggcagtt	3000
attgatgagc	tgatgcaggc	cctgaatttc	aacagtgaga	ctgtgccaca	aaaatcctcc	3060
cttgaagaac	cggattttta	taaaactaaa	atcaagctct	gcatacttct	tcatagctttc	3120

agaattcggg	cagtgactat	tgatagagt	atgagctatc	tgaatgcttc	ctaacgtacg	3180
tcgacatcga	gaacttgttt	attgcagctt	ataatggtta	caaataaagc	aatagcatca	3240
caaatttcac	aaataaagca	tttttttcac	tgcattctag	ttgtggtttg	tccaaactca	3300
tcaatgtatc	ttatcatgtc	tgggcgcgcc	ggcctccgcg	ccggggtttg	gcgcctcccc	3360
cgggcgcccc	cctcctcacg	gcgagcgctg	ccacgtcaga	cgaaggcgcg	agcgagcgctc	3420
ctgatccttc	cgcccggacg	ctcaggacag	cggcccgcgtg	ctcataagac	tcggccttag	3480
aaccccagta	tcagcagaag	gacatttttag	gacgggactt	gggtgactct	agggcactgg	3540
ttttctttcc	agagagcgga	acaggcgagg	aaaagtagtc	ccttctcggc	gattctgcgg	3600
agggatctcc	gtggggcggt	gaacgccgat	gattatataa	ggacgcgccg	ggtgtggcac	3660
agctagtctc	gtcgcagccg	ggatttggtt	cgcggttctt	gtttgtggat	cgctgtgatc	3720
gtcacttggt	gagtagcggt	ctgctgggct	gggtacgtgc	gctcgggggt	ggcgagtgtg	3780
ttttgtgaag	ttttttaggc	accttttgaa	atgtaatcat	ttgggtcaat	atgtaatttt	3840
cagtgttaga	ctagtaaatt	gtccgcataa	ttctggccgt	ttttggcttt	tttgttagac	3900
gagctagcgc	cgccaccatg	ggccctaaaa	agaagcgtaa	agtcgcccc	ccgaccgatg	3960
tcagcctggg	ggacgagctc	cacttagacg	gcgaggacgt	ggcgatggcg	catgccgacg	4020
cgctagacga	tttcgatctg	gacatgttgg	gggacgggga	ttccccgggt	ccgggattta	4080
ccccccacga	ctccgcccc	tacggcgctc	tggatatggc	cgacttcgag	tttgagcaga	4140
tgtttaccga	tgcccttgga	attgacgagt	acggtgggga	attcgagatg	cctgtggaca	4200
ggatcctgga	ggcagagctt	gctgtggaac	agaagagtga	ccagggcggt	gagggtcctg	4260
ggggaaccgg	gggtagcggc	agcagcccaa	atgaccctgt	gactaacatc	tgctcaggcag	4320
ctgacaaaca	gctattcacg	cttgttgagt	gggcgaagag	gatcccacac	ttttcctcct	4380
tgctctgga	tgatcaggct	atattgctgc	gggcaggctg	gaatgaactc	ctcattgcct	4440
ccttttcaca	ccgatccatt	gatgttcgag	atggcatcct	ccttgccaca	ggtcttcacg	4500
tgaccgcaa	ctcagcccat	tcagcaggag	taggagccat	ctttgatcgg	gtgctgacag	4560
agctagtgtc	caaatgcgt	gacatgagga	tggacaagac	agagcttggc	tgcttgaggg	4620
caatcattct	gtttaatcca	gaggtgaggg	gtttgaaatc	cgccaggaa	gttgaacttc	4680
tacgtgaaaa	agtatatgcc	gctttggaag	aatatactag	aacaacacat	cccgatgaac	4740
caggaagatt	tgcaaaactt	ttgcttcgtc	tgcttctttt	acgttccata	ggccttaagt	4800
gtttggagca	tttgtttttc	tttcgcctta	ttggagatgt	tccaattgat	acgttcctga	4860
tggagatgct	tgaatcacct	tctgattcat	aatctagcct	agccccctc	tccctcccc	4920
ccccctaacg	ttactggccg	aagccgcttg	gaataaggcc	ggtgtgcggt	tgtctatatg	4980
ttattttcca	ccatattgcc	gtcttttggc	aatgtgaggg	cccggaaacc	tggccctgtc	5040
ttcttgacga	gcattcctag	gggtctttcc	cctctcgcca	aaggaatgca	aggtctgttg	5100
aatgtcgtga	aggaagcagt	tcctctggaa	gcttcttgaa	gacaaacaac	gtctgtagcg	5160

accctttgca	ggcagcggaa	ccccccacct	ggcgacaggt	gcctctgcgg	ccaaaagcca	5220
cgtgtataag	atacacctgc	aaaggcggca	caaccccagt	gccacgttgt	gagttggata	5280
gttgtgaaa	gagtcaaag	gctctcctca	agcgtattca	acaaggggct	gaaggatgcc	5340
cagaaggtac	cccattgtat	gggatctgat	ctggggcctc	ggtgcacatg	ctttacatgt	5400
gtttagtcga	ggttaaaaaa	cgtctaggcc	ccccgaacca	cggggacgtg	gttttccttt	5460
gaaaaacacg	atctctaggc	gccaccatga	agctactgtc	ttctatcgaa	caagcatgcg	5520
atatttgccg	acttaaaaag	ctcaagtgtc	ccaaagaaaa	accgaagtgc	gccaaagtgc	5580
tgaagaacaa	ctgggagtgt	cgctactctc	ccaaaaccaa	aagggtctccg	ctgactaggg	5640
cacatctgac	agaagtggaa	tcaaggctag	aaagactgga	acagctattt	ctactgattt	5700
ttcctcgaga	agaccttgac	atgattttga	aaatggattc	tttacaggat	ataaaagcat	5760
tgtaaacagg	attattttga	caagataatg	tgaataaaga	tgccgtcaca	gatagattgg	5820
cttcagtgga	gactgatatg	cctctaacat	tgagacagca	tagaataagt	gcgacatcat	5880
catcggaaga	gagtagtaac	aaagggtcaa	gacagttgac	tgtatcgccg	gaattccccg	5940
ggatccggcc	tgagtgcgta	gtacccgaga	ctcagtgcgc	catgaagcgg	aaagagaaga	6000
aagcacagaa	ggagaaggac	aaactgcctg	tcagcacgac	gacggtggac	gaccacatgc	6060
cgcccattat	gcagtgtgaa	cctccacctc	ctgaagcagc	aaggattcac	gaagtggccc	6120
caagggtttct	ctccgacaag	ctggtgggtga	caaaccggca	gaaaaacatc	ccccagttga	6180
cagccaacca	gcagttcctt	atcgccaggc	tcattctggta	ccaggacggg	tacgagcagc	6240
cttctgatga	agattttgaag	aggattacgc	agacgtggca	gcaagcggac	gatgaaaacg	6300
aagagtcgga	cactcccttc	cgccagatca	cagagatgac	tatcctcacg	gtccaactta	6360
tcgtggagtt	cgcaaggga	ttgccagggt	tcgccaagat	ctcgcacct	gatcaaatta	6420
cgctgcttaa	ggcttgctca	agtgaggtaa	tgatgctccg	agtcgcgcga	cgatacgatg	6480
cggcctcaga	cagtattctg	ttcggaaca	accaagcgta	cactcgcgac	aactaccgca	6540
aggctggcat	ggccgaggtc	atcgaggatc	tactgcactt	ctgccgggtg	atgtactcta	6600
tggcggttga	caacatccat	tacgcgctgc	tcacggctgt	cgcatctttt	tctgaccggc	6660
cagggttga	gcagccgcaa	ctggtggaag	agatccagcg	gtactacctg	aatacgctcc	6720
gcatctatat	cctgaaccag	ctgagcgggt	cggcgcggtc	gtccgtcata	tacggcaaga	6780
tcctctcaat	cctctctgag	ctacgcacgc	tcggcatgca	aaactccaac	atgtgcatct	6840
ccctcaagct	caagaacaga	aagctgccgc	ctttcctcga	ggagatctgg	gatgtggcgg	6900
acatgtcgca	cacccaaccg	ccgcctatcc	tcgagtcccc	cacgaatctc	taggcggcct	6960
ctagagcggc	cgccaccgcg	gggagatcca	gacatgataa	gatacattga	tgagtttggga	7020
caaaccacaa	ctagaatgca	gtgaaaaaaa	tgctttattt	gtgaaatttg	tgatgctatt	7080
gctttatttg	taaccattat	aagctgcaat	aaacaagtta	acaacaacaa	ttgcattcat	7140
tttatgtttc	aggttcaggg	ggaggtgtgg	gaggtttttt	aaagcaagta	aaacctctac	7200

aaatgtggta	tggtctgatta	tgatccggct	gcctcgcgcg	tttcggtgat	gacggtgaaa	7260
acctctgaca	catgcagctc	ccggagacgg	tcacagcttg	tctgtaagcg	gatgccggga	7320
gcagacaagc	ccgtcagggc	gcgtcagcgg	gtgttgggcg	gtgtcggggc	gcagccatga	7380
ggtcgactct	agtccccgcg	gtggcagatc	tggaagggtgc	tgagggtacga	tgagacccgc	7440
accagggtgca	gaccctgcga	gtgtggcggt	aaacatatta	ggaaccagcc	tgtgatgctg	7500
gatgtgaccg	aggagctgag	gcccgatcac	ttggtgctgg	cctgcacccg	cgctgagttt	7560
ggctctagcg	atgaagatac	agattgaggt	actgaaatgt	gtgggcgtgg	cttaaggggtg	7620
ggaaagaata	tataagggtgg	gggtcttatg	tagtttttga	tctgttttgc	agcagccgcc	7680
gccgccatga	gcaccaactc	gtttgatgga	agcattgtga	gctcatattt	gacaacgcgc	7740
atgcccccat	gggccggggg	gcgtcagaat	gtgatgggct	ccagcattga	tggtcgcccc	7800
gtcctgcccc	caaactctac	taccttgacc	tacgagaccg	tgtctggaac	gccgttgga	7860
actgcagcct	ccgccgccgc	ttcagccgct	gcagccaccg	cccgcgggat	tgtgactgac	7920
tttgctttcc	tgagcccgtc	tgcaagcagt	gcagcttccc	gttcatccgc	ccgcgatgac	7980
aagttgacgg	ctcttttggc	acaattggat	tctttgaccc	gggaacttaa	tgctgtttct	8040
cagcagctgt	tggtatctgc	ccagcaggtt	tctgccctga	aggcttcctc	ccctcccaat	8100
gcggtttaaa	acataaataa	aaaaccagac	tctgttttga	tttgatcaa	gcaagtgtct	8160
tgctgtcttt	atthaggggt	tttgcgcgcg	cggtaggccc	gggaccagcg	gtctcggtcg	8220
ttgaggggtcc	tgtgtatttt	ttccaggacg	tggtaaagggt	gactctggat	gttcagatac	8280
atgggcataa	gcccgtctct	gggggtggagg	tagcaccact	gcagagcttc	atgctgcggg	8340
gtggtgttgt	agatgatcca	gtcgtagcag	gagcgctggg	cgtggtgcct	aaaaatgtct	8400
ttcagtagca	agctgattgc	caggggcagg	cccttggtgt	aagtgtttac	aaagcggtta	8460
agctgggatg	ggtgcatacg	tggggatatg	agatgcatct	tggactgtat	ttttagggtg	8520
gctatgttcc	cagccatata	cctccgggga	ttcatgttgt	gcagaaccac	cagcacagtg	8580
tatccgggtgc	acttgggaaa	tttgtcatgt	agcttagaag	gaaatgcgtg	gaagaacttg	8640
gagacgccct	tgtgacctcc	aagattttcc	atgcattcgt	ccataatgat	ggcaatgggc	8700
ccacggggcg	cggcctgggc	gaagatattt	ctgggatcac	taacgtcata	gttgtgttcc	8760
aggatgagat	cgatcatagg	cattttttaca	aagcgcgggc	ggaggggtgcc	agactgcgggt	8820
ataatgggtc	catccggccc	aggggcgtag	ttaccctcac	agatttgcat	ttcccacgct	8880
ttgagttcag	atggggggat	catgtctacc	tgcggggcga	tgaagaaaac	ggtttccggg	8940
gtaggggaga	tcagctggga	agaaagcagg	ttcctgagca	gctgcgactt	accgcagccg	9000
gtgggcccgt	aaatcacacc	tattaccggc	tgcaactgggt	agttaagaga	gctgcagctg	9060
ccgtcatccc	tgagcagggg	ggccacttcg	ttaagcatgt	ccctgactcg	catgttttcc	9120
ctgaccaa	ccgccagaag	gcgtcgcgg	cccagcgata	gcagttcttg	caaggaagca	9180
aagtttttca	acggtttgag	accgtccgcc	gtaggcatgc	ttttgagcgt	ttgaccaagc	9240

agttccaggc ggtcccacag ctcggtcacc tgctctacgg catctcgatc cagcatatct	9300
cctcgttttcg cgggttgggg cggcttttcgc tgtacggcag tagtcggtgc tcgtccagac	9360
gggccagggt catgtctttc cacgggcgca gggtcctcgt cagcgtagtc tgggtcacgg	9420
tgaaggggtg cgctccgggc tgcgcgctgg ccagggtgcg cttgaggctg gtcctgctgg	9480
tgctgaagcg ctgccggtct tcgccctgcg cgtcggccag gtagcatttg accatggtgt	9540
catagtccag cccctccgcg gcgtggccct tggcgcgcag cttgcccttg gaggaggcgc	9600
cgcacgaggg gcagtgcaga cttttgaggg cgtagagctt gggcgcgaga aataccgatt	9660
ccggggagta ggcattccgcg ccgcaggccc cgcagacggt ctcgcattcc acgagccagg	9720
tgagctctgg ccgttcgggg tcaaaaacca ggtttccccc atgctttttg atgcgtttct	9780
tacctctggt ttccatgagc cgggtgtccac gctcgggtgac gaaaaggctg tccgtgtccc	9840
cgtatacaga cttgagaggc ctgtcctcga gcggtgttcc gcggtcctcc tcgtatagaa	9900
actcggacca ctctgagaca aaggctcgcg tccaggccag cacgaaggag gctaagtggg	9960
aggggtagcg gtcgttgtcc actagggggg ccactcgctc cagggtgtga agacacatgt	10020
cgccctcttc ggcattcaagg aagggtgattg gtttgtagggt gtaggccacg tgaccgggtg	10080
ttcctgaagg ggggctataa aaggggggtg gggcgcgttc gtcctcactc tcttccgcat	10140
cgctgtctgc gagggccagc tgttgggggtg agtactccct ctgaaaagcg ggcattgactt	10200
ctgcgctaag attgtcagtt tccaaaaacg aggaggattt gatattcacc tggcccgcgg	10260
tgatgccttt gagggtggcc gcatccatct ggtcagaaaa gacaatcttt ttgttgtcaa	10320
gcttggtggc aaacgacccg tagagggcgt tggacagcaa cttggcgatg gagcgaggg	10380
tttggttttt gtcgcgatcg gcgcgctcct tggccgcgat gtttagctgc acgtattcgc	10440
gcgcaacgca ccgccattcg ggaaagacgg tggcgcgctc gtcgggcacc aggtgcacgc	10500
gccaaccgcg gttgtgcagg gtgacaagggt caacgctggt ggctacctct ccgcgtaggc	10560
gctcgttggt ccagcagagg cggccgcccct tgcgcgagca gaatggcggt aggggggtcta	10620
gctgcgtctc gtccgggggg tctgcgtcca cggtaaagac cccgggcagc aggcgcgcgt	10680
cgaagtagtc tatcttgcat ccttgcaagt ctagcgcctg ctgccatgcg cgggcggcaa	10740
gcgcgcgctc gtatgggttg agtgggggac cccatggcat ggggtgggtg agcgcggagg	10800
cgtacatgcc gcaaatgtcg taaacgtaga ggggctctct gagtattcca agatatgtag	10860
ggtagcatct tccaccgcgg atgctggcgc gcacgtaatc gtatagtctg tgcgagggag	10920
cgaggaggtc gggaccgagg ttgctacggg cgggctgctc tgctcggaag actatctgcc	10980
tgaagatggc atgtgagttg gatgatattg ttggacgctg gaagacgttg aagctggcgt	11040
ctgtgagacc taccgcgtca cgcacgaagg aggcgtagga gtcgcgcagc ttgttgacca	11100
gctcggcggg gacctgcacg tctagggcgc agtagtcag ggtttccttg atgatgtcat	11160
acttatcctg tccctttttt ttccacagct cgcggttgag gacaaactct tcgcggtctt	11220
tccagtactc ttggatcggg aacccgctcg cctccgaacg gtaagagcct agcatgtaga	11280

actggttgac ggcctggtag ggcgagcatc ctttttctac gggtagcgcg tatgcctgcg 11340
 cggccttccg gagcgaggtg tgggtgagcg caaagggtgtc cctgaccatg actttgaggt 11400
 actggtatth gaagtcagtg tcgtcgcatc cgccctgctc ccagagcaaa aagtccgtgc 11460
 gctttttgga acgcggatth ggcagggcgga aggtgacatc gttgaagagt atctttcccg 11520
 cgcgaggcat aaagttgcgt gtgatgcgga aggggtcccg cacctcgga cggttggttaa 11580
 ttacctgggc ggcgagcacg atctcgtaaa agccgttgat gttgtggccc acaatgtaaa 11640
 gttccaagaa ggcggggatg cccttgatgg aaggcaatth ttttaagttcc tcgtaggtga 11700
 gctcttcagg ggagctgagc ccgtgctctg aaagggtcca gtctgcaaga tgagggttgg 11760
 aagcgacgaa tgagctccac aggtcacggg ccattagcat ttgcaggtgg tcgcgaaagg 11820
 tcctaaactg gcgacctatg gccatthttt ctggggtgat gcagtagaag gtaagcgggt 11880
 cttgttccca gcggtcccat ccaagggttcg cggctaggtc tcgcgcggca gtcactagag 11940
 gctcatctcc gccgaacttc atgaccagca tgaagggtcac gagctgcttc ccaaaggccc 12000
 ccatccaagt ataggtctct acatcgtagg tgacaaagag acgctcggtg cgaggatgcg 12060
 agccgatcgg gaagaactgg atctcccgcc accaattgga ggagtggcta ttgatgtggt 12120
 gaaagtagaa gtccctgcga cgggccgaac actcggtgctg gcttttgtaa aaacgtgcgc 12180
 agtactggca gcggtgcacg ggctgtacat cctgcacgag gttgacctga cgaccgcgca 12240
 caaggaagca gagtggaat ttgagcccct cgcctggcgg gtttggtggtg tggctttcta 12300
 cttcggtgc ttgtccttga ccgtctggct gctcgagggg agttacggtg gatcggaaca 12360
 ccacgccgcg cgagcccaaa gtccagatgt ccgcgcgcgg cggtcggagc ttgatgacaa 12420
 catcgcgag atgggagctg tccatggtct ggagctcccg cggcgtcagg tcaggcggga 12480
 gtcctgcag gtttacctcg catagacggg tcagggcgcg ggctagatcc aggtgatacc 12540
 taatttccag gggctggtt gtggcggtgt cgatggcttg caagaggccg catccccgcg 12600
 gcgcgactac ggtaccgcgc ggcgggcggg gggccgcggg ggtgtccttg gatgatgcat 12660
 ctaaaagcgg tgacgcgggc gagcccccg aggtaggggg ggctccggac ccgcccggag 12720
 agggggcagg ggcacgtcgg cgccgcgcgc gggcaggagc tgggtgctgc cgcgtaggtt 12780
 gctggcgaac gcgacgacgc ggcggttgat ctctgaatc tggcgctct gcgtgaagac 12840
 gacgggccc gtgagcttga acctgaaaga gagttcgaca gaatcaatth cggtgtcggt 12900
 gacggcgccc tggcgcaaaa tctcctgcac gtctcctgag ttgtcttgat aggcgatctc 12960
 ggccatgaac tgctcgatct cttcctcctg gagatctccg cgtccggctc gctccacggt 13020
 ggcggcgagg tcgttggaat tgcgggccat gagctgcgag aaggcggtga ggcctccctc 13080
 gttccagac cggtgtaga ccacgcccc ttcggcatcg cgggcgcgca tgaccacctg 13140
 cgcgagattg agtccacgt gccgggcgaa gacggcgtag tttcgaggc gctgaaagag 13200
 gtagttgagg gtggtggcgg tgtgttctgc cacgaagaag tacataacct agcgtcgcaa 13260
 cgtggattcg ttgatatccc ccaaggcctc aaggcgctcc atggcctcgt agaagtccac 13320

ggcgaagttg aaaaactggg agttgcgcgc cgacacgggt aactcctcct ccagaagacg 13380
 gatgagctcg gcgacagtgt cgcgcacctc gcgctcaaag gctacagggg cctcttcttc 13440
 ttcttcaatc tcctcttcca taagggcctc cccttcttct tcttctggcg gcggtggggg 13500
 aggggggaca cggcggcgac gacggcgcac cgggaggcgg tcgacaaagc gctcgatcat 13560
 ctccccgcgg cgacggcgca tggctctcggg gacggcgcgg ccgttctcgc gggggcgag 13620
 ttggaagacg ccgcccgtca tgtcccgggt atgggttggc ggggggctgc catgcggcag 13680
 ggatacggcg ctaacgatgc atctcaacaa ttgttggtga ggtactccgc cgccgaggga 13740
 cctgagcgag tccgcatcga ccggatcgga aaacctctcg agaaaggcgt ctaaccagtc 13800
 acagtcgcaa ggtaggctga gcaccgtggc gggcggcagc gggcggcggg cgggggtgtt 13860
 tctggcggag gtgctgctga tgatgtaatt aaagtaggcg gtcttgagac ggcggatggt 13920
 cgacagaagc accatgtcct tgggtccggc ctgctgaatg cgcaggcggg cggccatgcc 13980
 ccaggcttcg ttttgacatc ggcgcaggtc tttgtagtag tcttgcatga gcctttctac 14040
 cggcacttct tcttctcctt cctcttgtcc tgcattctct gcattctatc ctgcggcggc 14100
 ggcggagttt ggccgtaggt ggcgccctct tcctcccatg cgtgtgacct cgaagccctt 14160
 catcggctga agcagggcta ggtcggcgac aacgcgctcg gctaatatgg cctgctgcac 14220
 ctgcgtgagg gtagactgga agtcattcat gtccacaaag cgggtggtatg cgcccgtgtt 14280
 gatggtgtaa gtgcagttgg ccataacgga ccagttaacg gtctggtgac ccggctgcga 14340
 gagctcggtg tacctgagac gcgagtaagc cctcgagtca aatacgtagt cgttgcaagt 14400
 ccgcaccagg tactgggtatc ccacaaaaaa gtgcggcggc ggctggcggg agagggggcca 14460
 gcgtaggggtg gccggggctc cgggggagag atcttccaac ataaggcgat gatatccgta 14520
 gatgtacctg gacatccagg tgatgccggc ggcgggtggt gaggcgcgcg gaaagtcgcg 14580
 gacgcgggtc cagatgttgc gcagcggcaa aaagtgtctc atggtcggga cgctctggcc 14640
 ggtcaggcgc gcgcaatcgt tgacgtctta gcgtgcaaaa ggagagcctg taagcgggca 14700
 ctcttccgtg gtctggtgga taaattcgca agggatcat ggaggacgac cgggggttcga 14760
 gccccgtatc cggccgtccg ccgtgatcca tgcggttacc gcccgcgtgt cgaaccagg 14820
 tgtgcgacgt cagacaacgg gggagtgtc cttttggctt ccttccaggc gcggcggctg 14880
 ctgcgctagc ttttttggcc actggccgcg cgagcgtaa gcggttaggc tggaaagcga 14940
 aagcattaag tggctcgctc cctgtagccg gaggggtatt ttccaagggt tgagtcgcgg 15000
 gacccccggt tcgagtctcg gaccggcccg actgcggcga acgggggttt gcctccccgt 15060
 catgcaagac cccgcttgca aattcctccg gaaacaggga cgagccccct ttttgctttt 15120
 cccagatgca tccggtgctg cggcagatgc gccccctcc tcagcagcgg caagagcaag 15180
 agcagcggca gacatgcagg gcaccctccc ctctcctac cgcgtcagga ggggcgacat 15240
 ccgcggttga cgcggcagca gatggtgatt acgaaccccc gcggcgccgg gcccggcact 15300
 acctggactt ggaggagggc gagggcctgg cgcggctagg agcgccctct cctgagcggc 15360

acccaaggggt gcagctgaag cgtgatacgc gtgaggcgta cgtgccgcgg cagaacctgt 15420
 ttcgcgaccg cgagggagag gagcccgagg agatgcggga tcgaaagttc cacgcagggc 15480
 gcgagctgcg gcatggcctg aatcgcgagc gggtgctgcg cgaggaggac tttgagcccg 15540
 acgcgcgaac cgggattagt cccgcgcgcg cacacgtggc ggccgccgac ctggtaaccg 15600
 catacgagca gacggtgaac caggagatta actttcaaaa aagctttaac 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 tgcagagcat agtggtgcag gagcgcagct 15900
 tgagcctggc tgacaagggt gccgccatca actattccat gcttagcctg ggcaagtttt 15960
 acgcccgcaa gatataccat accccttacg ttcccataga caaggaggta aagatcgagg 16020
 ggttctacat gcgcatggcg ctgaagggtgc ttaccttgag cgacgacctg ggcgtttatc 16080
 gcaacgagcg catccacaag gccgtgagcg tgagccggcg gcgcgagctc agcgaccgcg 16140
 agctgatgca cagcctgcaa agggccctgg ctggcacggg cagcgggcgat agagaggccg 16200
 agtcctactt tgacgcgggc gctgacctgc gctgggcccc aagccgacgc gccctggagg 16260
 cagctggggc cggacctggg ctggcggtgg caccgcgcg cgctggcaac gtcggcgggc 16320
 tggaggaata tgacgaggac gatgagtacg agccagagga cggcgagtac taagcggtga 16380
 tgtttctgat cagatgatgc aagacgcaac ggaccggcg gtgcggggcg cgctgcagag 16440
 ccagccgtcc ggccttaact ccacggacga ctggcgccag gtcattggacc gcatcatgtc 16500
 gctgactgcg cgcaatcctg acgcgttccg gcagcagccg caggccaacc ggctctccgc 16560
 aattctggaa gcggtggtcc cggcgcgcg aaacccacg cacgagaagg tgctggcgat 16620
 cgtaaacgcg ctggccgaaa acagggccat ccggcccgcg gagggccggc tgggtctacga 16680
 cgcgctgctt cagcgcggtg ctcgttataa cagcggaac gtgcagacca acctggaccg 16740
 gctggtgggg gatgtgcgcg aggccgtggc gcagcgtgag cgcgcgagc agcagggcaa 16800
 cctgggctcc atggttgac taaacgcctt cctgagtaca cagcccgcga acgtgccgcg 16860
 gggacaggag gactacacca actttgtgag cgcactgcgg ctaatggtga ctgagacacc 16920
 gcaaagtgag gtgtaccagt ctgggccaga ctattttttc cagaccagta gacaaggcct 16980
 gcagaccgta aacctgagcc aggccttcaa aaacttgagc gggctgtggg ggggtgcgggc 17040
 tcccacaggc gaccgcgcga ccgtgtctag cttgctgacg cccaactcgc gcctgttgct 17100
 gctgctaata gcgcccttca cggacagtgg cagcgtgtcc cgggacacat acctaggtca 17160
 cttgctgaca ctgtaccgcg aggccatagg tcaggcgcat gtggacgagc atactttcca 17220
 ggagattaca agtgtcagcc gcgcgctggg gcaggaggac acgggcagcc tggaggcaac 17280
 cctaaactac ctgctgacca accggcggca gaagatcccc tcgttgaca gtttaaacag 17340
 cgaggaggag cgcattttgc gctacgtgca gcagagcgtg agccttaacc tgatgcgcga 17400

cggggtaacg	cccagcgtgg	cgctggacat	gaccgcgcgc	aacatggaac	cgggcatgta	17460
tgcctcaaac	cggccgttta	tcaaccgcct	aatggactac	ttgcatcgcg	cggccgccgt	17520
gaaccccgag	tatttcacca	atgccatctt	gaacccgcac	tggctaccgc	cccctggttt	17580
ctacaccggg	ggattcgagg	tgcccgaggg	taacgatgga	ttcctctggg	acgacataga	17640
cgacagcgtg	ttttccccgc	aaccgcagac	cctgctagag	ttgcaacagc	gcgagcaggc	17700
agaggcgggc	ctgcgaaagg	aaagcttccg	caggccaagc	agcttgtccg	atctaggcgc	17760
tgcgggcccc	cggtcagatg	ctagtagccc	atttccaagc	ttgatagggt	ctcttaccag	17820
cactcgcacc	acccgcccgc	gcctgctggg	cgaggaggag	tacctaaaca	actcgtgct	17880
gcagccgcag	cgcgaaaaaa	acctgcctcc	ggcatttccc	aacaacggga	tagagagcct	17940
agtggacaag	atgagtagat	ggaagacgta	cgcgcaggag	cacagggacg	tgccaggccc	18000
gcgcccgcgc	acccgtcgtc	aaaggcacga	ccgtcagcgg	ggtctggtgt	gggaggacga	18060
tgactcggca	gacgacagca	gcgtcctgga	tttgggaggg	agtggcaacc	cgtttgcgca	18120
ccttcgcccc	aggctgggga	gaatgtttta	aaaaaaaaaa	aagcatgatg	caaaataaaa	18180
aactcaccaa	ggccatggca	ccgagcgttg	gttttcttgt	attcccctta	gtatgcggcg	18240
cgcggcgatg	tatgaggaag	gtcctcctcc	ctcctacgag	agtgtggtga	gcgcggcgcc	18300
agtggcgggc	gcgctggggt	ctcccttcga	tgctcccctg	gacccgccgt	ttgtgcctcc	18360
gcggtacctg	cggcctaccg	gggggagaaa	cagcatccgt	tactctgagt	tggcaccctt	18420
attcgacacc	acccgtgtgt	acctggtgga	caacaagtca	acggatgtgg	catccctgaa	18480
ctaccagaac	gaccacagca	actttctgac	cacggtcatt	caaaacaatg	actacagccc	18540
gggggaggca	agcacacaga	ccatcaatct	tgacgaccgg	tcgcactggg	gcggcgacct	18600
gaaaaccatc	ctgcatacca	acatgccaaa	tgtgaacgag	ttcatgttta	ccaataagtt	18660
taaggcgcg	gtgatggtgt	cgcgcttgcc	tactaaggac	aatcagggtg	agctgaaata	18720
cgagtgggtg	gagttcacgc	tgcccgaggg	caactactcc	gagaccatga	ccatagacct	18780
tatgaacaac	gcgatcgtgg	agcactactt	gaaagtgggc	agacagaacg	gggttctgga	18840
aagcgacatc	ggggtaaagt	ttgacacccg	caacttcaga	ctgggggttg	accccgctac	18900
tggtcttgct	atgcctgggg	tatatacaaa	cgaagccttc	catccagaca	tcattttgct	18960
gccaggatgc	ggggtggact	tcaccacag	ccgcctgagc	aacttggttg	gcatccgcaa	19020
gcggcaaccc	ttccaggagg	gctttaggat	cacctacgat	gatctggagg	gtggtaacat	19080
tcccgcactg	ttggatgtgg	acgcctacca	ggcgagcttg	aaagatgaca	ccgaacaggg	19140
cggggggtgg	gcaggcggca	gcaacagcag	tggcagcggc	gcggaagaga	actccaacgc	19200
ggcagccgcg	gcaatgcagc	cggtggagga	catgaacgat	catgccattc	gcggcgacac	19260
ctttgccaca	cgggctgagg	agaagcgcg	tgaggccgaa	gcagcggccg	aagctgccgc	19320
ccccgctg	caacccgagg	tcgagaagcc	tcagaagaaa	ccggtgatca	aacccctgac	19380
agaggacagc	aagaaacgca	gttacaacct	aataagcaat	gacagcacct	tcaccagta	19440

ccgcagctgg taccttgcac acaactacgg cgaccctcag accggaatcc gctcatggac 19500
 cctgctttgc actcctgacg taacctgagg ctcggagcag gtctactggc cgttgccaga 19560
 catgatgcaa gaccccgatg ccttccgctc cagcgccag atcagcaact ttccgggtgg 19620
 gggcgccgag ctgttgcccg tgcactccaa gagcttctac aacgaccagg ccgtctactc 19680
 ccaactcatc cgccagttta cctctctgac ccacgtgttc aatcgctttc ccgagaacca 19740
 gatcttgagg cgcccggcag ccccccacat caccaccgct agtgaaaacg ttctgtctct 19800
 cacagatcac gggacgctac cgctgagcaa cagcatcgga ggagtcagc gaggaccat 19860
 tactgacgcc agacgcccga cctgccccta cgtttacaag gccctgggca tagtctcgcc 19920
 gcgcgtccta tcgagccgca ctttttgagc aagcatgtcc atccttatat cgcccagcaa 19980
 taacacaggc tggggcctgc gcttcccaag caagatgttt ggcggggcca agaagcgctc 20040
 cgaccaacac ccagtgcgag tgcgagggca ctaccgagc ccctggggcg cgcacaaacg 20100
 cggccgact gggcgacca ccgtcgatga cgccatcgac gcggtgggtg aggaggcgcg 20160
 caactacag cccacggcg caccagtgtc cacagtggac gcggccattc agaccgtgg 20220
 gcgcggagcc cggcgctatg ctaaaatgaa gagacggcg aggcgcgtag cagctcgcca 20280
 ccgcccga cccggcactg ccgcccacg cgcgggcgcg gccctgctta accgagcacg 20340
 tcgaccggc cgacggggcg ccatgaggcg cgctcgaagg ctggccgagc gtattgtcac 20400
 tgtgcccccc aggtccaggc gacgagcgcc cgccgagca gccgaggcca ttagtgctat 20460
 gactcagggt cgcaggggca acgtgtattg ggtgagcgac tcggttagcg gcctgagcgt 20520
 gcccgtagc acccgcccc cgcgcaacta gattgcaaga aaaaactact tagactcgta 20580
 ctgttgatg tatccagcg cgggcgagc caacgaagct atgtccaagc gcaaaatcaa 20640
 agaagagatg ctccaggatc tcgagccgga gatctatggc ccccggaaga aggaagagca 20700
 ggattacaag ccccgaaagc taaagcgggt caaaaagaaa aagaaagatg atgatgatga 20760
 acttgacgac gaggtggaac tgctgacgac taccgagccc aggcgaggg tacagtggaa 20820
 aggtcagcgc gtaaacgctg ttttgagcag cggcaccacc gtagtcttta cgcccgggtga 20880
 gcgtccacc cgcacctaca agcggtgta tgatgagggt tacggcgagc aggacctgct 20940
 tgagcaggcc aacgagcgcc tcggggagtt tgcctacgga aagcggcata aggacatgct 21000
 ggcggtgccc ctggacgagg gcaacccaac acctagccta aagcccgtaa cactgcagca 21060
 ggtgctgccc gcgcttgac cgctcgaaga aaagcgcgcc ctaaagcgcg agtctggtga 21120
 cttggcacc accgtgagc tgatggtacc caagcgccag cgactggaag atgtcttgga 21180
 aaaaatgacc gtggaacctg ggctggagcc cgaggtccgc gtgcggccaa tcaagcagg 21240
 ggcgccggga ctggcggtgc agaccgtgga cgctcagata cccactacca gtagcaccag 21300
 tattgccacc gccacagagg gcatggagac acaaacgtcc ccggttgccct cagcgggtggc 21360
 ggatgccgag gtgcaggcgg tcgctgagc cgcgccaag acctctacgg aggtgcaaac 21420
 ggacccgtgg atgtttcagc tttcagcccc ccggcgcccc cgccgttcga ggaagtacgg 21480

cgccgccagc	gcgctactgc	ccgaatatgc	cctacatcct	tccattgcgc	ctacccccgg	21540
ctatcgtggc	tacacctacc	gccccagaag	acgagcaact	acccgacgcc	gaaccaccac	21600
tggaacccgc	cgccgccgtc	gccgtcgcca	gcccgctgtg	gccccgattt	ccgtgcgcag	21660
ggtggctcgc	gaaggaggca	ggaccctggt	gctgccaaca	gcgcgctacc	accccagcat	21720
cgtttaaaag	ccggtctttg	tggttcttgc	agatatggcc	ctcacctgcc	gcctccgttt	21780
cccggtgccg	ggattccgag	gaagaatgca	ccgtaggagg	ggcatggccg	gccacggcct	21840
gacgggcggc	atgcgtcgtg	cgcaccaccg	gcggcggcgc	gcgtcgcacc	gtcgcatgcg	21900
cggcggtatc	ctgcccctcc	ttattccact	gatcgccgcg	gcgattggcg	ccgtgccccg	21960
aattgcatcc	gtggccttgc	aggcgcagag	acactgatta	aaaacaagtt	gcatgtggaa	22020
aaatcaaaat	aaaaagtctg	gactctcacg	ctcgcttggt	cctgtaacta	ttttgtagaa	22080
tggaagacat	caacttttgc	tctctggccc	cgcgacacgg	ctcgcgcccc	ttcatgggaa	22140
actggcaaga	tatcggcacc	agcaatatga	gcggtggcgc	cttcagctgg	ggctcgtcgt	22200
ggagcggcat	taaaaatttc	ggttccaccg	ttaagaacta	tggcagcaag	gcctggaaca	22260
gcagcacagg	ccagatgctg	agggataagt	tgaagagca	aaattttcaa	caaaaggctg	22320
tagatggcct	ggcctctggc	attagcgggg	tggtggacct	ggccaaccag	gcagtgcaaa	22380
ataagattaa	cagtaagctt	gatccccgcc	ctcccgtaga	ggagcctcca	ccggccgtgg	22440
agacagtgtc	tccagagggg	cgtggcgaaa	agcgtccgcg	ccccgacagg	gaagaaactc	22500
tggtgacgca	aatagacgag	cctccctcgt	acgaggaggc	actaaagcaa	ggcctgcccc	22560
ccaccgcgtc	catcgcgccc	atggctaccg	gagtgtctgg	ccagcacaca	cccgtaacgc	22620
tggacctgcc	tccccccgcc	gacaccacgc	agaaacctgt	gctgccaggc	ccgaccgccg	22680
ttgttgtaac	ccgtcctagc	cgcgcgctcc	tgcgccgcgc	cgccagcggg	ccgcgatcgt	22740
tgcgccccgt	agccagtggc	aactggcaaa	gcacactgaa	cagcatcgtg	ggctctggggg	22800
tgcaatccct	gaagcgccga	cgatgcttct	gatagctaac	gtgtcgtatg	tgtgtcatgt	22860
atgcgtccat	gtcgccgcca	gaggagctgc	tgagccgccg	cgcgccccgt	ttccaagatg	22920
gctacccctt	cgatgatgcc	gcagtggctt	tacatgcaca	tctcggggca	ggacgcctcg	22980
gagtacctga	gccccgggct	ggtgcagttt	gcccgcgcca	ccgagacgta	cttcagcctg	23040
aataacaagt	ttagaaaccc	cacggtggcg	cctacgcacg	acgtgaccac	agaccggtcc	23100
cagcgtttga	cgctgcgggt	catccctgtg	gaccgtgagg	atactgcgta	ctcgtacaag	23160
gcgcggttca	ccctagctgt	gggtgataac	cgtgtgctgg	acatggcttc	cacgtacttt	23220
gacatccgcg	gcgtgctgga	cagggggcct	acttttaagc	cctactctgg	cactgcctac	23280
aacgccctgg	ctcccaaggg	tgccccaat	ccttgcgaa	gggatgaagc	tgctactgct	23340
cttgaaataa	acctagaaga	agaggacgat	gacaacgaag	acgaagtaga	cgagcaagct	23400
gagcagcaaa	aaactcacgt	atttgggcag	gcgccttatt	ctggtataaa	tattacaaag	23460
gagggtattc	aaataggtgt	cgaagggtcaa	acacctaaat	atgccgataa	aacatttcaa	23520

cctgaacctc	aaataggaga	atctcagtg	tacgaaacag	aaattaatca	tgagctggg	23580
agagtcctaa	aaaagactac	cccaatgaaa	ccatgttacg	gttcatatgc	aaaaccaca	23640
aatgaaaatg	gagggcaagg	cattcttgta	aagcaacaaa	atggaaagct	agaaagtcaa	23700
gtggaaatgc	aatttttctc	aactactgag	gcagccgcag	gcaatggtga	taacttgact	23760
cctaaagtgg	tattgtacag	tgaagatgta	gatatagaaa	ccccagacac	tcatatttct	23820
tacatgcca	ctattaagga	aggtaactca	cgagaactaa	tgggccaaca	atctatgccc	23880
aacaggccta	attacattgc	ttttagggac	aattttattg	gtctaatagt	ttacaacagc	23940
acgggtaata	tgggtgttct	ggcgggcca	gcacgcagct	tgaatgctgt	tgtagatttg	24000
caagacagaa	acacagagct	ttcataccag	cttttgcttg	attccattgg	tgatagaacc	24060
aggtactttt	ctatgtggaa	tcaggctgtt	gacagctatg	atccagatgt	tagaattatt	24120
gaaaatcatg	gaactgaaga	tgaacttcca	aattactgct	ttccactggg	aggtgtgatt	24180
aatacagaga	ctcttaccaa	ggtaaaacct	aaaacaggct	aggaaaatgg	atgggaaaaa	24240
gatgctacag	aattttcaga	taaaaatgaa	ataagagttg	gaaataattt	tgccatggaa	24300
atcaatctaa	atgccaacct	gtggagaaat	ttcctgtact	ccaacatagc	gctgtatttg	24360
cccgacaagc	taaagtacag	tccttccaac	gtaaaaattt	ctgataacc	aaacacctac	24420
gactacatga	acaagcgagt	ggtggctccc	gggctagtgg	actgctacat	taaccttgga	24480
gcacgctggt	cccttgacta	tatggacaac	gtcaaccat	ttaaccacca	ccgcaatgct	24540
ggcctgcgct	accgctcaat	gttgctgggc	aatggtcgct	atgtgccctt	ccacatccag	24600
gtgcctcaga	agttctttgc	cattaaaaac	ctccttctcc	tgccgggctc	atacacctac	24660
gagtggaaact	tcaggaagga	tgtaacatg	gttctgcaga	gtccctagg	aaatgacct	24720
agggttgacg	gagccagcat	taagtttgat	agcatttgcc	tttacgccac	cttcttcccc	24780
atggcccaca	acaccgcctc	cacgcttgag	gccatgctta	gaaacgacac	caacgaccag	24840
tcctttaacg	actatctctc	cgccgccaac	atgctctacc	ctatacccg	caacgctacc	24900
aacgtgcca	tatccatccc	ctcccgaac	tgggaggctt	tccgaggctg	ggccttcacg	24960
cgccttaaga	ctaaggaaac	cccatcactg	ggctcgggct	acgaccctta	ttacacctac	25020
tctggctcta	tacctacct	agatggaacc	ttttacctca	accacacctt	taagaagggtg	25080
gccattacct	ttgactcttc	tgtcagctgg	cctggcaatg	accgctgct	taccccaac	25140
gagtttgaaa	ttaagcgctc	agttgacggg	gaggggttaca	acgttgcca	gtgtaacatg	25200
accaaagact	ggttcctgg	acaaatgcta	gctaactata	acattggcta	ccagggttc	25260
tatatcccag	agagctacaa	ggaccgcatg	tactccttct	ttagaaactt	ccagcccatg	25320
agccgtcagg	tggtggatga	tactaaatac	aaggactacc	aacagggtgg	catcctacac	25380
caacacaaca	actctggatt	tggtggctac	cttgcccca	ccatgcgcga	aggacaggcc	25440
tacctgcta	acttccccta	tccgcttata	ggcaagaccg	cagttgacag	cattacccag	25500
aaaaagtttc	tttgcgatcg	cacccttg	cgcatcccat	tctccagtaa	ctttatgtcc	25560

atgggcgcac	tcacagacct	gggccaaaac	cttctctacg	ccaactccgc	ccacgcgcta	25620
gacatgactt	ttgaggtgga	tcccatggac	gagcccaccc	ttctttatgt	tttgtttgaa	25680
gtctttgacg	tggtccgtgt	gcaccagccg	caccgcggcg	tcatcgaaac	cgtgtacctg	25740
cgcacgccct	tctcggccgg	caacgccaca	acataaagaa	gcaagcaaca	tcaacaacag	25800
ctgccgccat	gggctccagt	gagcaggaac	tgaaagccat	tgtcaaagat	cttggttgtg	25860
ggccatattt	tttgggcacc	tatgacaagc	gctttccagg	ctttgtttct	ccacacaagc	25920
tcgcctgctc	catagtcaat	acggccggtc	gcgagactgg	gggcgtacac	tggatggcct	25980
ttgcctggaa	cccgcactca	aaaacatgct	acctctttga	gccctttggc	ttttctgacc	26040
agcgactcaa	gcaggtttac	cagtttgagt	acgagtcact	cctgcgccgt	agcgccattg	26100
cttcttcccc	cgaccgctgt	ataacgctgg	aaaagtccac	ccaaagcgta	caggggcccc	26160
actcggccgc	ctgtggacta	ttctgctgca	tgtttctcca	cgcctttgcc	aactggcccc	26220
aaactcccat	ggatcacaa	cccaccatga	accttattac	cgggggtaccc	aactccatgc	26280
tcaacagtcc	ccaggtacag	cccaccctgc	gtcgcaacca	ggaacagctc	tacagcttcc	26340
tggagcgcca	ctcgccctac	ttccgcagcc	acagtgcgca	gattaggagc	gccacttctt	26400
tttgtcactt	gaaaaacatg	taaaaataat	gtactagaga	cactttcaat	aaaggcaa	26460
gcttttattt	gtacactctc	gggtgattat	ttacccccac	ccttgccgtc	tgccgcgttt	26520
aaaaatcaaa	gggtttctgc	cgcgcatcgc	tatgcgccac	tggcaggggac	acgttgcgat	26580
actggtgttt	agtgtccac	ttaaactcag	gcacaaccat	ccgcggcagc	tcggtgaagt	26640
tttcaactca	caggctgcgc	accatcacca	acgcgtttag	caggctcggc	gccgatattc	26700
tgaagtcgca	gttggggcct	ccgccctgcg	cgcgcgagtt	gcgatacaca	gggttgccagc	26760
actggaacac	tatcagcgcc	gggtggtgca	cgctggccag	cacgctcttg	tcggagatca	26820
gatccgcgtc	caggctctcc	gcgttgctca	gggcgaacgg	agtcaacttt	ggtagctgcc	26880
ttcccaaaaa	gggcgcgtgc	ccaggctttg	agttgcactc	gcaccgtagt	ggcatcaaaa	26940
ggtgaccgtg	cccgttctgg	gcgttaggat	acagcgccctg	cataaaagcc	ttgatctgct	27000
taaaagccac	ctgagccttt	gcgccttcag	agaagaacat	gccgcaagac	ttgccggaaa	27060
actgattggc	cggacaggcc	gcgtcgtgca	cgcagcacct	tgcgtcggtg	ttggagatct	27120
gcaccacatt	tcggccccac	cggttcttca	cgatcttggc	cttgctagac	tgctccttca	27180
gcgcgcgtg	cccgttttgc	ctcgtcacat	ccatttcaat	cacgtgctcc	ttatttatca	27240
taatgcttcc	gtgtagacac	ttaagctcgc	cttcgatctc	agcgcagcgg	tgagccaca	27300
acgcgcagcc	cgtgggctcg	tgatgcttgt	aggtcacctc	tgcaaacgac	tgacgggtacg	27360
cctgcaggaa	tcgccccatc	atcgtcacaa	aggctcttgt	gctggtgaag	gtcagctgca	27420
acccgcgggtg	ctcctcgttc	agccagggtct	tgcatacggc	cgcagagct	tccacttgggt	27480
caggcagtag	tttgaagtgc	gccttttagat	cgttatccac	gtggtacttg	tccatcagcg	27540
cgcgcgagc	ctccatgccc	ttctccacg	cagacacgat	cggcacactc	agcgggttca	27600

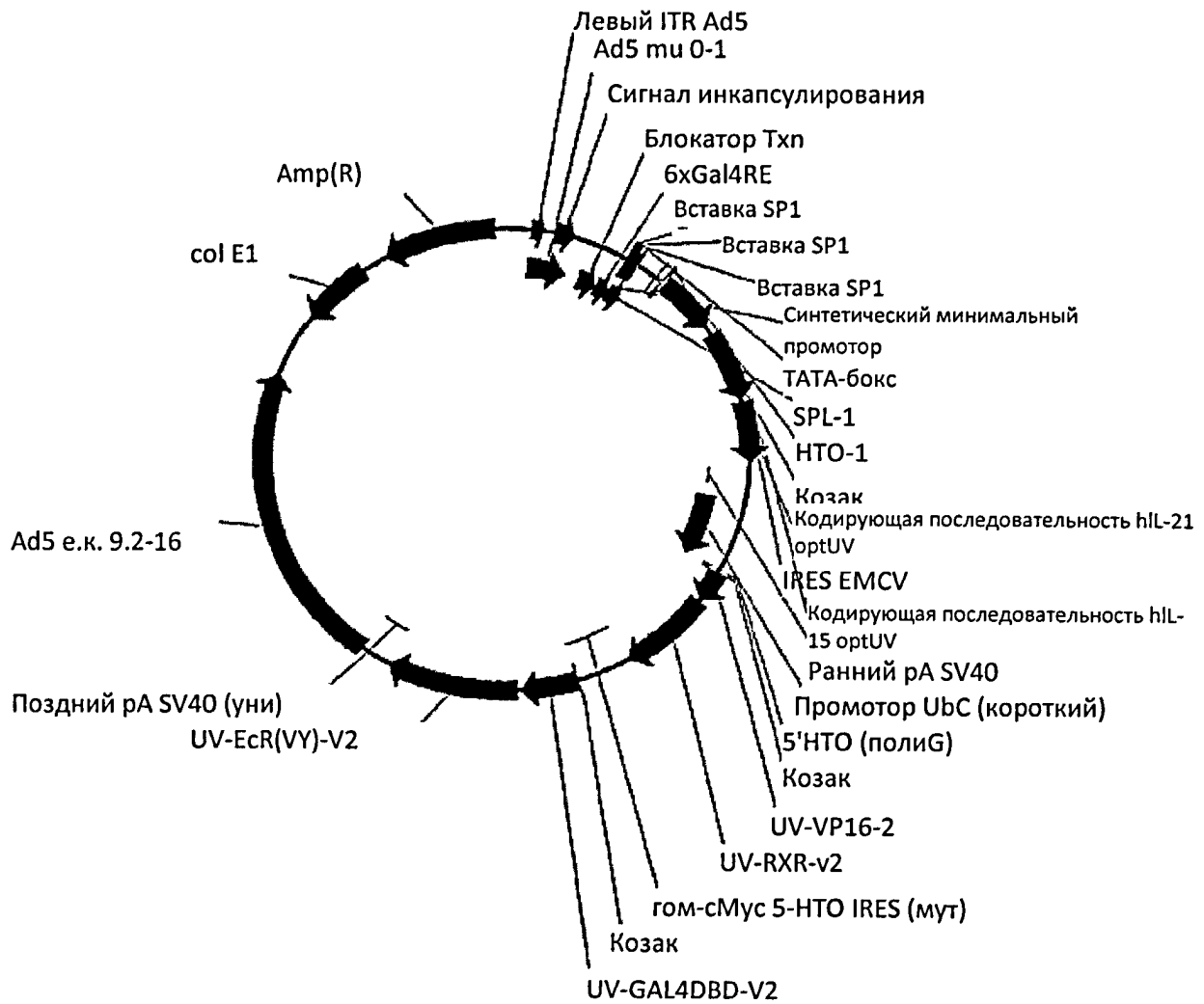
tcaccgtaat	ttcactttcc	gcttcgctgg	gctcttcctc	ttcctcttgc	gtccgcatac	27660
cacgcgccac	tgggtcgtct	tcattcagcc	gccgcactgt	gcgcttacct	cctttgccat	27720
gcttgattag	caccggtggg	ttgctgaaac	ccaccatttg	tagcgccaca	tcttctcttt	27780
cttcctcgct	gtccacgatt	acctctggtg	atggcgggcg	ctcgggcttg	ggagaagggc	27840
gcttcttttt	cttcttgggc	gcaatggcca	aatccgccgc	cgaggctgat	ggccgcgggc	27900
tgggtgtgcg	cggcaccagc	gcgtcttggtg	atgagtcttc	ctcgtcctcg	gactcgatac	27960
gccgcctcat	ccgctttttt	gggggcgccc	ggggaggcgg	cggcgacggg	gacggggacg	28020
acacgtcctc	catggttggg	ggacgtcgcg	ccgcaccgcg	tccgcgctcg	ggggtggttt	28080
cgcgctgctc	ctcttcccga	ctggccattt	ccttctccta	taggcagaaa	aagatcatgg	28140
agtcagtcga	gaagaaggac	agcctaaccg	ccccctctga	gttcgccacc	accgcctcca	28200
ccgatgccgc	caacgcgcct	accaccttcc	ccgtcgaggc	acccccgctt	gaggaggagg	28260
aagtgattat	cgagcaggac	ccaggttttg	taagcgaaga	cgacgaggac	cgctcagtac	28320
caacagagga	taaaaagcaa	gaccaggaca	acgcagaggc	aaacgaggaa	caagtcgggc	28380
ggggggacga	aaggcatggc	gactacctag	atgtgggaga	cgacgtgctg	ttgaagcatc	28440
tgcagcgcca	gtgcgccatt	atctgcgacg	cgttgcaaga	gcgcagcgat	gtgcccctcg	28500
ccatagcgga	tgtcagcctt	gcctacgaac	gccacctatt	ctcaccgcgc	gtacccccca	28560
aacgccaaaga	aaacggcaca	tgcgagccca	acccgcgcct	caacttctac	cccgtatttg	28620
ccgtgccaga	ggtgcttgcc	acctatcaca	tctttttcca	aaactgcaag	atacccttat	28680
cctgccgtgc	caaccgcagc	cgagcggaca	agcagctggc	cttgcggcag	ggcgctgtca	28740
tacctgatat	cgcctcgctc	aacgaagtgc	caaaaatctt	tgagggtctt	ggacgcgacg	28800
agaagcgcg	ggcaaacgct	ctgcaacagg	aaaacagcga	aatgaaagt	cactctggag	28860
tgttggtgga	actcgagggg	gacaacgcgc	gcctagccgt	actaaaacgc	agcatcgagg	28920
tcaccactt	tgcctaccg	gcacttaacc	taccccccaa	ggtcatgagc	acagtcatga	28980
gtgagctgat	cgtgcgccgt	gcgcagcccc	tggagagggg	tgcaaatttg	caagaacaaa	29040
cagaggagg	cctaccgcga	gttggcgacg	agcagctagc	gcgctggctt	caaacgcgcg	29100
agcctgccga	cttgaggagg	cgacgcaaac	taatgatggc	cgcagtgtc	gttaccgtgg	29160
agcttgagt	catgcagcgg	ttctttgctg	acccggagat	gcagcgcaag	ctagaggaaa	29220
cattgcacta	cacctttcga	cagggctacg	tacgccaggc	ctgcaagatc	tccaacgtgg	29280
agctctgcaa	cctggtctcc	taccttgga	ttttgcacga	aaaccgcctt	gggcaaaacg	29340
tgcttcattc	cacgtcaag	ggcgaggcgc	gccgcgacta	cgtccgcgac	tgcgtttact	29400
tatttctatg	ctacacctgg	cagacggcca	tgggcgtttg	gcagcagtgc	ttggaggagt	29460
gcaacctcaa	ggagctgcag	aaactgctaa	agcaaaactt	gaaggaccta	tggacggcct	29520
tcaacgagcg	ctccgtggcc	gcgcacctgg	cggacatcat	tttccccgaa	cgcctgctta	29580
aaaccctgca	acaggggtctg	ccagacttca	ccagtcaaag	catgttgacg	aacttttagga	29640

actttatcct agagcgctca ggaatcttgc ccgccacctg ctgtgcactt cctagcgact 29700
 ttgtgcccac taagtaccgc gaatgccttc cgccgctttg gggccactgc taccttctgc 29760
 agctagccaa ctaccttgcc taccactctg acataatgga agacgtgagc ggtgacggtc 29820
 tactggagtg tctactgtcg tgcaacctat gcaccccgca ccgctccctg gtttgcaatt 29880
 cgagctgct taacgaaagt caaattatcg gtacctttga gctgcagggt ccctcgcctg 29940
 acgaaaagtc cgcggtccg gggttgaaac tctactccggg gctgtggacg tcggcttacc 30000
 ttcgcaaatt tgtacctgag gactaccacg cccacgagat taggttctac gaagaccaat 30060
 cccgcccgc taatgcggag cttaccgcct gcgtcattac ccagggccac attcttggcc 30120
 aattgcaagc catcaacaaa gcccgcgaag agtttctgct acgaaaggga cgggggggttt 30180
 acttggaacc ccagtccggc gaggagctca acccaatccc cccgccgcg cagccctatc 30240
 agcagcagcc gcggggccctt gcttcccagg atggcaccca aaaagaagct gcagctgccg 30300
 ccgccacca cggacgagga ggaatactgg gacagtcagg cagaggaggt tttggacgag 30360
 gaggaggagg acatgatgga agactgggag agcctagacg aggaagcttc cgaggtcgaa 30420
 gaggtgtcag acgaaacacc gtcaccctcg gtcgcattcc cctcgccggc gcccagaaa 30480
 tcggcaaccg gttccagcat ggctacaacc tccgctcctc aggcgccgc ggcactgccc 30540
 gttcgccgac ccaaccgtag atgggacacc actggaacca gggccggtaa gtccaagcag 30600
 ccgccgccgt tagcccaaga gcaacaacag cgccaaggct accgctcatg gcgcgggcac 30660
 aagaacgcca tagttgcttg cttgcaagac tgtgggggca acatctcctt cggccgccgc 30720
 tttcttctct accatcacgg cgtggccttc ccccgtaaca tcctgcatta ctaccgtcat 30780
 ctctacagcc catactgcac cggcggcagc ggcagcaaca gcagcggcca cacagaagca 30840
 aaggcgaccg gatagcaaga ctctgacaaa gcccagaaga tccacagcgg cggcagcagc 30900
 aggaggagga gcgctgcgtc tggcgcccaa cgaaccgcgt tcgaccgcg agcttagaaa 30960
 caggattttt cccactctgt atgctatatt tcaacagagc aggggccaag aacaagagct 31020
 gaaaataaaa aacaggctctc tgcgatccct caccgcagc tgctgtatc acaaaagcga 31080
 agatcagctt cggcgcacgc tggaagacgc ggaggctctc ttcagtaaact actgcgcgct 31140
 gactcttaag gactagtttc gcgccctttc tcaaatttaa gcgcgaaaac tacgtcatct 31200
 ccagcggcca caccggcgc cagcacctgt tgtcagcgcc attatgagca aggaaattcc 31260
 cagccctac atgtggagtt accagccaca aatgggactt gcggctggag ctgccaaga 31320
 ctactcaacc cgaataaact acatgagcgc gggacccac atgatatccc gggtaacgg 31380
 aatacgcgcc caccgaaacc gaattctcct ggaacaggcg gctattacca ccacacctcg 31440
 taataacctt aatccccgta gttggccgc tgccctggtg taccaggaaa gtcccgtcc 31500
 caccactgtg gtacttcca gagacgcca ggccgaagtt cagatgacta actcaggggc 31560
 gcagcttgcg ggcggctttc gtcacagggt gcggctgccc gggcagggtg taactcacct 31620
 gacaatcaga gggcgaggta ttcagctcaa cgacgagtcg gtgagctcct cgcttgggtct 31680

ccgtccggac gggacatttc agatcggcgg cgccggccgc tcttcattca cgcctcgtca 31740
 ggcaatccta actctgcaga cctcgtcctc tgagccgcgc tctggaggca ttggaactct 31800
 gcaatttatt gaggagtttg tgccatcggg ctactttaac cccttctcgg gacctcccgg 31860
 ccactatccg gatcaattta ttcctaactt tgacgcggta aaggactcgg cggacggcta 31920
 cgactgaatg ttaagtggag aggcagagca actgcgccctg aaacacctgg tccactgtcg 31980
 ccgccacaag tgctttgccc ggcactccgg tgagttttgc tactttgaat tgcccagga 32040
 tcatatcgag ggcccggcgc acggcgtccg gcttaccgcc caggagagagc ttgcccgtag 32100
 cctgattcgg gagtttaccg agcgcctcct gctagttgag cgggacaggg gacctgtgt 32160
 tctcactgtg atttgcaact gtcctaaccg tggattacat caagatctta ttccctttaa 32220
 ctaataaaaa aaaataataa agcatcactt acttaaaatc agttagcaaa tttctgtcca 32280
 gtttattcag cagcacctcc ttgccctcct ccagctctg gtattgcagc ttccctctgg 32340
 ctgcaaactt tctccacaat ctaaattgaa tgtcagtttc ctctgttcc tgtccatccg 32400
 caccactat cttcatgttg ttgcagatga agcgcgcaag accgtctgaa gataccttca 32460
 acccgtgta tccatatgac acggaaccg gtccctcaac tgtgcctttt cttactcctc 32520
 cctttgtatc cccaatggg tttcaagaga gtccccctgg ggtactctct ttgcgcctat 32580
 ccgaacctct agttacctcc aatggcatgc ttgcgctcaa aatgggcaac ggcctctctc 32640
 tggacgaggg cggaacctt acctcccaa atgtaaccac tgtgagccca cctctcaaaa 32700
 aaaccaagtc aaacataaac ctggaaatat ctgcacctt cacagttacc tcagaagccc 32760
 taactgtggc tgccgccgca cctctaattg tcgcgggcaa cacactcacc atgcaatcac 32820
 agggcccgct aaccgtgcac gactccaaac ttagcattgc caccgaagga cccctcacag 32880
 tgtcagaagg aaagctagcc ctgcaaacat caggccccct caccaccacc gatagcagta 32940
 cccttactat cactgcctca cccctctaa ctactgccac tggtagcttg ggcattgact 33000
 tgaaagagcc catttataca caaatggaa aactaggact aaagtacggg gtccttttgc 33060
 atgtaacaga cgacctaaac actttgaccg tagcaactgg tccaggtgtg actattaata 33120
 atacttcctt gcaaaactaa gttactggag ccttgggttt tgattcaca ggcaatatgc 33180
 aacttaatgt agcaggagga ctaaggattg attctcaaaa cagacgcctt atacttgatg 33240
 ttagttatcc gtttgatgct caaaaccaac taaatctaag actaggacag ggccctcttt 33300
 ttataaactc agcccacaac ttggatatta actacaaca aggcctttac ttgtttacag 33360
 cttcaaaca ttccaaaaag cttgagggtta acctaagcac tgccaagggg ttgatgtttg 33420
 acgctacagc catagccatt aatgcaggag atgggcttga atttggttca cctaattgcac 33480
 caaacacaaa tccctcaaa acaaaaattg gccatggcct agaatttgat tcaaacagg 33540
 ctatggttcc taaactagga actggcctta gttttgacag cacaggtgcc attacagtag 33600
 gaaacaaaaa taatgataag ctaactttgt ggaccacacc agctccatct cctaactgta 33660
 gactaaatgc agagaaagat gctaaactca ctttgggtctt aacaaaatgt ggcagtcaaa 33720

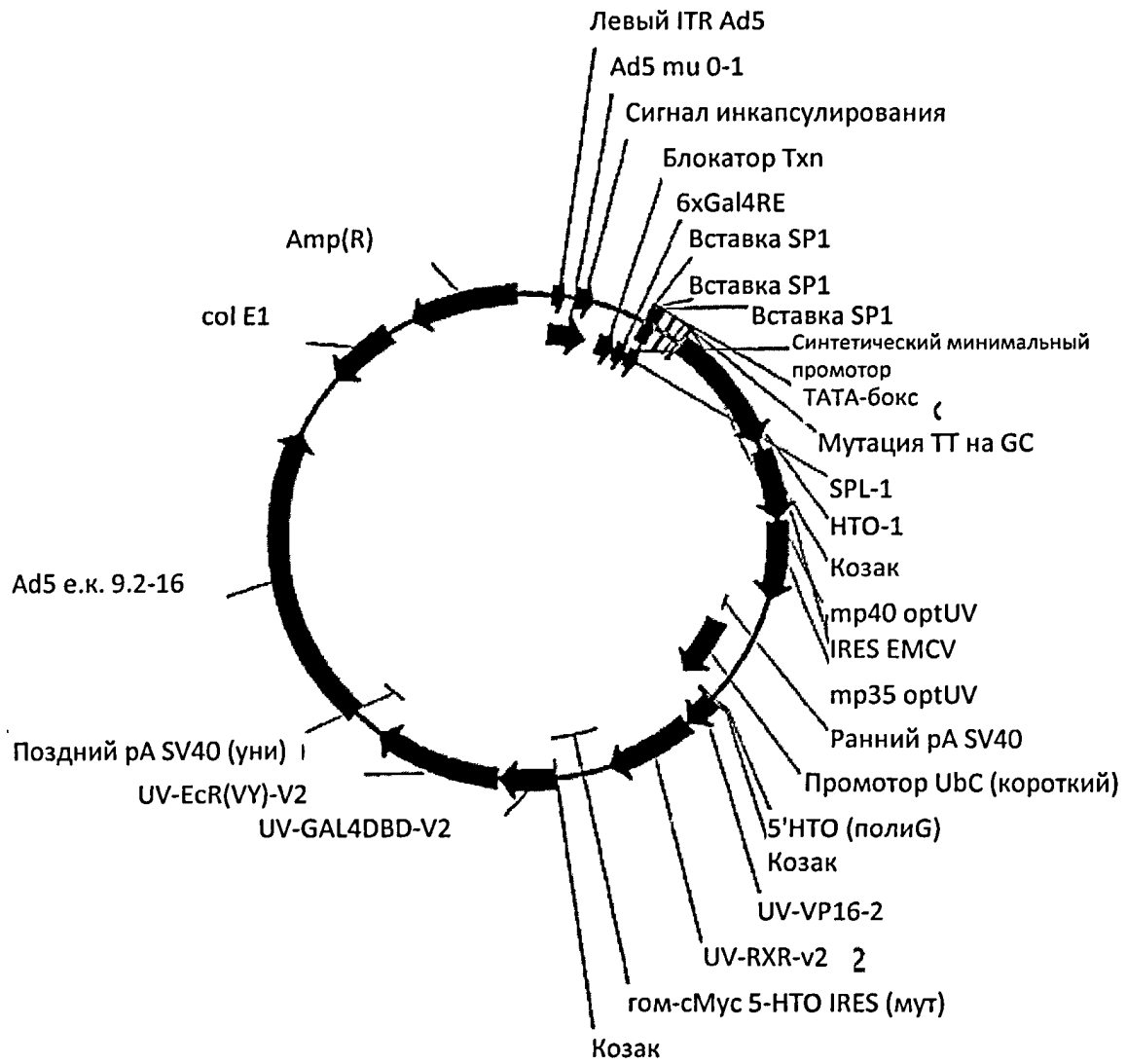
tacttgctac agtttcagtt ttggctgtta aaggcagttt ggctccaata tctggaacag 33780
ttcaaagtgc tcatcttatt ataagatttg acgaaaatgg agtgctacta aacaattcct 33840
tcctggaccc agaattattg aacttttagaa atggagatct tactgaaggc acagcctata 33900
caaacgctgt tggatttatg cctaacctat cagcttatcc aaaatctcac ggtaaaactg 33960
ccaaaagtaa cattgtcagt caagtttact taaacggaga caaaactaaa cctgtaacac 34020
taaccattac actaaacggt acacaggaaa caggagacac aactccaagt gcatactcta 34080
tgtcattttc atgggactgg tctggccaca actacattaa tgaaatattt gccacatcct 34140
cttacacttt ttcatacatt gcccaagaat aaagaatcgt ttgtgttatg tttcaacgtg 34200
tttatttttc aattgcagaa aatttcaagt cttttttcat tcagtagtat agccccacca 34260
ccacatagct tatacagatc accgtacctt aatcaaactc acagaaccct agtattcaac 34320
ctgccacctc cctcccaaca cacagagtac acagtccttt 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 catgggggta gagtcataat cgtgcatcag gataggcgcg 34620
tgggtgtgca gcagcgcgcg aataaactgc tgccgccgcc gctccgtcct gcaggaatac 34680
aacatggcag tgggtctctc agcgatgatt cgcaccgccc gcagcataag gcgccttgtc 34740
ctccgggcac agcagcgcac cctgatctca cttaaatacag cacagtaact gcagcacagc 34800
accacaatat tgttcaaaat cccacagtgc aaggcgctgt atccaaagct catggcgggg 34860
accacagaac ccacgtggcc atcataccac aagcgcagggt agattaagtg gcgaccctc 34920
ataaacacgc tggacataaa cattacctt tttggcatgt tgtaattcac cacctcccgg 34980
taccatataa acctctgatt aaacatggcg ccatccacca ccatcctaaa ccagctggcc 35040
aaaacctgcc cgccggctat aactgacagg gaaccgggac tggaacaatg acagtggaga 35100
gcccaggact cgtaaccatg gatcatcatg ctcgatcatga tatcaatgtt ggcacaacac 35160
aggcacacgt gcatacactt cctcaggatt acaagctcct cccgcgttag aaccatatcc 35220
cagggaacaa cccattcctg aatcagcgta aatcccacac tgcagggaag acctcgcagc 35280
taactcacgt tgtgcattgt caaagtgtta cattcgggca gcagcggatg atcctccagt 35340
atggtagcgc gggtttctgt ctcaaaagga ggtagacgat ccctactgta cggagtgcgc 35400
cgagacaacc gagatcgtgt tggtcgtagt gtcatgcaa atggaacgcc ggacgtagtc 35460
atatttcctg aagcaaaacc aggtgcgggc gtgacaaaca gatctgcgtc tccggtctcg 35520
ccgcttagat cgctctgtgt agtagttgta gtatatccac tctctcaaag catccaggcg 35580
ccccctggct tcgggttcta tgtaaaactc ttcatgcgcc gctgccctga taacatccac 35640
caccgcagaa taagccacac ccagccaacc tacacattcg ttctgcgagt cacacacggg 35700
aggagcggga agagctggaa gaaccatgtt ttttttttta ttccaaaaga ttatccaaaa 35760

cctcaaaatg aagatctatt aagtgaacgc gctccccctcc ggtggcgtgg tcaaactcta	35820
cagccaaaga acagataatg gcattttgtaa gatgttgac aatggcttcc aaaaggcaaa	35880
cggccctcac gtccaagtgg acgtaaaggc taaacccttc aggggtgaatc tcctctataa	35940
acattccagc accttcaacc atgccccaaat aattctcatc tcgccacctt ctcaatatat	36000
ctctaagcaa atcccgaata ttaagtccgg ccattgtaaa aatctgctcc agagcgcctt	36060
ccaccttcag cctcaagcag cgaatcatga ttgcaaaaat tcaggttcct cacagacctg	36120
tataagattc aaaagcggaa cattaacaaa aataccgcga tcccgtaggt cccttcgcag	36180
ggccagctga acataatcgt gcaggctctgc acggaccagc gcggccactt ccccgccagg	36240
aaccatgaca aaagaaccca cactgattat gacacgcata ctcggagcta tgctaaccag	36300
cgtagccccg atgtaagctt gttgcatggg cggcgatata aaatgcaagg tgctgctcaa	36360
aaaatcaggc aaagcctcgc gcaaaaaaga aagcacatcg tagtcatgct catgcagata	36420
aaggcaggta agctccggaa ccaccacaga aaaagacacc atttttctct caaacatgtc	36480
tgcggttttc tgcataaaca caaaataaaa taacaaaaaa acatttaaac attagaagcc	36540
tgtcttaca caggaaaaac aacccttata agcataagac ggactacggc catgccggcg	36600
tgaccgtaaa aaaactggtc accgtgatta aaaagcacca cgcacagctc ctcggtcatg	36660
tccggagtca taatgtaaga ctcggtaaac acatcagggtt gattcacatc ggtcagtgct	36720
aaaaagcgac cgaaatagcc cgggggaata catacccga ggcgtagaga caacattaca	36780
gcccccatag gaggtataac aaaattaata ggagagaaaa acacataaac acctgaaaaa	36840
ccctctgcc taggcaaaat agcacctctc cgctccagaa caacatacag cgcttccaca	36900
gcggcagcca taacagtcag ccttaccagt aaaaaagaaa acctattaaa aaaacaccac	36960
tcgacacggc accagctcaa tcagtcacag tgtaaaaaag ggccaagtgc agagcgagta	37020
tatataggac taaaaaatga cgtaacggtt aaagtccaca aaaaacaccc agaaaaccgc	37080
acgcgaacct acgcccagaa acgaaagcca aaaaaccac aacttcctca aatcgtcact	37140
tccgttttcc cacgttacgt cacttcccat ttttaagaaaa ctacaattcc caacacatac	37200
aagttactcc gccctaaaac ctacgtcacc cgccccgttc ccacgccccg cgccacgtca	37260
caaactccac cccctcatta tcatattggc ttcaatccaa aataaggat attattgatg	37320
atg	37323



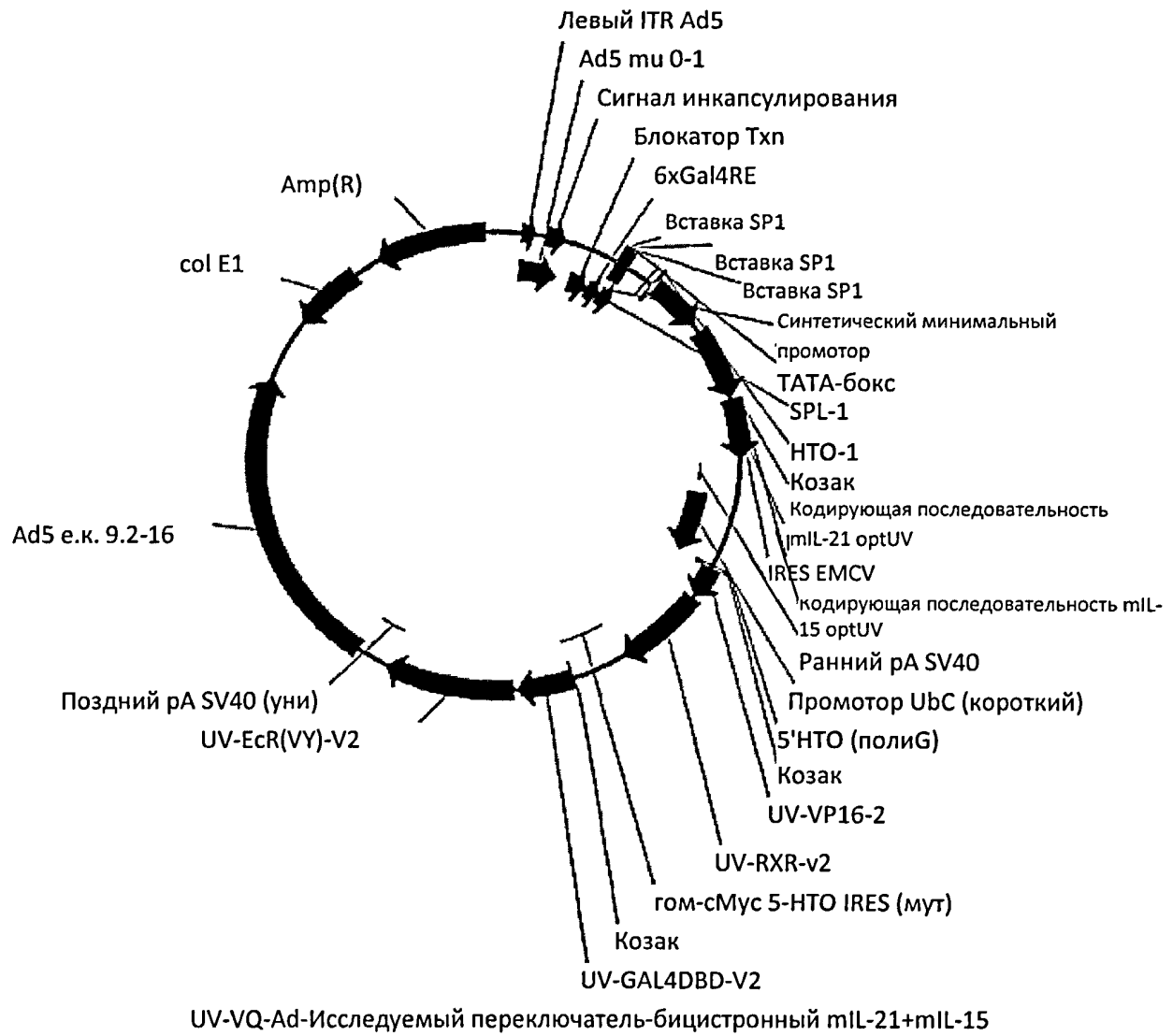
UV-VQ-Ad-Исследуемый переключатель-бицистронный hIL-21+hIL-15

ФИГ. 2

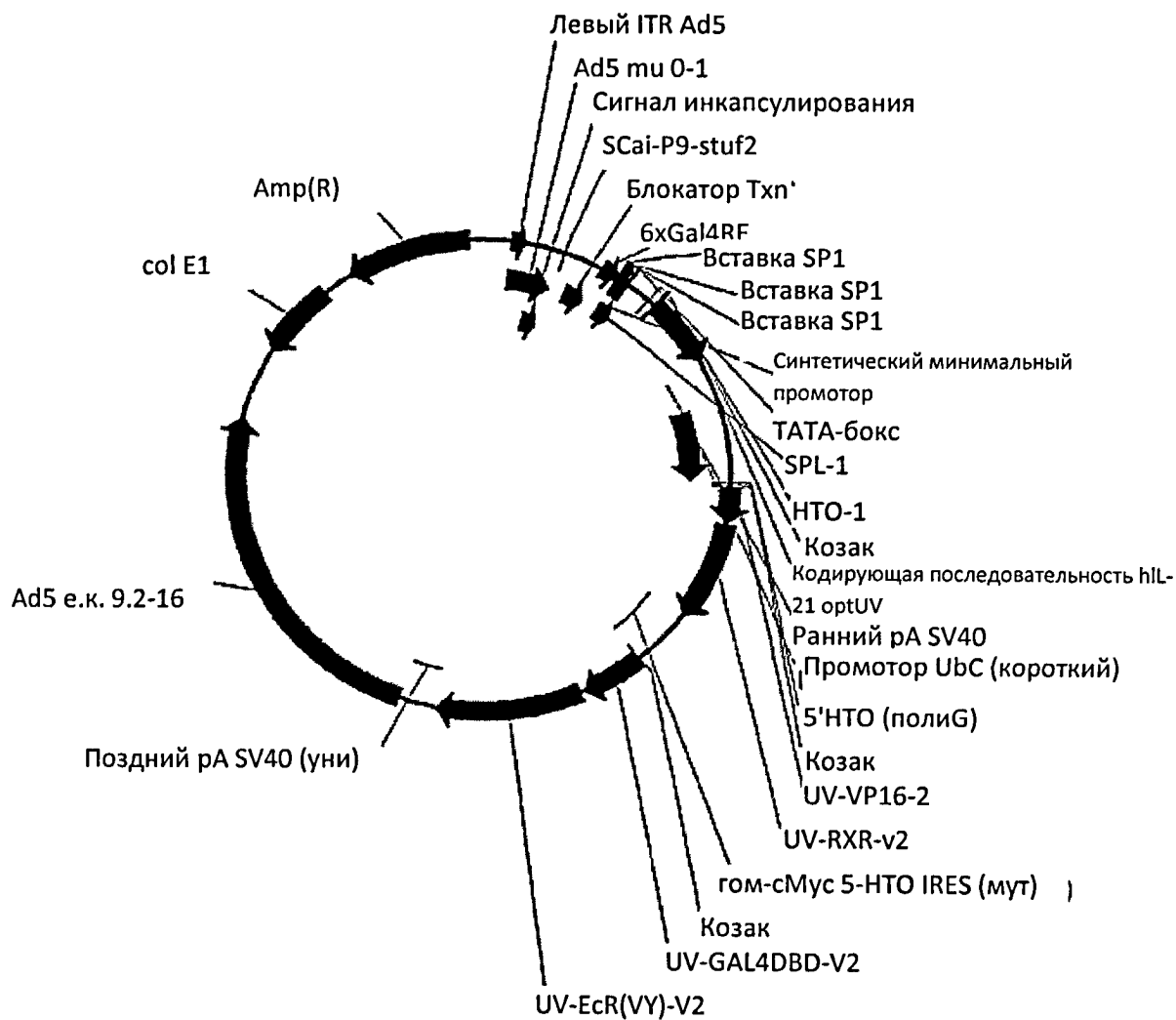


UV-VQ-Ad-Исследуемый переключатель-бицистронный mIL-12

ФИГ. 3

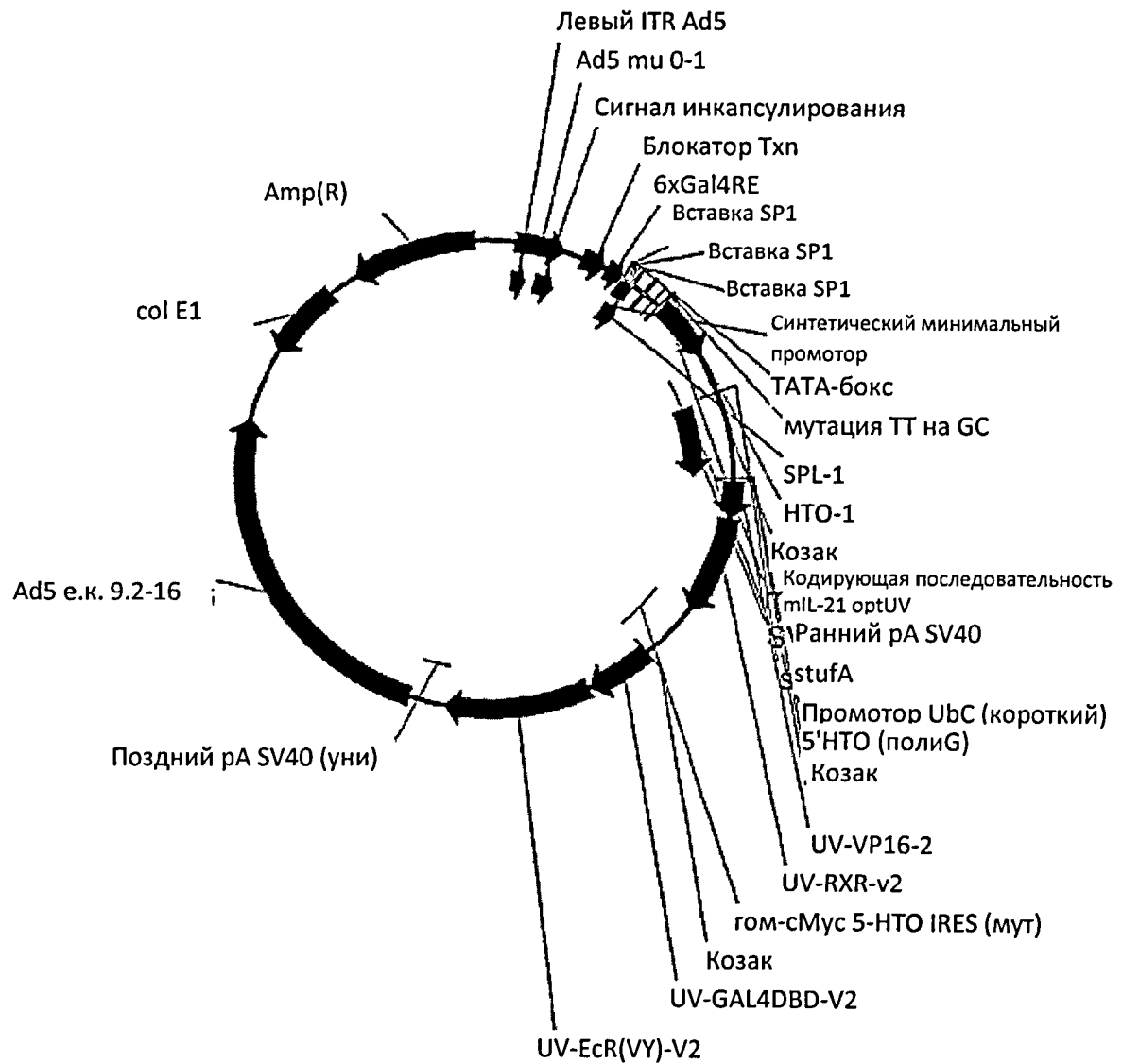


ФИГ. 4



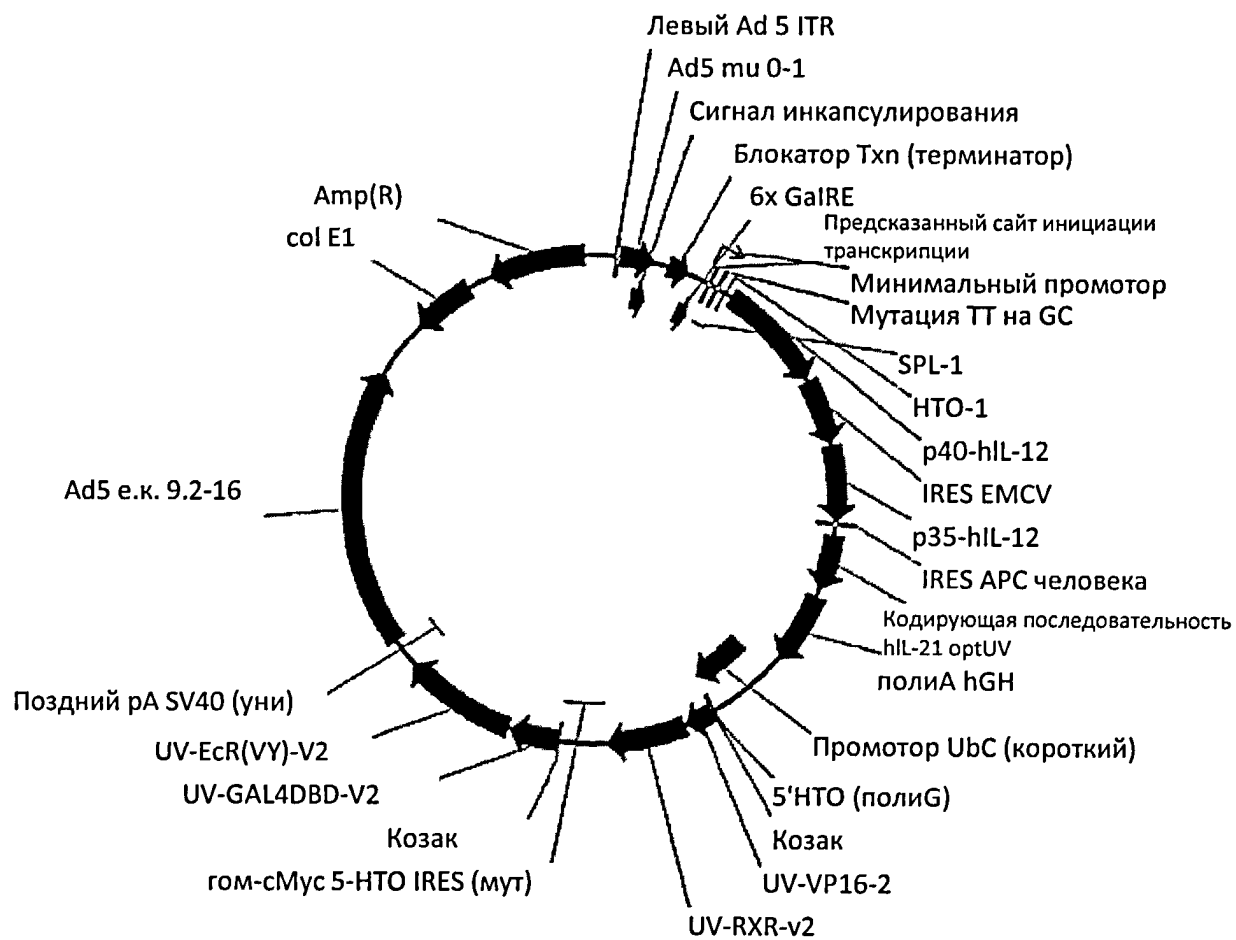
UV-VQ- Ad-Исследуемый переключатель-моноцистронный hIL-21

ФИГ. 5



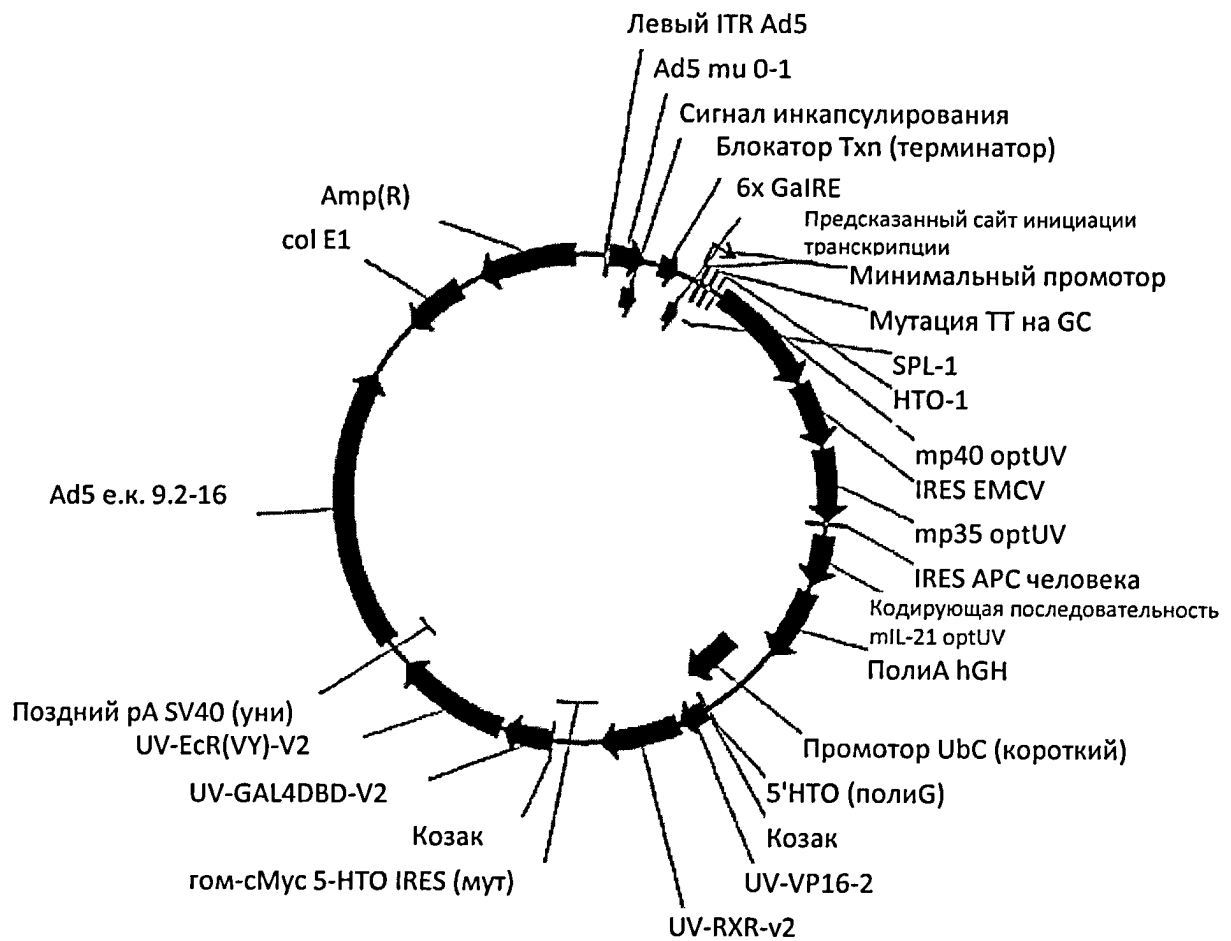
UV-VQ- Ad-Исследуемый переключатель-моноцистронный mIL-21

ФИГ. 6



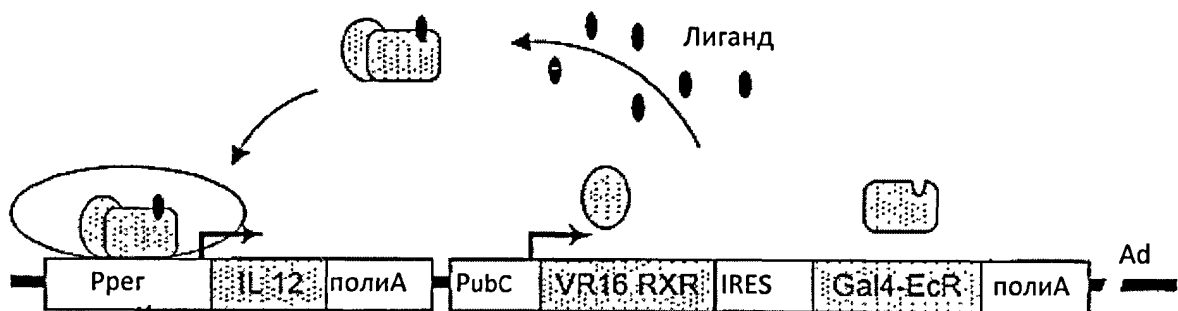
UV-VQ-Ad-Исследуемый переключатель-трицистронный-hIL-12+hIL-21

ФИГ. 7



UV-VQ-Ad-Исследуемый переключатель-трицистронный-mIL-12+mIL-21

ФИГ. 8



ФИГ. 9