

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **017948**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2013.04.30

(21) Номер заявки
200971059

(22) Дата подачи заявки
2008.05.16

(51) Int. Cl. *C12N 15/44* (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)

(54) ЛЕЧЕНИЕ И ПРОФИЛАКТИКА ГРИППА

(31) 60/938,315; 2007902616

(32) 2007.05.16

(33) US; AU

(43) 2010.04.30

(86) PCT/AU2008/000692

(87) WO 2008/138072 2008.11.20

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**МАТ МАЛЬТА ЭДВАНСТ
ТЕКНОЛОДЖИЗ ЛИМИТЕД (МТ);
КОММОНВЕЛТ САЙЕНТИФИК
ЭНД ИНДАСТРИАЛ РИСЕРЧ
ОРГАНИЗЕЙШН (AU)**

(72) Изобретатель:
**Доран Тимоти Джеймс, Маккей
Джеймс Клими, Мур Роберт Джон,
Лоуэнтал Джон Уилльям, Тайак
Скотт Джеффри (AU)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) US-A1-20060046248
US-A1-20060160759
US-A1-20070099858
WO-A2-2007017759
WO-A2-2006110688
US-A1-20040242518
WO-A2-2004067707

(57) Настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновых кислот, содержащим двунитевую область, и конструкциям нуклеиновых кислот, кодирующим их, которые можно использовать для лечения и/или профилактики гриппа. В частности, настоящее изобретение относится к конструкциям нуклеиновых кислот, кодирующим молекулу(ы) двунитевой РНК, которые могут использоваться для получения трансгенной домашней птицы, например кур, так, чтобы они были, по меньшей мере, менее восприимчивы к инфекции птичьего гриппа. Представляются также молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие двунитевую область, которая может использоваться в качестве терапевтического средства для лечения и/или профилактики, например, птичьего гриппа у домашней птицы.

017948 B1

017948 B1

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновых кислот, содержащим двунитевую область, и конструкциям нуклеиновых кислот, кодирующим их, которые можно использовать для лечения и/или профилактики гриппа. В частности, настоящее изобретение относится к конструкциям нуклеиновых кислот, кодирующим молекулу(ы) двунитевой РНК, которые могут использоваться для получения трансгенных животных, например цыплят, которые, по меньшей мере, менее восприимчивы к инфекции птичьего гриппа. Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, содержащим двунитевые области, которые могут использоваться в качестве терапевтических средств для лечения и/или профилактики, например, птичьего гриппа у домашней птицы.

Предшествующий уровень техники

Известны три типа вируса гриппа, типы А, В и С, и они относятся к семейству оболочечных вирусов, содержащих однонитевую отрицательную цепь РНК, называемых Orthomyxoviridae. Длина вирусного генома составляет приблизительно от 12000 до 15000 нуклеотидов и содержит 8 сегментов РНК (7 у типа С), которые кодируют 11 белков.

Вирус гриппа А инфицирует многих животных, таких как свиньи, лошади, морские животные и птицы, а также людей (Nicholson et al., 2005). Его природным резервуаром являются водоплавающие птицы, и у птиц большинство инфекций вирусом гриппа вызывает легкие локализованные инфекции дыхательных путей и кишечного тракта. Однако вирус может быть высокопатогенным для домашней птицы, вызывая внезапные вспышки с высоким процентом смертности в популяции пораженной домашней птицы.

Вирусы гриппа А можно классифицировать на подтипы на основании аллельных изменений в антигенных областях двух генов, которые кодируют поверхностные гликопротеиды, а именно гемагглютинин (НА) и нейраминидазу (НА), которые необходимы для прикрепления вируса и выхода из клеток. Другие основные вирусные белки включают нуклеопротеин, нуклеокапсидный структурный белок, матричные белки (М1 и М2), полимеразы (РА, РВ1 и РВ2) и неструктурные белки (NS1 и NS2).

У вируса гриппа А известны по меньшей мере 16 подтипов НА (Н1-Н16) и 9 НА (N1-N9) антигенных вариантов. Штаммы вируса птичьего гриппа могут также характеризоваться как низкопатогенные и высокопатогенные штаммы. Низкопатогенные штаммы обычно имеют только две основные аминокислоты в положениях -1 и -3 сайта расщепления предшественника НА, тогда как высокопатогенные штаммы имеют многоосновный сайт расщепления. Подтипы Н5 и Н7 могут вызвать высокопатогенные инфекции у домашней птицы, и было показано, что определенные подтипы преодолевают видовые барьеры и становятся инфекционными для людей. Высокопатогенные вирусы Н5 и Н7 могут также возникать из низкопатогенных предшественников у домашней птицы. Симптомы инфекции птичьего гриппа проявляются в диапазоне от обычных симптомов гриппа (лихорадка, кашель, боль в горле и мышечные боли) до конъюнктивита, пневмонии, острой дыхательной недостаточности и других угрожающих жизни осложнений.

Существует необходимость в разработке способов контроля существования и/или репликации вируса гриппа у животных, таких как домашняя птица, не только для повышения продуктивности и благополучия животных в промышленном животноводстве, но также для снижения рисков для здоровья людей.

Краткое описание сущности изобретения

Авторы идентифицировали молекулы нуклеиновых кислот, содержащие двунитевые области, которые способны снизить репликацию и/или продукцию вируса гриппа в инфицированных клетках животных.

Соответственно, настоящее изобретение относится к конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу РНК, содержащую двунитевую область, где молекула РНК снижает репликацию вируса гриппа А в клетке животного и/или снижает продукцию инфекционных частиц вируса гриппа А в клетке животного и/или снижает экспрессию полипептида вируса гриппа А в клетке животного, инфицированной вирусом гриппа А, по сравнению с изогенной клеткой животного, инфицированной вирусом гриппа А, не имеющей молекулы РНК.

Предпочтительно двунитевая область содержит нуклеотидную последовательность нуклеотидов, выбранных из

- (i) нуклеотидов в положениях от 2240 до 2341 последовательности SEQ ID NO: 1,
- (ii) нуклеотидов в положениях от 2257 до 2341 последовательности SEQ ID NO: 2,
- (iii) нуклеотидов в положениях от 2087 до 2233 последовательности SEQ ID NO: 3,
- (iv) нуклеотидов в положениях от 1484 до 1565 последовательности SEQ ID NO: 4,
- (v) нуклеотидной последовательности любой из последовательности SEQ ID NO: 6-15, или 52-54,
- (vi) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична любой из (i)-(v),
- (vii) нуклеотидной последовательности, которая гибридизуется с любой из (i)-(v) в жестких условиях.

В одном из вариантов осуществления молекула РНК снижает репликацию вируса гриппа А в клетке животного по сравнению с изогенной клеткой животного, инфицированной вирусом гриппа А, не имею-

щей молекулы РНК. В другом варианте осуществления молекула РНК снижает продукцию инфекционных частиц вируса гриппа А в клетке животного по сравнению с изогенной клеткой животного, инфицированной вирусом гриппа А, не имеющей молекулы РНК. В еще одном варианте осуществления молекула РНК снижает экспрессию полипептида вируса гриппа А в клетке животного, инфицированной вирусом гриппа А, по сравнению с изогенной инфицированной клеткой животного, не имеющей молекулы РНК.

Предпочтительно вирус гриппа А представляет собой вирус птичьего гриппа.

Конструкция нуклеиновой кислоты по изобретению может кодировать любой тип молекулы РНК, содержащей двунитевую область. Предпочтительно длина двунитевой области составляет по меньшей мере 19 п.о. Также предпочтительно длина двунитевой области составляет менее чем 100 п.о.

В особенно предпочтительном варианте осуществления кодированная молекула РНК представляет собой короткую РНК-"шпильку" (shРНК).

В одном из предпочтительных вариантов осуществления двунитевая область, кодируемая молекулой РНК, содержит последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 7.

В другом предпочтительном варианте осуществления двунитевая область, кодируемая молекулой РНК, содержит последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 9.

В другом предпочтительном варианте осуществления двунитевая область, кодируемая молекулой РНК, содержит последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 12.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления двунитевая область, кодируемая молекулой РНК, содержит последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 6.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления двунитевая область, кодируемая молекулой РНК, содержит последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 8.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления двунитевая область, кодируемая молекулой РНК, содержит последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 13.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления двунитевая область, кодируемая молекулой РНК, содержит последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 15.

В некоторых случаях может быть желательно, чтобы конструкция нуклеиновой кислоты кодировала более одной молекулы РНК, например 2, 3, 4, 5 или более молекул РНК. Соответственно, настоящее изобретение относится к конструкции нуклеиновой кислоты, которая кодирует две или более молекул РНК. Кодируемые молекулы РНК могут быть различными, или одинаковыми, или представлять собой их комбинацию. Кроме того, кодируемые молекулы РНК могут нацеливаться на одинаковые или различные гены вируса гриппа А или на их комбинацию. В одном из вариантов осуществления каждая молекула РНК содержит нуклеотидную последовательность, соответствующую другому гену вируса гриппа А.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к конструкции нуклеиновой кислоты по изобретению, где каждая молекула РНК кодируется нуклеотидной последовательностью, функционально связанной с промотором РНК полимеразы II или с промотором РНК полимеразы III. В предпочтительном варианте осуществления промоторы представляют собой промоторы РНК полимеразы III.

В некоторых случаях может быть желательно, чтобы последовательность промотора была такой же, как природная последовательность промотора животного и/или клетки, или ее потомства, в которую переносится/трансформируется конструкция нуклеиновой кислоты. В одном из вариантов осуществления промотор представляет собой куриный, индюшачий и/или утиный промотор.

Предпочтительно промотор выбран из промотора U6, 7SK и/или H1.

В одном из конкретных вариантов осуществления промотор U6 представляет собой cU6-1, cU6-2, CU6-3 и/или cU6-4.

В еще одном конкретном варианте осуществления промотор содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из любой последовательности SEQ ID NO: 22-25.

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что конструкции нуклеиновых кислот, содержащие промоторы U6, содержащие минимальное количество последовательности промотора, требуемое для индукции транскрипции shРНК, были по меньшей мере также эффективны при транскрибировании shРНК, как и конструкции, содержащие промоторы U6, с дополнительными 100 п.о. последовательности, находящейся выше по ходу транскрипции. Соответственно, в одном из вариантов осуществления изобретения промотор состоит из нуклеотидной последовательности, выбранной из любой последовательности SEQ ID NO: 22-25.

В еще одном варианте осуществления каждая нуклеотидная последовательность, кодирующая молекулу РНК, функционально связана с другим промотором РНК полимеразы III.

В одном из вариантов осуществления молекула РНК снижает экспрессию полипептида вируса гриппа А, кодируемого любой последовательностью SEQ ID NO: 1-5.

В одном из конкретных вариантов осуществления полипептид вируса гриппа А может быть выбран из PB1, PB2, PA, NP и/или M1. Предпочтительно полипептид представляет собой полипептид вируса птичьего гриппа.

В одном из вариантов осуществления штамм птичьего гриппа представляет собой высокопатогенный штамм.

Предпочтительно вирус птичьего гриппа представляет собой H5N1.

В другом варианте осуществления конструкция содержит только последовательности вируса гриппа А и природные последовательности животного-хозяина. Например, если конструкция сконструирована для трансфекции курицы, то конструкция нуклеиновой кислоты желательна должна состоять из последовательностей кур и вируса гриппа А. Поэтому в одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к конструкции нуклеиновой кислоты по изобретению, где конструкция состоит из нуклеотидных последовательностей кур и вируса гриппа А.

В предпочтительном варианте осуществления конструкция нуклеиновой кислоты по изобретению кодирует 3 молекулы РНК, содержащие двунитевую область, где двухнитевые области содержат нуклеотидные последовательности, выбранные из

- (i) SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 15,
- (ii) SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8,
- (iii) SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 12.

В другом предпочтительном варианте осуществления конструкция нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из последовательностей SEQ ID NO: 16-21 и 61-63 или их фрагментов, или последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из последовательностей SEQ ID NO: 16-21 и 61-63. Предпочтительно фрагмент содержит нуклеотидную последовательность, лишенную 100 нуклеотидов или менее с 5'-конца и/или 3'-конца последовательности, еще более предпочтительно 50 нуклеотидов или менее с 5'-конца и/или 3'-конца последовательности, еще более предпочтительно 20 нуклеотидов или менее с 5'-конца и/или 3'-конца последовательности, еще более предпочтительно 10 нуклеотидов или менее с 5'-конца и/или 3'-конца последовательности.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к выделенной и/или экзогенной молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей двунитевую область, где двунитевая область содержит последовательность нуклеотидов, выбранную из

- (i) нуклеотидов в положениях от 2240 до 2341 последовательности SEQ ID NO: 1,
- (ii) нуклеотидов в положениях от 2257 до 2341 последовательности SEQ ID NO: 2,
- (iii) нуклеотидов в положениях от 2087 до 2233 последовательности SEQ ID NO: 3,
- (iv) нуклеотидов в положениях от 1484 до 1565 последовательности SEQ ID NO: 4,
- (v) нуклеотидной последовательности любой из последовательностей SEQ ID NO: 6-15 или 52-54,
- (vi) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична любой из (i)-(v),
- (vii) нуклеотидной последовательности, которая гибридизируется с любой из (i)-(v) в жестких условиях.

В одном из вариантов осуществления выделенная и/или экзогенная молекула нуклеиновой кислоты снижает репликацию вируса гриппа А в клетке животного по сравнению с изогенной инфицированной вирусом гриппа А клеткой животного, не содержащей молекулы нуклеиновой кислоты. В другом варианте осуществления выделенная и/или экзогенная молекула нуклеиновой кислоты снижает продукцию инфекционных частиц вируса гриппа А в клетке животного по сравнению с изогенной клеткой животного, инфицированной вирусом гриппа А, не содержащей молекулы нуклеиновой кислоты. В еще одном варианте осуществления выделенная и/или экзогенная молекула нуклеиновой кислоты снижает экспрессию полипептида вируса гриппа А в клетке животного, инфицированной вирусом гриппа А, по сравнению с изогенной, инфицированной вирусом гриппа А клеткой животного, не содержащей молекулы нуклеиновой кислоты.

В другом варианте осуществления выделенная и/или экзогенная молекула нуклеиновой кислоты по изобретению снижает экспрессию полипептида вируса гриппа А, кодируемого любой последовательностью SEQ ID NO: 1-5.

Предпочтительно, длина двунитевой области выделенной и/или экзогенной молекулы нуклеиновой кислоты составляет по меньшей мере 19 п.о. В некоторых вариантах осуществления предпочтительно длина двунитевой области составляет менее 100 п.о.

В одном из вариантов осуществления выделенная и/или экзогенная молекула нуклеиновой кислоты содержит двунитевую РНК.

Предпочтительно выделенная и/или экзогенная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой интерферирующую короткую РНК или короткую РНК-"шпильку".

В одном из предпочтительных вариантов осуществления выделенная и/или экзогенная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из последовательностей SEQ ID NO: 16-21 и 61-63 или их фрагментов, или последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из последовательностей SEQ ID NO: 16-21 и 61-63. Предпочтительно фрагмент содержит нуклеотидную последовательность, лишенную 100 нуклеотидов или менее с 5'-конца и/или 3'-конца последовательности, еще более предпочтительно 50 нуклеотидов или менее с 5'-конца и/или 3'-конца последовательности, еще более предпочтительно 20 нуклеотидов или менее с 5'-конца и/или 3'-конца последовательности, еще более предпочтительно 10 нуклеотидов или менее с 5'-конца и/или 3'-конца последовательности.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения конструкция нуклеиновой кислоты и/или выделенная и/или экзогенная молекула нуклеиновой кислоты присутствует в геноме клетки.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к вектору, содержащему конструкцию нуклеиновой кислоты по изобретению, и/или к выделенной, и/или экзогенной молекуле нуклеиновой кислоты по изобретению.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к клетке, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, выделенную и/или экзогенную молекулу нуклеиновой кислоты, и/или вектор по изобретению.

В одном из вариантов осуществления клетка представляет собой примордиальную зародышевую клетку, например куриную примордиальную зародышевую клетку.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к трансгенному организму, не являющемуся организмом человека, содержащему конструкцию нуклеиновой кислоты, выделенную и/или экзогенную молекулу нуклеиновой кислоты, вектор и/или клетку по изобретению. Трансгенный организм может представлять собой любой организм, например животное или растение.

В одном из вариантов осуществления трансгенный организм представляет собой животное, исключая человека.

В другом варианте осуществления трансгенный организм представляет собой птицу. В предпочтительном варианте осуществления трансгенный организм представляет собой домашнюю птицу. В еще более предпочтительном варианте осуществления трансгенный организм представляет собой курицу, индюшку или утку.

В одном из вариантов осуществления трансгенный организм по изобретению содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из последовательностей SEQ ID NO: 16-21 и 61-63 или их фрагментов, или последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из последовательностей SEQ ID NO: 16-21 и 61-63, кодирующей по меньшей мере одну молекулу РНК, содержащую двунитевую область. Фрагменты и/или последовательности, тесно связанные с последовательностями SEQ ID NO: 16-21 и 61-63, охватываются этим вариантом осуществления, поскольку 5'-области и/или 3'-области конструкции могут быть утрачены при интеграции в геном организма, и/или небольшие мутации во время клеточного деления по многим поколениям могут привести к одному или нескольким различиям нуклеотидов по сравнению с первоначальной конструкцией. Предпочтительно фрагмент содержит нуклеотидную последовательность, лишенную 100 нуклеотидов или менее с 5'-конца и/или 3'-конца последовательности, еще более предпочтительно 50 нуклеотидов или менее с 5'-конца и/или 3'-конца последовательности, еще более предпочтительно 20 нуклеотидов или менее с 5'-конца и/или 3'-конца последовательности, еще более предпочтительно 10 нуклеотидов или менее с 5'-конца и/или 3'-конца последовательности.

В еще одном варианте осуществления трансгенный организм содержит две или более конструкции нуклеиновых кислот по изобретению.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к композиции, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты по изобретению, выделенную и/или экзогенную молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению, вектор по изобретению, клетку по изобретению и/или молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению.

Конструкции нуклеиновых кислот, выделенные и/или экзогенные молекулы нуклеиновой кислоты, векторы и клетки-хозяева по изобретению могут использоваться для лечения и/или профилактики инфекции индивида вирусом гриппа А. Например, конструкции нуклеиновых кислот, выделенные и/или экзогенные молекулы нуклеиновой кислоты, векторы и клетки-хозяева могут использоваться для защиты домашней птицы, такой как, но ими не ограничиваясь, курица, индюшка или утка, от птичьего гриппа. Кроме того, в случае локализованной вспышки птичьего гриппа в популяции птиц, может быть желательной защита от инфекции птиц в окружающих областях, например, на прилегающих фермах, для усиления сдерживания вспышки птичьего гриппа.

Таким образом, настоящее изобретение, кроме того, относится к способу лечения и/или профилактики инфекции индивида вирусом гриппа А, причем способ включает введение индивиду конструкции нуклеиновой кислоты по изобретению, выделенной и/или экзогенной молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению, вектора по изобретению и/или клетки по изобретению.

В одном из вариантов осуществления способ включает введение конструкции нуклеиновой кислоты, выделенной и/или экзогенной молекулы нуклеиновой кислоты, вектора и/или клетки в питьевой воде или аэрозоле.

В одном из конкретных вариантов осуществления вирус гриппа А представляет собой вирус птичьего гриппа.

Предпочтительно вирус птичьего гриппа относится к высокопатогенному штамму.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления вирус птичьего гриппа представляет собой вирус штамма H5N1.

Предпочтительно индивидом является птица, предпочтительно домашняя птица. В наиболее предпочтительном варианте осуществления индивидом является курица, индюшка или утка.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к способу снижения экспрессии одного или не-

скольких генов вируса гриппа А в клетке, причем способ включает введение в клетку выделенной и/или экзогенной молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к применению конструкции нуклеиновой кислоты по изобретению, выделенной и/или экзогенной молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению, вектора по изобретению, и/или клетки по изобретению при изготовлении лекарственного средства для лечения и/или профилактики инфекции вирусом гриппа А.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к способу идентификации животного, содержащего конструкцию нуклеиновой кислоты по изобретению и/или выделенную и/или экзогенную молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению, причем способ включает определение присутствия или отсутствия конструкции по изобретению или выделенной и/или экзогенной молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению в образце, полученном у животного.

В одном из вариантов осуществления способ включает амплификацию конструкции нуклеиновой кислоты или ее фрагмента или выделенной и/или экзогенной молекулы нуклеиновой кислоты или ее фрагмента.

В другом варианте осуществления способ включает приведение образца, взятого у животного, в контакт с зондом, который гибридизируется в жестких условиях с конструкцией нуклеиновой кислоты или с выделенной и/или экзогенной молекулой нуклеиновой кислоты с образованием комплекса, и определение присутствия или отсутствия комплекса.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к способу выведения устойчивого к гриппу трансгенного животного, исключая человека, причем способ включает:

- (i) введение конструкции нуклеиновой кислоты по изобретению в клетку животного, исключая человека,
- (ii) выбор трансгенной клетки, не являющейся клеткой человека, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты,
- (iii) регенерацию трансгенного животного, исключая человека, из трансгенной клетки, не являющейся клеткой человека,
- (iv) выведение трансгенного животного, исключая человека, для получения трансгенного потомства и
- (v) отбор трансгенного потомства, которое устойчиво к гриппу.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к способу получения пищевого продукта, причем способ включает:

- (i) введение конструкции нуклеиновой кислоты по изобретению в клетку животного,
- (ii) выбор трансгенной клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты,
- (iii) регенерацию трансгенного животного из трансгенной клетки,
- (iv) выведение трансгенного животного для получения трансгенного потомства и
- (v) получение пищевого продукта из трансгенного потомства.

В одном из вариантов осуществления пищевой продукт выбран из мяса и яиц.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к способу получения устойчивого к гриппу трансгенного животного, исключая человека, включающему:

- (i) введение в клетку первой нуклеиновой кислоты, содержащей транспозон, где нуклеиновая кислота кодирует молекулу двунитевой РНК,
- (ii) введение в клетку второй нуклеиновой кислоты, кодирующей транспозазу,
- (ii) выбор трансгенной клетки, содержащей первую нуклеиновую кислоту в геноме клетки,
- (iii) регенерацию трансгенного животного, исключая человека, из клетки и
- (iv) выведение трансгенного животного, исключая человека.

Первая и вторая нуклеиновые кислоты могут быть введены в клетку на одну молекулу нуклеиновой кислоты или, альтернативно, могут быть введены в клетку на отдельные молекулы нуклеиновой кислоты. Предпочтительно первая и вторая нуклеиновые кислоты вводят в клетку на отдельные молекулы нуклеиновой кислоты.

В одном из вариантов осуществления транспозон представляет собой транспозон To12, а транспозаза представляет собой транспозазу To12.

В еще одном варианте осуществления клетка представляет собой куриную примордиальную зародышевую клетку.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к резистентному к гриппу трансгенному животному, исключая человека.

В одном из вариантов осуществления трансгенное животное содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую молекулу РНК, содержащую двунитевую область, где молекула РНК снижает репликацию вируса гриппа в клетке животного по сравнению с инфицированной вирусом гриппа изогенной клеткой животного, не содержащей молекулы РНК.

В другом варианте осуществления трансгенное животное содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую молекулу РНК, содержащую двунитевую область, где молекула РНК снижает продукцию частиц вируса гриппа в клетке животного по сравнению с инфицированной вирусом гриппа изо-

генной клеткой животного, не содержащей молекулу РНК.

В другом варианте осуществления трансгенное животное содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую молекулу РНК, содержащую двунитевую область, где молекула РНК снижает экспрессию полипептида в инфицированной вирусом гриппа клетке по сравнению с инфицированной вирусом гриппа изогенной клеткой животного, не содержащей молекулу РНК.

В еще одном из вариантов осуществления трансгенное животное, исключая человека, представляет собой курицу, а грипп представляет собой грипп А.

Предпочтительно трансгенный организм, исключая человека, содержит конструкцию нуклеиновой кислоты по изобретению, выделенную или экзогенную молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению, вектор по изобретению и/или клетку по изобретению.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к применению трансгенного животного, исключая человека, по изобретению или трансгенного организма, исключая человека, по изобретению для выведения.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к применению трансгенного животного, исключая человека, по изобретению или трансгенного организма, исключая человека, по изобретению для получения пищевого продукта.

Очевидно, что предпочтительные признаки и характеристики одного из аспектов изобретения могут использоваться в большем числе других аспектов изобретения.

В настоящем описании слово "содержать" или его варианты, такие как "содержит" или "содержащий" означает включение указанных элементов, целых чисел или стадий или групп элементов, целых чисел или стадий, но не исключение любого другого элемента, целого числа или стадии или групп элементов, целых чисел или стадий.

Изобретение ниже описано путем следующих неограничивающих примеров со ссылкой на сопровождающие чертежи.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - PCR для кассет для экспрессии shРНК. Схематическое представление стратегии PCR, используемой для получения векторов экспрессии shРНК. В PCR использовались прямые праймеры, спаренные с обратными праймерами, содержащими все компоненты shРНК. Все конечные продукты PCR состояли из куриного промотора U6 или 7SK, смысловой shРНК, петли, антисмысловой shРНК, концевой последовательности и сайта XhoI.

Фиг. 2 - конструкция трансгена MWH-1. А - отдельные единицы транскрипции были получены с использованием подхода с использованием PCR в один этап. Продукты PCR содержат куриный промотор pol III и компоненты shРНК (смысловую, петельную, антисмысловую и концевую последовательности). В - эти три транскрипционные единицы лигировались вместе с использованием совместимых сайтов SalI и XhoI на 5'-конце и 3'-конце продуктов PCR. С - конечный трансген содержит 3 транскрипционные единицы, которые экспрессируют 3 отдельных shРНК к целевым генам вируса гриппа А.

Фиг. 3 - плазмидная карта pStuffit (6151 п.о.). На карте имеют метку и заштрихованы 4 клонированных области куриного генома. Указаны сайты рестрикции клонирования, а также другие релевантные сайты рестрикции. Трансгены MWH вставлены в необычный сайт EcoRI, расположенный между ME1 200 и GRM5 200. Сайты фермента HindIII pIC20H могут использоваться для эксцизии всех трансгенов MWH, включая заполняющую/буферную фланкирующую последовательность в виде одиночного фрагмента для вставки в геном курицы.

Фиг. 4 - контрольное заражение вирусом гриппа трансгенных мышей. А - изменение массы в % у мышей, экспрессирующих shNP-1496, в сравнении с мышами, экспрессирующими shEGFP. В - относительная вирусная экспрессия гена у мышей, экспрессирующих shNP-1496, в сравнении с мышами, экспрессирующими shEGFP.

Указатель к списку последовательностей

SEQ ID NO: 1 - консенсусная нуклеотидная последовательность гена PB2 вируса гриппа А.
 SEQ ID NO: 2 - консенсусная нуклеотидная последовательность гена PB1 вируса гриппа А.
 SEQ ID NO: 3 - консенсусная нуклеотидная последовательность гена PA вируса гриппа А.
 SEQ ID NO: 4 - консенсусная нуклеотидная последовательность гена NP вируса гриппа А.
 SEQ ID NO: 5 - консенсусная нуклеотидная последовательность гена M1 вируса гриппа А.
 SEQ ID NO: 6-15 - нуклеотидная последовательность молекул нуклеиновой кислоты, которые нацелены на гены вируса гриппа А и/или кодируемую ими мРНК.

SEQ ID NO: 16 - нуклеотидная последовательность MWH1 и последовательности наполнителей. Наполнитель 5' (нуклеотиды 1-1748); CU6-3 shMP-592 (нуклеотиды 1759-2234); cU6-1 shPA-2087 (нуклеотиды 2235-2622); CU6-4 shNP-1496 (нуклеотиды 2623-2974); наполнитель 3' (нуклеотиды 2985-4745).

SEQ ID NO: 17 - нуклеотидная последовательность MWH2 и последовательности наполнителей. Наполнитель 5' (нуклеотиды 1-1748); CU6-4 shPB1-2257 (нуклеотиды 1774-2125); cU6-1 shPB2-2240 (нуклеотиды 2126-2513); c7SK shPB1-129 (нуклеотиды 2514-2911); наполнитель 3' (нуклеотиды 2936-4696).

SEQ ID NO: 18 - нуклеотидная последовательность MWH3 и последовательности наполнителей.

Наполнитель 5' (нуклеотиды 1-1748); CU6-4 shNP-1484 (нуклеотиды 1774-2129); cU6-1 shPA-2087 (нуклеотиды 2130-2517); c7SK shPB1-2257 (нуклеотиды 2518-2917); наполнитель 3' (нуклеотиды 2947-4702).

SEQ ID NO: 19 - нуклеотидная последовательность MWH1.

SEQ ID NO: 20 - нуклеотидная последовательность MWH2.

SEQ ID NO: 21 - нуклеотидная последовательность MWH3.

SEQ ID NO: 22 - нуклеотидная последовательность куриного промотора U6-1 (cU6-1).

SEQ ID NO: 23 - нуклеотидная последовательность куриного промотора U6-3 (cU6-3).

SEQ ID NO: 24 - нуклеотидная последовательность куриного промотора U6-4 (cU6-4).

SEQ ID NO: 25 - нуклеотидная последовательность куриного промотора 7SK.

SEQ ID NO: 26-51 - олигонуклеотидные праймеры.

SEQ ID NO: 52-54 - нуклеотидные последовательности молекул нуклеиновой кислоты, которые нацелены на гены вируса гриппа А, и/или мРНК, кодируемую ими.

SEQ ID NO: 55-60 - олигонуклеотидные праймеры.

SEQ ID NO: 61 - нуклеотидная последовательность MWH4.

SEQ ID NO: 62 - нуклеотидная последовательность MWH3 и транспозона To12.

SEQ ID NO: 63 - нуклеотидная последовательность MWH4 и транспозона To12.

Подробное описание изобретения

Общие методики и выбранные определения.

Если нет конкретных указаний, то все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют те же значения, которые понятны среднему специалисту в данной области (например, в области клеточных культур, молекулярной генетики, вирусологии, иммунологии, иммуногистохимии, белковой химии и биохимии).

Если нет конкретных указаний, то методики молекулярной биологии, вирусологии, клеточной культуры и иммунологии, используемые в настоящем изобретении, представляют собой стандартные процедуры, хорошо известные специалистам в данной области. Такие методики описаны и объяснены в литературе в таких источниках, как J. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991), D.M. Glover and B.D. Hames (editors), *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes 1-4, IRL Press (1995 and 1996), and F.M. Ausubel et al. (editors), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, включая все усовершенствования до настоящего времени), Ed Harlow and David Lane (editors) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), and J.E. Coligan et al. (editors) *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (включая все усовершенствования до настоящего времени) и включены в настоящее описание путем ссылки.

Используемые в настоящем описании термины "лечение", "лечить" или "обработка" включают введение терапевтически эффективного количества конструкции нуклеиновой кислоты, вектора, клетки и/или молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению, достаточного для снижения или устранения по меньшей мере одного симптома инфекции вирусом гриппа А, в частности инфекции вирусом птичьего гриппа.

Термин "профилактика" относится к защите индивида, подвергающегося воздействию вируса гриппа А, от развития по меньшей мере одного симптома инфекции вирусом гриппа А, или снижения тяжести симптома инфекции у индивида, подвергающегося воздействию вируса гриппа А.

Как используется в настоящем изобретении, у животного, "резистентного" к вирусному патогену, отмечают уменьшение или отсутствие симптомов заболевания по сравнению с восприимчивым животным, при воздействии вирусного патогена, например при воздействии вируса гриппа.

Используемый в настоящем описании термин "птичий" относится к любому виду, подвиду или породе организма таксономического класса Aves (птицы), такие как, но ими не ограничиваясь, курица, индюшка, утка, гусь, перепел, фазаны, попугаи, вьюрки, соколы, вороны и бескилевые птицы, включая страуса, эму и казуара. Этот термин включает различные известные линии Gallus gallus (куры), например белые леггорны, коричневые леггорны, полосатые, сассекские, ньюхэмпширские, родайлендские, австралорпские, корнишские, миноркские, амрокские, калифорнийские серые, итальянские оранжевые, а также линии индюшек, фазанов, перепелов, уток, страусов и другой домашней птицы, разводимой в промышленных количествах.

Термин "домашняя птица" включают всех птиц, содержащихся, разводимых или одомашненных для получения мяса или яиц, например кур, индюшек, страусов, диких кур, голубей, цесарок, фазанов, перепелов, уток, гусей и эму.

Используемый в настоящем описании термин "вирус птичьего гриппа" относится к любому вирусу гриппа А, который может инфицировать птиц. Примеры вирусов птичьего гриппа включают, но ими не ограничиваются, любые один или несколько из подтипов H1-H16 и N1-N9 и включают высокопатогенные и низкопатогенные штаммы. В одном из вариантов осуществления вирус птичьего гриппа относится к подтипу H5. В другом варианте осуществления вирус птичьего гриппа относится к подтипу H7. В другом варианте осуществления вирус птичьего гриппа относится к подтипу H5N1.

Термин "полипептид вируса гриппа А" относится к любому белку, который кодируется геном вируса гриппа А, например PB1, PB1-F2, PB2, полимеразе PA (PA), гемагглютиниину (HA), нуклеокапсидному белку (NP), нейраминидазе (NA), матричному белку 1 (M1), матричному белку 2 (M2), неструктурному белку 1 (NS1) и неструктурному белку 2 (NS2).

Используемый в настоящем описании термин "репликация вируса" относится к амплификации вирусного генома в клетке-хозяине.

Под используемым в настоящем описании термином "частица вируса" следует понимать всю структуру вируса, содержащую нуклеиновую кислоту, окруженную белковой капсулой или капсидом. Некоторые частицы вируса также включают гликопротеиновую оболочку, окружающую белковую капсулу, и в этом случае термин "частица вируса" также включает оболочку вируса. "Инфекционная частица вируса" способна проникать в клетку организма и реплицироваться в ней.

Под термином "снижает экспрессию" или "снижение экспрессии" полипептида или гена подразумевается, что происходит супрессия регуляции или ингибирование трансляции полипептидной последовательности и/или транскрипции нуклеотидной последовательности. Степень супрессии регуляции или ингибирования применяют в зависимости от природы и количества конструкции нуклеиновой кислоты или молекул нуклеиновой кислоты, введенных клетке-хозяину, идентичности, природы и уровня молекулы (молекул) РНК, экспрессированных из конструкции, времени после введения и т.д., но очевидно, например, в виде выявляемого уменьшения экспрессии белка гена-мишени и/или связанной мишени, или клеточной функции, или, например, уменьшения уровня вирусной репликации и т.д.; желательно, степень ингибирования составляет более чем 10, 33, 50, 75, 90, 95 или 99% по сравнению с клеткой, не обработанной в соответствии с настоящим изобретением.

Используемый в настоящем описании термин "индивид" относится к животному, например птице или млекопитающему. В одном из вариантов осуществления индивидом является человек. В других вариантах осуществления индивидом может быть птица, например домашняя птица, такая как курица, индюшка или утка.

"Образец" относится к материалу, предположительно содержащему конструкцию нуклеиновой кислоты, молекулы нуклеиновой кислоты, векторы и/или клетки по изобретению. Образец может быть взят непосредственно из источника или после по меньшей мере одной стадии (частичной) очистки. Образец может быть получен в любой подходящей среде, которая не мешает проведению способа по изобретению. Обычно образец представляет собой водный раствор или биологическую жидкость, как более подробно описано ниже. Образец может быть получен из любого источника, такого как физиологическая жидкость, включая кровь, сыворотку, плазму, слюну, мокроту, жидкость глазных линз, потовую жидкость, фекалии, мочу, молоко, асцитическую жидкость, слизь, синовиальную жидкость, жидкость брюшной полости, трансдермальные экссудаты, глоточные экссудаты, бронхоальвеолярный лаваж, трахеальные аспирации, спинномозговую жидкость, семенную жидкость, слизь шейки матки, выделения из влагалища или уретры, амниотическую жидкость и т.п. В одном из вариантов осуществления образец представляет собой кровь или ее фракцию. Предварительная обработка может включать, например, получение плазмы из крови, разбавление вязкой жидкости и т.п. Способы обработки могут включать фильтрацию, перегонку, сепарацию, концентрацию, инактивацию мешающих компонентов и добавление реагентов. Выбор и предварительная обработка биологических образцов перед тестированием хорошо известны в данной области и не требуют дополнительного описания.

Используемый в настоящем описании термин "транспозон" относится к генетическому элементу, который может двигаться (смещаться) из одного положения в другое в пределах генома организма способами, которые не требуют ни обширной гомологии последовательностей ДНК между транспозоном и сайтом вставки, ни рекомбинационных ферментов для классического гомологичного кроссинговера.

Используемый в настоящем описании термин "изогенные" относится к организмам или клеткам, которые характеризуются, по существу, идентичной геномной ДНК, например геномная ДНК по меньшей мере примерно на 92%, предпочтительно по меньшей мере примерно на 98%, наиболее предпочтительно по меньшей мере примерно на 99% идентична геномной ДНК изогенного организма или клетки.

Используемый в настоящем описании термин "введение, внедрение", относящийся к конструкции нуклеиновой кислоты или молекуле нуклеиновой кислоты, следует понимать в самом широком возможном смысле, и он включает любой способ, приводящий к получению конструкции нуклеиновой кислоты или молекулы нуклеиновой кислоты, присутствующих в клетке или организме. Например, конструкция нуклеиновой кислоты или молекула нуклеиновой кислоты могут быть доставлены в клетку в виде депротенизированной ДНК посредством любой подходящей методики трансфекции или трансформации, такой как, например, электропорация. Альтернативно, конструкция нуклеиновой кислоты или молекула нуклеиновой кислоты могут быть вставлены в геном и/или экспрессированы трансгеном в клетке.

Интерференция РНК.

Термины "интерференция РНК", "РНКi" или "получение молчащего гена" относятся, как правило, к способу, при котором молекула двунитовой РНК подавляет экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты, с которой молекула двунитовой РНК имеет существенную или полную гомологию. Однако позднее было показано, что интерференции РНК можно достичь с использованием двунитовых молекул,

не являющихся молекулами РНК (см., например, заявку на патент США 20070004667).

Настоящее изобретение включает молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие и/или кодирующие двунитевые области для интерференции РНК. Молекулы нуклеиновой кислоты обычно представляют собой РНК, но могут содержать химически модифицированные нуклеотиды и нуклеотиды.

Двунитевые области должны представлять собой по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов, например примерно 19-23 нуклеотида, или могут быть длиннее, например 30 или 50 нуклеотидов или 100 нуклеотидов или более. Может использоваться полноразмерная последовательность, соответствующая всему транскрипту гена. Предпочтительно двунитевые области имеют длину от примерно 19 до примерно 23 нуклеотидов.

Степень идентичности двунитевой области молекулы нуклеиновой кислоты с транскриптом-мишенью должна составлять по меньшей мере 90%, а еще более предпочтительно 95-100%. Молекула нуклеиновой кислоты может, конечно, содержать несвязанные последовательности, которые могут функционировать для стабилизации молекулы.

Используемый в настоящем описании термин "короткая интерферирующая РНК" или "siРНК" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая содержит рибонуклеотид, способный ингибировать или подавляюще регулировать экспрессию гена, например, путем опосредования РНКi специфическим для последовательности образом, где двунитевая часть имеет длину менее чем 50 нуклеотидов, предпочтительно длину от примерно 19 до примерно 23 нуклеотидов. Например, siРНК может представлять собой молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую аутокомплементарные смысловые и антисмысловые области, где антисмысловая область содержит нуклеотидную последовательность, которая комплементарна нуклеотидной последовательности в молекуле-мишени нуклеиновой кислоты или ее части, и смысловую область, имеющую нуклеотидную последовательность, соответствующую молекуле-мишени нуклеиновой кислоты или ее части. siРНК может быть собрана из двух отдельных олигонуклеотидов, где одна нить представляет собой смысловую нить, а другая представляет собой антисмысловую нить, где антисмысловая и смысловая нити являются аутокомплементарными.

Используемый в настоящем описании термин "siРНК" эквивалентен другим терминам, используемым для описания молекул нуклеиновой кислоты, которые способны опосредовать специфическую для последовательности РНКi, например микро-РНК (miРНК), короткую "шпильку" РНК (shРНК), короткий интерферирующий олигонуклеотид, короткую интерферирующую нуклеиновую кислоту (siNA), короткий интерферирующий модифицированный олигонуклеотид, химически модифицированную siРНК, посттранскрипционную вызывающую молчание гена РНК (ptgsРНК) и др. Кроме того, используемый в настоящем описании термин РНКi эквивалентен другим терминам, используемым для описания специфической для последовательности интерференции РНК, такой как посттранскрипционный вызов молчания гена, транскрипционное ингибирование или эпигенетика. Например, молекулы siРНК по изобретению могут использоваться для эпигенетически молчащих генов или на посттранскрипционном уровне или на претранскрипционном уровне. В неограничивающем примере, эпигенетическая регуляция экспрессии гена молекулами siРНК по изобретению может происходить в результате опосредованной siРНК модификации структуры хроматина для изменения экспрессии гена.

Под "shРНК" или "короткой "шпилькой" РНК" подразумевается молекула РНК, в которой менее чем примерно 50 нуклеотидов, предпочтительно от примерно 19 до примерно 23 нуклеотидов, спарены основаниями с комплементарной последовательностью, расположенной на той же молекуле РНК, и где указанная последовательность и комплементарная последовательность разделены неспаренной областью по меньшей мере от примерно 4 до примерно 15 нуклеотидов, которая образует одонитевую петлю над стволовой структурой, созданной двумя областями комплементарности оснований. Пример последовательности одонитевой петли включает 5' UUCAAGAGA 3'.

Встроенные shРНК представляют собой двойные или двупальцевые и многопальцевые "шпильки" dsРНК, в которых молекула РНК содержит две или более таких стволо-петельных структур, разделенных одонитевыми спейсерными областями.

После конструирования молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие двунитевую область, можно получать любым способом, известным в данной области, например транскрипцией *in vitro*, рекомбинантно или синтетическим средством.

Модификации или аналоги нуклеотидов могут быть введены для улучшения свойств молекул нуклеиновой кислоты по изобретению. Улучшенные свойства включают повышенную устойчивость к нуклеазе и/или повышенную способность проникать через клеточные мембраны. Соответственно, термины "молекула нуклеиновой кислоты" и "молекула двунитевой РНК" включают синтетически модифицированные основания, такие как, но ими не ограничиваются, инозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил-, 2-пропил- и другие алкиладенины, 5-галоидурацил, 5-галоидцитозан, 6-азацитозин и 6-азатимин, псевдоурацил, 4-тиоурацил, 8-галоидаденин, 8-аминоаденин, 8-тиоладенин, 8-тиоалкиладенины, 8-гидроксиладенин и другие 8-замещенные аденины, 8-галоидгуанины, 8-аминогуанин, 8-тиолгуанин, 8-тиоалкилгуанины, 8-гидроксилгуанин и другие замещенные гуанины, другие аза- и деазааденины, другие аза- и деазагуанины, 5-трифторметилурацил и 5-трифторцитозин.

Нуклеиновые кислоты.

Под "выделенной молекулой нуклеиновой кислоты" понимают молекулу нуклеиновой кислоты, которая, по существу, была отделена от нуклеотидных последовательностей, с которыми она связана, или связана в своем природном состоянии (если оно вообще существует в природе). Предпочтительно выделенная молекула нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 60% лишена, еще более предпочтительно по меньшей мере на 75% лишена, а еще более предпочтительно по меньшей мере на 90% лишена других компонентов, с которыми она природно связана. Кроме того, термин "молекула нуклеиновой кислоты" в настоящем описании используется взаимозаменяемо с термином "полинуклеотид".

Термин "экзогенная" в контексте нуклеиновой кислоты относится к нуклеиновой кислоте (включая конструкцию нуклеиновой кислоты по изобретению), когда она присутствует в клетке, или в бесклеточной экспрессионной системе, в измененном количестве, по сравнению с ее природным состоянием. В особенно предпочтительном варианте осуществления клетка представляет собой клетку, которая в природе не содержит нуклеиновую кислоту или конструкцию нуклеиновой кислоты.

Термины "молекула нуклеиновой кислоты" или "полинуклеотид" относятся к олигонуклеотиду, полинуклеотиду или любому их фрагменту. Это может быть ДНК или РНК геномного или синтетического происхождения и комбинируется с углеводородом, липидами, белком или другими материалами для реализации конкретной активности, определенной в настоящем описании.

Процент идентичности молекулы нуклеиновой кислоты определяется анализом GAP (Needleman and Wunsch, 1970) (программа GCG) со штрафом за пропуск = 5 и штрафом за удлинение = 0,3. Исследуемая последовательность имеет длину по меньшей мере 19 нуклеотидов, и анализ GAP выравнивает две последовательности по области по меньшей мере 19 нуклеотидов. Альтернативно, исследуемая последовательность имеет длину по меньшей мере 150 нуклеотидов, и анализ GAP выравнивает две последовательности по области по меньшей мере 150 нуклеотидов. Альтернативно, исследуемая последовательность имеет длину по меньшей мере 300 нуклеотидов, и анализ GAP выравнивает две последовательности по области по меньшей мере 300 нуклеотидов. Предпочтительно две последовательности выравнивают по всей их длине.

В отношении определенных молекул нуклеиновой кислоты, следует понимать, что величины % идентичности, превышающие указанные выше, включают предпочтительные варианты осуществления. Таким образом, если это применимо, в свете величин минимального % идентичности предпочтительно, чтобы молекула нуклеиновой кислоты содержала нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 91%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 92%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 93%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 94%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 96%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 97%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 98%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 99%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 99,1%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 99,2%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 99,3%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 99,4%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 99,5%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 99,6%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 99,7%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 99,8%, а наиболее предпочтительно по меньшей мере на 99,9% идентична релевантной номинированной SEQ ID NO.

Молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению может селективно гибридизироваться с полинуклеотидом, который кодирует полипептид вируса гриппа А в жестких условиях. Используемые в настоящем описании жесткие условия представляют собой условия, при которых (1) используется низкая ионная сила и высокая температура для промывания, например 0,015M NaCl/0,0015M цитрат натрия/0,1% NaDodSO₄ при 50°C; (2) используется во время гибридизации денатурирующий агент, такой как формамид, например 50% (об./об.) формамид с 0,1% бычьим сывороточным альбумином, 0,1% фиколлом, 0,1% поливинилпирролидоном, буфером 5,0 mM фосфата натрия при pH 6,5 с 750 mM NaCl, 75 mM цитрата натрия при 42°C, или (3) используется 50% формамид, 5×SSC (0,75M NaCl, 0,075M цитрата натрия), 50 mM фосфата натрия (pH 6,8), 0,1% пирогосфат натрия, 5 × раствора Denhardt, ДНК обработанной ультразвуком спермы лосося (50 г/мл), 0,1% SDS и 1,0% декстран сульфат при 42°C в 0,2×SSC и 0,1% SDS.

Молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут, по сравнению с природными молекулами, иметь области (например, природные промоторы), которые имеют одну или несколько мутаций, которые представляют собой делеции, вставки или замещения нуклеотидных остатков. Мутанты могут быть либо природными (т.е. выделенными из природного источника), либо синтетическими (например, полученными выполнением направленного на сайт мутагенеза на нуклеиновой кислоте, как описано выше). Таким образом, очевидно, что полинуклеотиды по изобретению могут быть либо природными, либо рекомбинантными.

Обычно мономеры нуклеиновой кислоты связаны связями сложного фосфодиэфира или его аналогов с образованием олигонуклеотидов в диапазоне размера от относительно коротких мономерных единиц, например 12-18, до нескольких сотен мономерных единиц. Аналоги связей сложного фосфодиэфира

включают фосфортиоат, фосфордитиоат, фосфорселеноат, фосфордиселеноат, фосфоранилотиоат, фосфоранилидат, фосфорамидат.

Конструкции нуклеиновых кислот.

Используемый в настоящем описании термин "конструкция нуклеиновой кислоты" относится к любой молекуле нуклеиновой кислоты, которая кодирует молекулу двунитевой РНК, как определено в настоящем описании, и включает молекулу нуклеиновой кислоты в векторе, молекулу нуклеиновой кислоты, если она присутствует в клетке в виде молекулы внехромосомной нуклеиновой кислоты, и молекулу нуклеиновой кислоты, которая интегрирована в геном. Обычно конструкция нуклеиновой кислоты представляет собой двунитевую ДНК или двунитевую РНК или их комбинацию. Кроме того, конструкция нуклеиновой кислоты обычно содержит подходящий промотор, функционально связанный с открытой рамкой считывания, кодирующей двунитевую РНК. Конструкция нуклеиновой кислоты может содержать первую рамку считывания, кодирующую первую одну нить молекулы двунитевой РНК, причем комплементарная (вторая) нить кодируется второй открытой рамкой считывания другой, или предпочтительно той же конструкцией нуклеиновой кислоты. Конструкция нуклеиновой кислоты может представлять собой линейный фрагмент или циркулярную молекулу, и она может или не может быть способна к репликации. Специалисту в данной области будет понятно, что конструкция нуклеиновой кислоты по изобретению может быть включена внутрь подходящего вектора. Трансфекция или трансформация конструкции нуклеиновой кислоты в клетку-реципиент обеспечивает возможность клетке экспрессировать молекулу РНК, кодируемую конструкцией нуклеиновой кислоты.

Конструкция нуклеиновой кислоты по изобретению может экспрессировать его множественные копии и/или одна или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5 или более) включают множественные различные молекулы РНК, содержащие двунитевую область, например короткую "шпильку" РНК. Молекулы РНК, рассматриваемые как "такие же", как каждая другая из тех, которые содержат только такую же двунитевую последовательность, и молекулы РНК, рассматриваемые как "отличные" друг от друга, будут содержать другие двунитевые последовательности, независимо от того, будут ли последовательности, предполагаемые быть мишенями каждой другой двунитевой последовательности, в пределах одного и того же или другого гена, или последовательностями двух различных генов.

Конструкция нуклеиновой кислоты может также содержать дополнительные генетические элементы. Типы элементов, которые могут быть включены в конструкцию, никоим образом не ограничиваются и могут быть выбраны специалистом в данной области. В некоторых вариантах осуществления конструкцию нуклеиновой кислоты вводят в клетку-хозяин как трансген. В таких случаях может быть желательно введение в эту конструкцию "вспомогательных" фрагментов, которые предназначены для защиты последовательностей, кодирующих молекулу РНК, от процесса вставки трансгена и для снижения риска считывания внешней транскрипции. Вспомогательные фрагменты могут также быть включены в конструкцию для увеличения расстояния между, например, промотором и кодирующей последовательностью и/или компонентом терминатора. Длина фрагмента вспомогательной последовательности может составлять любую длину от 5 до 5000 или более нуклеотидов. Между промоторами может быть один или несколько вспомогательных фрагментов. В случае множественных вспомогательных фрагментов их длина может быть одинаковой или различной. Вспомогательные фрагменты ДНК предпочтительно представляют собой различные последовательности.

Предпочтительно вспомогательные последовательности содержат последовательность, идентичную последовательности, обнаруживаемой внутри клетки, или ее потомства, в которые они были вставлены. В других вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты содержит вспомогательные области, фланкирующие открытую рамку(и) считывания, кодирующие одну или несколько двунитевых РНК.

Альтернативно, конструкция нуклеиновой кислоты может включать элемент, способный к перемещению, например транспозон, характеризуемый концевыми, инвертированными последовательностями повторов, фланкирующий открытые рамки считывания, кодирующий одну или несколько двунитевых РНК. Примеры подходящих транспозонов включают Tol2, мини-Tol, "Sleeping Beauty", Mariner and Galuhop.

Другие примеры дополнительного генетического элемента, которые могут быть включены в конструкцию нуклеиновой кислоты, включают ген-репортер, такой как один или несколько генов для флуоресцентного маркерного белка, такого как GFP или RFP; легко анализируемый фермент, такой как β -галактозидаза, люцифераза, β -глюкуронидаза, хлорамфеникол ацетилтрансфераза или секретируемая эмбриональная щелочная фосфатаза; или белки, для которых общедоступны иммуноанализы, такие как гормоны или цитокины. Другие генетические элементы, которые могут найти применение в вариантах осуществления настоящего изобретения, включают те, которые кодируют белки, придающие клеткам селективное преимущество роста, такие как аденозиндеаминаза, аминокликолевая фосфотрансфераза, дигидрофолатредуктаза, гигромицин-B-фосфотрансфераза, или устойчивость к лекарственным средствам.

Если конструкция нуклеиновой кислоты трансфецируется животному, то желательно, чтобы промотор и любые дополнительные генетические элементы состояли из нуклеотидных последовательностей,

которые встречаются в природе в геноме животного. Кроме того, желательно, чтобы последовательности, кодирующие молекулы РНК, состояли из последовательностей вируса гриппа А.

Промоторы.

Используемый в настоящем описании термин "промотор" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая способна направлять транскрипцию функционально связанной молекулы нуклеиновой кислоты, и включает, например, промоторы РНК полимеразы II и РНК полимеразы III. В это определение также включены те транскрипционные регуляторные элементы (например, усилители), которые достаточны для придания регулируемости зависимой от промотора экспрессии гена специфичным для типа клетки, специфичным для ткани или специфичным для времени образом, или которые являются индуцируемыми внешними агентами или сигналами.

Если конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая промотор, трансфецирована в животное-хозяин, то желательно, чтобы промотор был тем, который встречается в природе в геноме животного. Например, когда трансгенное животное представляет собой курицу, то промотор представляет собой предпочтительно куриный промотор; когда трансгенное животное представляет собой индюшку, то промотор представляет собой предпочтительно индюшачий промотор; и когда трансгенное животное представляет собой утку, то промотор представляет собой предпочтительно утиный промотор.

Используемый в настоящем описании термин "функционально связанный" относится к функциональной связи между двумя или более сегментами нуклеиновых кислот (например, ДНК). Обычно он относится к функциональной связи транскрипционного регуляторного элемента с транскрибированной последовательностью. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, такой как открытая рамка считывания, кодирующая определенную в настоящем описании молекулу двунитевой РНК, если она стимулирует или модулирует транскрипцию кодирующей последовательности в соответствующей клетке. Как правило, транскрипционные регуляторные элементы промотора, которые функционально связаны с транскрибированной последовательностью, являются физически смежными с транскрибированной последовательностью, т.е. они являются цис-действующими. Однако некоторые транскрипционные регуляторные элементы, такие как усилители, не должны быть физически смежными или расположенными в непосредственной близости к кодирующим последовательностям, чью транскрипцию они усиливают.

Под терминами "промотор РНК полимеразы III", или "промотор РНК pol III", или "промотор полимеразы III", или "промотор pol III" подразумевают промотор любого беспозвоночного, позвоночного или млекопитающего, например курицы, человека, мыши, свиньи, коровы, примата, обезьяны и т.д., который в своем естественном контексте в клетке ассоциируется или взаимодействует с РНК полимеразой III для транскрипции ее функционально связанного гена или любого его варианта, природного или полученного методами геной инженерии, который взаимодействует с выбранной клеткой-хозяином с РНК полимеразой III для транскрипции функционально связанной последовательности нуклеиновой кислоты. Под промотором U6 (например, куриным U6, человеческим U6, мышинным U6) промотором H1 или промотором 7SK подразумевается промотор любого беспозвоночного, позвоночного или млекопитающего или полиморфный вариант или мутант, который, как обнаруживается в природе, взаимодействует с РНК полимеразой III для транскрипции его родственного по женской линии продукта РНК, т.е. соответственно U6 РНК, H1 РНК или 7SK РНК. Примеры подходящих промоторов включают cU6-1 (SEQ ID NO: 22), cU6-3 (SEQ ID NO: 23), cU6-4 (SEQ ID NO: 24) и c7SK (SEQ ID NO: 25).

Предпочтительно при некоторых вариантах применения используются промоторы РНК pol III типа III, включая U6, H1 и 7SK, которые существуют в области, фланкирующей 5', и включают ТАТА-блоки и лишены внутренних промоторных последовательностей. Внутренние промоторы встречаются для pol III 5S рРНК, тРНК или VA РНК генов. Ген 7SK pol РНК III содержит слабый внутренний промотор и последовательность в области, фланкирующей 5' гена, необходимого для транскрипции. Промоторы pol III для использования в конструкции нуклеиновой кислоты для конкретного применения, например для экспрессии молекул двунитевой РНК, таких как "шпильки" РНК против птичьего или человеческого вируса, могут быть преимущественно выбраны для оптимального связывания и транскрипции РНК полимеразы III клетки-хозяина, например, включая птичий промоторы pol III в конструкции экспрессии, предназначенной для транскрипции множества "шпилек" dsРНК против птичьего вируса, такого как вирус птичьего гриппа (H5N1) в птичьих клетках-хозяевах.

Под "различными" промоторами полимеразы подразумеваются любые два промотора РНК полимеразы, такие как промоторы РНК полимеразы II или РНК полимеразы III, включая варианты, такие как их полиморфизмы и мутанты, которые в определенном виде запускат транскрипцию различных родственных по материнской линии транскриптов, таких как, например, человеческий промотор 7SK, человеческий промотор U6 и человеческий промотор H1, которые считаются тремя "различными" промоторами полимеразы. "Различные" промоторы полимеразы также относятся к отдельным членам семейства промоторов, таких как, например, семейство куриных промоторов U6, в котором промоторы cU6-1, cU6-2, cU6-3 и/или cU6-4 считаются "различными" промоторами. Использование различных промоторов полимеразы в конструкциях по настоящему изобретению снижает возможность явлений внутри- и/или межмолекулярной рекомбинации, таких как перестройки или делеции.

В некоторых аспектах множественные копии "одного и того же" промотора РНК полимеразы II или РНК полимеразы III могут быть включены в конструкцию нуклеиновой кислоты по изобретению. В некоторых вариантах осуществления конструкции нуклеиновой кислоты по изобретению могут содержать множественные копии одного и того же промотора полимеразы без "другого" промотора полимеразы; например 3, 4, 5 или более промоторов U6, каждый из которых функционально связан с последовательностью, кодирующей молекулу РНК, такую как shРНК. Необязательно, в некоторых вариантах осуществления другие промоторы могут быть включены в дополнение к двум или более промоторам полимеразы, например один или несколько промоторов полимеразы I, один или несколько митохондриальных промоторов и т.д. В одном аспекте конструкция экспрессии, содержащая множественные промоторы полимеразы (2, 3, 4, 5 или более) подвергается манипуляциям генной инженерии для экспрессии множественных "шпилек" dsРНК или shРНК, и в этом случае могут использоваться 2, 3, 4, 5 или более копий одного и того же промотора полимеразы, независимо от того, включен ли также "другой" промотор РНК полимеразы или нет.

В некоторых случаях может также быть желательно, чтобы конструкция нуклеиновой кислоты содержала промотор, специфичный для ткани или специфичный для клетки. Термин "специфичный для ткани" применительно к промотору относится к промотору, который способен направлять селективную экспрессию представляющей интерес нуклеотидной последовательности на определенный тип ткани (например, легкие) при относительном отсутствии экспрессии той же представляющей интерес нуклеотидной последовательности в другом типе ткани (например, мозге). Такие специфичные для ткани промоторы включают такие промоторы как Ick, миогенин или *thyl*. Термин "специфичный для клетки" применительно к промотору относится к промотору, который способен направлять селективную экспрессию представляющей интерес нуклеотидной последовательности на определенный тип клетки при относительном отсутствии экспрессии той же представляющей интерес нуклеотидной последовательности в другом типе клетки в пределах той же ткани (см., например, Higashibata, et al. (2004); Hoggatt, et al. (2002); Sohal, et al., (2001); и Zhang, et al., (2004)). Термин "специфичный для клетки" применительно к промотору также означает промотор, способный содействовать селективной экспрессии представляющей интерес нуклеотидной последовательности в области в пределах одной ткани. Альтернативно, промоторы могут быть конститутивными или регулируемыми. Кроме того, промоторы могут быть модифицированы так, чтобы иметь различные специфичности.

Амплификация нуклеиновой кислоты.

"Полимеразная реакция синтеза цепи" (PCR) представляет собой реакцию, при которой получают копии репликатов полинуклеотида-мишени с использованием "пар праймеров" или "набора праймеров", состоящие из праймера "выше по ходу транскрипции" и "ниже по ходу транскрипции", и катализатора полимеризации, такого как ДНК полимеразы, и обычно термически устойчивого фермента полимеразы. Способы PCR известны в данной области, и о них идет речь, например, в "PCR" (Ed. M.J. McPherson and S.G. Moller (2000) BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford). PCR может выполняться на кДНК, полученной в результате обратной транскрипции мРНК, выделенной из биологических образцов.

Праймер часто представляет собой олигонуклеотид, как правило, длиной примерно 20 нуклеотидов, при минимуме примерно 15 нуклеотидов, который способен гибридизоваться специфичным для последовательности типом с последовательностью-мишенью и растягиваться во время PCR. В качестве праймера могут также использоваться более длинные молекулы нуклеиновой кислоты, например молекулы нуклеиновой кислоты длиной по меньшей мере 50, или 100, или более нуклеотидов. Ампликоны или продукты PCR или фрагменты или продукты амплификации PCR представляют собой продукты растягивания, которые содержат праймер и вновь синтезированные копии последовательностей-мишеней.

Мультиплексные системы PCR содержат множественные наборы праймеров, что приводит к одновременной продукции более чем одного ампликона. Праймеры могут быть совершенным образом подобраны для соответствия последовательностям-мишеням, или они могут содержать внутренние ошибочно спаренные основания, что может привести к введению рестрикционного фермента или сайтов распознавания/расщепления каталитической нуклеиновой кислоты в специфичные последовательности-мишени. Праймеры могут также содержать дополнительные последовательности и/или модифицированные или меченые нуклеотиды для содействия захвату или выявлению ампликонов. Повторные циклы тепловой денатурации ДНК, отжиг праймеров в их комплементарные последовательности и растягивание праймеров полимеразой после отжига приводят к экспоненциальной амплификации последовательности-мишени.

Термины "мишень", или "последовательность-мишень", или "матрица" относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, которые являются амплифицируемыми.

Другой методикой амплификации нуклеиновых кислот является обратная транскрипция-полимеразная реакция синтеза цепи (RT-PCR). Во-первых, комплементарную ДНК (кДНК) получают из матрицы РНК с использованием фермента обратной транскриптазы, а затем выполняется PCR на полученной кДНК.

Другим способом амплификации является лигазная реакция синтеза цепи (LCR), раскрытая в EP 0320308. При LCR получают 2 пары комплементарных зондов, и в присутствии последовательности-

мишени каждая пара связывается с противоположными комплементарными нитями мишени так, что они примыкают друг к другу. В присутствии лигазы две пары зондов свяжутся для образования одной единицы. Путем циклического изменения температуры, как при PCR, связанные лигированные единицы диссоциируются от мишени и затем служат в качестве "последовательностей-мишеней" для лигирования избыточных пар зондов. В патенте США № 4883750 описан способ, аналогичный LCR, для связывания пар зондов с последовательностью-мишенью.

Другие способы амплификации молекул нуклеиновой кислоты известны специалистам в данной области и включают способы изотермической амплификации и системы амплификации на основе транскрипции. Любой подходящий способ амплификации конструкции нуклеиновой кислоты или его фрагмента или выделенной или экзогенной молекулы нуклеиновой кислоты или ее фрагмента может использоваться в способах по настоящему изобретению.

Векторы и клетки-хозяева.

В некоторых случаях может быть желательна вставка конструкции нуклеиновой кислоты и/или молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению в вектор. Вектор может представлять собой, например, плазмиду, вирус или искусственную хромосому, полученную, например, из бактериофага, аденовируса, аденоассоциированного вируса, ретровируса, поксвируса или герпесвируса. Такие векторы включают хромосомные, эписомные и полученные из вируса векторы, например векторы, полученные из бактериальных плазмид, бактериофагов, дрожжевых эписом, дрожжевых хромосомных элементов и вирусов, векторы, полученные из их комбинаций, такие как векторы, полученные из плазмиды и генетических элементов бактериофага, космид и фагемидов. Таким образом, один иллюстративный вектор представляет собой вектор фага двунитевой ДНК. Другой иллюстративный вектор представляет собой вирусный вектор двунитевой ДНК.

Вектор, в который вставлена конструкция нуклеиновой кислоты, может также включать перемещаемый элемент, например транспозон, характеризуемый концевыми инвертированными последовательностями повторов, фланкирующими открытые рамки считывания, кодирующие одну или несколько двунитевых РНК. Примеры подходящих транспозонов включают Tol2, мини-Tol2, "Sleeping Beauty", Mariner and Galluho. Ссылка на транспозон Tol2 в настоящем описании включает транспозон, полученный из Tol2, такой как мини-Tol2.

Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, в которую была введена конструкция нуклеиновой кислоты, молекула нуклеиновой кислоты и/или вектор по настоящему изобретению. Клетку-хозяин по настоящему изобретению можно использовать, например, в качестве производственной системы для получения или экспрессии молекулы dsРНК. Для получения *in vitro* могут использоваться эукариотические клетки или прокариотические клетки.

Подходящие для использования эукариотические клетки-хозяева могут представлять собой животные, растительные или грибковые клетки. В качестве клеток животных могут использоваться клетки млекопитающих, такие как CHO, COS, 3T3, DF1, CEF, миеломы MDCK, почек детеныша хомячка (BHK), HeLa или клеток Vero, клеток амфибий, таких как ооциты Xenopus, или клетки насекомых, такие как клетки Sf9, Sf21 или Tn5. Могут также использоваться клетки CHO, не имеющие гена DHFR (dhfr-CHO) или CHO K-1. Вектор может быть введен в клетку-хозяин, например, способом с использованием фосфата кальция, способом с использованием DEAE-декстрана, способом с использованием катионной липосомы DOTAP (Boehringer Mannheim), электропорацией, липофекцией и т.д.

Подходящие для использования прокариотические клетки включают бактериальные клетки, такие как E.coli, например JM109, DH5a и HB101, или Bacillus subtilis.

Для клеток животных может использоваться культуральная среда, такая как DMEM, MEM, RPMI1640 или IMDM. Культуральная среда может использоваться с добавкой сыворотки, такой как фетальная телячья сыворотка (FCS), или без нее. pH культуральной среды составляет предпочтительно примерно от 6 до 8. Клетки обычно культивируются при примерно 30-40°C в течение примерно 15-200 ч, и культуральная среда может при необходимости замещаться, аэрироваться или перемешиваться.

Трансгенные животные, исключая человека.

Термин "трансгенное животное, исключая человека", относится к животному, исключая человека, которое содержит конструкцию нуклеиновой кислоты (трансген), не обнаруживаемую у животного дикого типа того же вида или породы. Указанный в настоящем описании "трансген" имеет обычное значение в области биотехнологии и включает генетическую последовательность, которая была получена или изменена технологией рекомбинантной ДНК или РНК и которая была введена в клетку животного, предпочтительно птицы. Трансген может включать генетические последовательности, полученные из клетки животного. Обычно трансген вводится животному манипуляцией человека, такой как, например, трансформация, но может использоваться любой способ, как известно специалисту в данной области. Трансген включает генетические последовательности, которые вводятся в хромосому, а также те, которые являются внехромосомными.

Методики для получения трансгенных животных хорошо известны в данной области. Полезным руководством по этому предмету является Houdebine, Transgenic animals - Generation and Use (Harwood Academic, 1997).

Гетерологичная ДНК может вводиться, например, в оплодотворенную яйцеклетку. Например, тотипотентные или плюрипотентные стволовые клетки могут быть трансформированы микроинъекцией, осаждением, опосредованным фосфатом кальция, слиянием липосом, ретровирусной инфекцией или другими средствами, трансформированные клетки затем вводятся в эмбрион, и эмбрион затем развивается в трансгенное животное. В одном способе развивающиеся эмбрионы инфицируются ретровирусом, содержащим желательную ДНК, и трансгенные животные получают из инфицированного эмбриона. Однако в альтернативном способе соответствующие ДНК совместно инъецируются в пронуклеус или цитоплазму эмбрионов предпочтительно на одной клеточной стадии, и эмбрионам предоставляется возможность развиваться в зрелых трансгенных животных.

Другой способ, используемый для получения трансгенного животного, включает микроинъекцию стандартными способами нуклеиновой кислоты в яйцеклетки на пронуклеарной стадии. Затем инъецированные яйцеклетки культивируются перед переносом в яйцеводы ложно беременных реципиентов.

Трансгенные животные могут также быть получены технологией ядерного переноса. С использованием этого способа фибробласты от животных-доноров устойчиво трансфецируются плазмидой, включающей кодирующие последовательности, для домена связывания или связывания представляющего интерес партнера под контролем регуляторных последовательностей. Затем устойчивые трансфектанты сливаются с энуклеированными ооцитами, культивируются и переносятся в самок-реципиентов.

Опосредованный спермой перенос гена (SMGT) представляет собой другой способ, который может использоваться для генерирования трансгенных животных. Этот способ был впервые описан Lavitrano et al. (1989).

Другой способ получения трансгенных животных представляет собой технологию основанного на линкере опосредованного спермой переноса гена (LB-SMGT). Эта процедура описана в патенте США № 7067308. Вкратце, свежесобранная сперма промывается и инкубируется с мышинным моноклональным антителом tAbC (секретируемым гибридомой с присвоенным номером доступа в ATCC PTA-6723) и затем ДНК конструкции. Моноклональное антитело содействует связыванию ДНК со спермой. Затем проводится искусственное осеменение самок комплексом спермы/ДНК.

Трансгенные куры зародышевой линии могут быть получены инъекцией ретровируса с дефектной репликацией в подзародышевую полость куриных бластомер в свежееотложенные яйца (патент США № 5162215; Bosselman et al., 1989; Thoraval et al., 1995). Ретровирусная нуклеиновая кислота, несущая инородный ген, беспорядочно вставляется в хромосому эмбриональных клеток, генерируя трансгенных животных, некоторые из которых несут трансген в их зародышевой линии. Было описано применение изоляторных элементов, вставленных в 5'-области или 3'-области конструкции гибридного гена, для преодоления воздействий положения в сайте вставки (China et al., 1993).

Другой способ генерирования трансгенных животных зародышевой линии осуществляется использованием транспозона, например транспозона Tol2, для интеграции конструкции нуклеиновой кислоты по изобретению в геном животного. Транспозон Tol2, который был впервые выделен из рыбы медака *Oryzias latipes*, и относится к семейству hAT транспозонов, описан в публикации Koga et al. (1996) and Kawakami et al. (2000). Мини-Tol2 представляет собой вариант Tol2 и описан в публикации Balciunas et al. (2006). Транспозоны Tol2 и мини-Tol2 облегчают интеграцию трансгена в геном организма при совместном действии с Tol2 транспозазы. Путем доставки Tol2 транспозазы на отдельной не реплицирующейся плазмиде только транспозон Tol2 или мини-Tol2 и трансген интегрирован в геном, и плаزمида, содержащая Tol2 транспозазу, утрачивается в пределах ограниченного числа клеточных делений. Таким образом, интегрированный транспозон Tol2 или мини-Tol2 больше не имеет способности подвергаться последующему явлению транспозиции. Кроме того, поскольку Tol2, как известно, не является природным птичьим транспозоном, в клетке птицы, например в куриной клетке, то эндогенная активность транспозазы для вызова дальнейших явлений транспозиции отсутствует.

В способах по настоящему изобретению может использоваться любая другая подходящая система транспозона. Например, система транспозона может представлять собой систему транспозона "Sleeping Beauty", "Frog Prince" или MosI, или может использоваться любой транспозон, относящийся к семейству tc1/mariner или hAT транспозонов.

Инъекция птичьих эмбриональных стволовых клеток в эмбрионы реципиентов для получения химерных птиц описана в патенте США № 7145057. Выведение полученной химеры дает трансгенных птиц, чей геном состоит из экзогенной ДНК.

Способы получения трансгенных кур из долгосрочных культур птичьих примордиальных зародышевых клеток (PGC) описаны в заявке на патент США 20060206952. При комбинировании с птичьим эмбрионом-хозяином известными процедурами эти модифицированные PGC переносятся по зародышевой линии для получения трансгенного потомства.

Вирусная система доставки на основе любого соответствующего вируса может использоваться для доставки конструкции нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению в клетку. Кроме того, могут использоваться гибридные вирусные системы. Выбор вирусной системы доставки зависит от различных параметров, таких как эффективность доставки в клетку, ткань или орган, представляющие интерес, эффективность трансдукции системы, патогенность, иммунологические аспекты и опасения токсичности и

тому подобных. Ясно, что нет одной вирусной системы, которая подходит для всех видов применения. При выборе вирусной системы доставки для использования в настоящем изобретении важно выбрать систему, где вирусные частицы, содержащие конструкцию нуклеиновой кислоты, предпочтительно 1) воспроизводимо и устойчиво распространяются; 2) способны очищаться до высоких титров и 3) способны опосредовать нацеленную доставку (доставку конструкции экспрессии нуклеиновой кислоты в клетку, ткань или орган, представляющие интерес, без широкораспространенной диссеминации).

Композиции и введение.

В предпочтительном варианте осуществления композиция по изобретению представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую подходящий носитель. Подходящие фармацевтические носители, эксципиенты и/или разбавители включают, но ими не ограничиваются, лактозу, сахарозу, порошок крахмала, порошок талька, сложные эфиры алкановых кислот целлюлозы, стеарат магния, оксид магния, кристаллическую целлюлозу, метилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, желатин, глицерин, альгинат натрия, антибактериальные средства, противогрибковые средства, гуммиарабик, аравийскую камедь, соли натрия и калия фосфорной и серной кислот, поливинилпирролидон и/или поливиниловый спирт, солевой раствор и воду.

В некоторых вариантах осуществления конструкция(и) нуклеиновой кислоты и/или молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению образуют комплексы с одним или несколькими катионными липидами или катионными амфифилами, такие как композиции, раскрытые в патентах США № 4897355; 5264618 или 5459127. В других вариантах осуществления они образуют комплексы с липосомой/липосомной композицией, которая включает катионный липид и, необязательно, включает другой компонент, такой как нейтральный липид (см., например, патенты США № 5279833; 5283185 и 5932241). В других вариантах осуществления они образуют комплексы с многофункциональными молекулярными комплексами по патентам США № 5837533; 6127170 и 6379965 или, желательнее, многофункциональными молекулярными комплексами или масляно/водными катионными амфифильными эмульсиями по WO 03/093449. В последней заявке речь идет о композиции, которая включает нуклеиновую кислоту, эндосомолитический спермин, который включает холестерин или жирную кислоту, и нацеливающий спермин, который включает лиганд для молекулы клеточной поверхности. Соотношение между положительным и отрицательным зарядом композиции составляет от 0,1 до 2,0, предпочтительно 0,5 и 1,5 включительно; эндосомолитический спермин составляет по меньшей мере 20% содержащих спермин молекул в композиции; и нацеливающий спермин составляет по меньшей мере 10% содержащих спермин молекул в композиции. Желательно, чтобы соотношение между положительным и отрицательным зарядом композиции составляло от 0,8 до 1,2 включительно, например от 0,8 до 0,9 включительно.

Введение конструкции нуклеиновой кислоты, молекулы и/или композиции нуклеиновой кислоты может подходящим образом достигаться инъекцией в куриное яйцо и, как правило, инъекцией в воздушный мешок. Несмотря на то, что воздушный мешок является предпочтительным путем введения *in ovo*, другие области, такие как желточный мешок или аллантоисная жидкость хориона, также могут инокулироваться инъекцией. Частота вылупления из яиц может немного снизиться, когда воздушный мешок не является мишенью для введения, хотя необязательно на промышленно приемлемых уровнях. Механизм инъекции не имеет решающего значения для осуществления настоящего изобретения, хотя предпочтительно, чтобы игла не вызывала ненужного повреждения яйца или тканей и органов развивающегося эмбриона или внеэмбриональных мембран, окружающих эмбрион.

Как правило, шприц для подкожных инъекций, снабженный иглой приблизительно 22 калибра, подходит для введения в птичье яйцо. Способ по настоящему изобретению особенно хорошо приспособлен для использования с автоматизированным инъекционным устройством, таким как устройства, описанные в патентах США № 4903635; 5056464; 5136979 и заявке на патент США US 20060075973.

В другом варианте осуществления конструкция нуклеиновой кислоты, молекула и/или композиция нуклеиновой кислоты вводится посредством легочной доставки, например ингаляцией высушенного состава в виде аэрозоля или спрея. Например, аэрозоль может вводиться ингаляционным устройством или распылителем (см., например, патент США № 4501729), обеспечивающими быстрое местное поглощение молекул нуклеиновой кислоты в соответствующие легочные ткани. Твердые композиции в форме частиц, содержащих вдыхаемые сухие частицы микронизированных композиций нуклеиновой кислоты, могут быть получены помолом высушенных или лиофилизированных композиций нуклеиновой кислоты и затем пропусканием микронизированной композиции, например, через сито 400 меш для разрушения или отделения больших агломератов. Твердая композиция в форме частиц, содержащая композиции нуклеиновой кислоты по изобретению, может, необязательно, содержать диспергент, который служит для содействия образованию аэрозоля, а также терапевтических соединений. Подходящим диспергентом является лактоза, которая может смешиваться с соединением нуклеиновой кислоты в любом подходящем соотношении, например в соотношении 1 к 1 по массе.

Распылители представляют собой выпускаемые промышленностью устройства, которые преобразуют растворы или суспензии активного ингредиента в туман терапевтического аэрозоля или посредством ускорения сжатого газа, обычно воздуха или кислорода, через узкое отверстие Вентури или посредством ультразвукового перемешивания. Подходящие составы для использования в распылителях содер-

жат активный ингредиент в жидком носителе в количестве до 40% мас./мас., предпочтительно менее чем 20% мас./мас. состава. Носитель представляет собой обычно воду или разбавленный водный спиртовой раствор, предпочтительно изготовленный изотоническим с биологическими жидкостями добавлением, например, хлорида натрия или других подходящих солей. Необязательные добавки включают консерванты, если состав не получен стерильным, например, метилгидроксibenзоат, антиоксиданты, ароматизаторы, летучие масла, забуферивающие агенты и эмульгаторы и другие поверхностно-активные вещества состава. Аэрозоли твердых частиц, содержащие активную композицию и поверхностно-активное вещество, могут быть аналогичным образом получены любым генератором аэрозоля твердых частиц. Генераторы аэрозоля для введения индивиду терапевтических средств в форме твердых частиц продуцируют частицы, которые могут вдыхаться, как объясняется выше, и генерируют объем аэрозоля, содержащий заданную отмеренную дозу терапевтической композиции со скоростью, подходящей для введения человеку.

Конструкция нуклеиновой кислоты, молекулы и/или композиция по изобретению может также добавляться в корм или питьевую воду животного. Может быть удобным составление композиции корма и питьевой воды так, чтобы животное принимало их в терапевтически целесообразном количестве вместе с его рационом. Может также быть удобным предоставление композиции в виде премикса для добавления в корм или питьевую воду.

Примеры

Пример 1. Выбор последовательностей shRNA для включения в трансгены.

Для нацеливания на РНКi были выбраны самые высококонсервативные гены, PB1, PB2, PA, NP и M1 вируса гриппа А. Авторы использовали siVirus (компьютерную программу на основе информации из интернета конструкции антивирусной siRNA для высокодивергентных вирусных последовательностей, Nai to et al., 2006) для идентификации высококонсервативных областей внутри выбранных генов, а также для прогнозирования последовательностей siRNA, скрининг которых может производиться для выбора shRNA. Эта компьютерная программа выявила ряд областей в пределах анализируемых геномных сегментов вируса гриппа А, которые представляли особый интерес для конструкции shRNA, а именно 3'-области PB1, PB2, PA и NP. Конкретнее, они представляли собой сегмент 1 (ген PB2), нуклеотиды 2240-2341; сегмент 2 (ген PB1), нуклеотиды 2257-2341; сегмент 3 (ген PA), нуклеотиды 2087-2233 и сегмент 5 (ген NP), нуклеотиды 1484-1565.

Авторы выбрали 29 прогнозируемых последовательностей siRNA из программы siVirus для скрининга с целью выбора shRNA (табл. 1). Имеются несколько алгоритмов для выбора потенциальных последовательностей siRNA для определенных генов-мишеней. Однако было показано, что многие из этих прогнозируемых siRNA эффективно не функционируют при получении из экспрессированных shRNA. Tachman et al. (2006), в частности сконструировали алгоритм для прогноза эффективных молекул shRNA, и авторы разработали свою собственную модификацию алгоритма для улучшения прогноза shRNA. Авторы применили модифицированный алгоритм Tachman к 29 shRNA, выбранным с использованием программы siVirus с тем, чтобы выбрать последовательности для тестирования в качестве shRNA для специфического ингибирования репликации вируса гриппа А.

Таблица 1

Алгоритм выбора последовательностей shPHK, нацеленных на гены вируса гриппа А

shRNA	Балльная оценка 5'-конца	ΔG центральная	Балльная оценка 3'-конца	A+T в 3'	Балльная оценка
PB1-6	1	-13.8	1	2	4
PB1-129	1	-12.7	-1	1	1
PB1-2257	1	-13.9	1	2	4
PB2-2210	1	-14.7	1	2	4
PB2-2240	1	-14.1	1	2	4
PB2-8	1	-11.8	1	1	3
PB2-10	-1	-12.2	1	1	1
PA-44	-1	-13.1	-1	2	0
PA-739	1	-10.9	-1	0	0
PA-2087	1	-13.6	1	0	2
PA-2110	-1	-17.2	1	2	2
PA-2131	-1	-12.6	-1	0	-2
NP-224	-1	-15.3	1	2	2
NP-231	-1	-12.8	-1	0	-2
NP-344	1	-13.4	1	2	4
NP-390	-1	-13.5	1	0	0
NP-771	1	-11.4	1	1	3
NP-778	-1	-13.3	1	1	1
NP-1472	1	-11.4	1	2	4
NP-1484	-1	-8.7	1	1	1
NP-1496	1	-8.7	-1	0	0
MP-37	1	-13.3	1	0	2
MP-331	1	-13.3	1	2	4
MP-480	1	-14	-1	0	0
MP-554	1	-12.0	1	2	4
MP-592	1	-13.4	1	1	3
MP-598	-1	-14.5	1	0	0
MP-934	1	-11	-1	0	0
MP-5	1	-10.8	1	2	4

Имеются 4 критерия для выбора shPHK с использованием алгоритма Тахман. 3 из критериев оценены в баллах из максимального числа 4 очка. Этими критериями являются 1) С или G на 5'-конце последовательности = 1 очко, А или Т на 5'-конце = -1 очко; 2) А или Т на 3'-конце = 1 очко; С или G на 3'-конце = -1 очко; 3) 5 или более А или Т в семи основаниях 3' = 2 очка; 4) А или Т в семи основаниях 3' = 1 очко. Предпочтительны последовательности shPHK с самыми высокими балльными оценками. Четвертый критерий основан на расчете свободной энергии 6 центральных оснований последовательности shPHK (основания 6-11 смысловой нити, гибридизированной с основаниями 9-14 антисмысловой нити) для 19-нуклеотидной последовательности. Предпочтительны shPHK с центральным дуплексом $\Delta G > -12,9$ ккал/моль. Модификация алгоритма Тахман авторами заключается в использовании других параметров свободной энергии для прогнозов устойчивости дуплекса РНК, как опубликовано Freier et al. (1986). На основании алгоритма авторы выбрали 13 последовательностей shPHK с использованием программы siVirus для применения в потенциально эффективных shPHK с целью тестирования их способности ингибировать репликацию вируса гриппа А. Выбранные последовательности выделены жирным шрифтом в табл. 1, а их последовательность 5'-3' показана в табл. 2. Эти 13 последовательностей использовали для построения плазмид ddPHKi для экспрессии 10 shPHK.

Таблица 2

Последовательность shPHK, выбранных для анализов ингибирования вируса

shRNA	Последовательность 5'-3'
PB1-129	CAGGAUACACCAUGGAUAC (SEQ ID NO:6)
PB1-2257	GAUCUGUCCACCAUUGAA (SEQ ID NO:7)
PB2-2240	CGGGACUCUAGCAUACUUA (SEQ ID NO:8)
PB2-8	CAGCGACCAAAAGAATTCGGA (SEQ ID NO:52)
PB2-10	AAGAATTCGGATGGCCATCAA (SEQ ID NO:53)
PA-2087	GCAAUUGAGGAGUGCCUGA (SEQ ID NO:9)
NP-771	CCAGGAAAUGCUGAGAUCGAA (SEQ ID NO:10)
NP-1472	GAGUAAUGAAGGAUCUUAUUU (SEQ ID NO:11)
NP-1484	AUCUUAUUUCUUCGGAGACAA (SEQ ID NO:12)
NP-1496	GGAUCUUAUUUCUUCGGAG (SEQ ID NO:13)
MP-554	CACUAAUCAGACAUGAGAA (SEQ ID NO:14)
MP-592	CUACAGCUAAGGCUAUGGA (SEQ ID NO:15)
MP-5	GTGGATTCTTGATCGTCTT (SEQ ID NO:54)

Пример 2. Куриные промоторные последовательности.

Известно, что при конструировании конструкции трансгена желательно включить промоторы, которые включают находящуюся выше по ходу транскрипции последовательность для обеспечения возможности эффективного прикрепления фермента полимеразы к промоторным последовательностям. Несмотря на это, куриные промоторы U6 были предназначены и тестированы для содержания минимального количества промоторной последовательности, требуемого для вызова транскрипции shPHK, таким образом, обеспечивая возможность уменьшения общего размера конструкции трансгена.

Два варианта конструкций, pcU6-4 shNP-1496 и pcU6-4 (+100) shNP-1496, тестировали для выявления экспрессии shPHK посредством анализов защиты РНКзы или на вызванное молчание вируса. Первая плазмида содержит минимальную куриную последовательность U6-4, требуемую для экспрессии короткой РНК-"шпильки" shNP-1496. Вторая плазмида содержит добавочную последовательность размером 100 п.о. выше по ходу транскрипции промотора cU6-4. Ожидалось, что вторая конструкция, содержащая добавочную последовательность размером 100 п.о., обеспечила бы лучшую экспрессию shPHK.

В табл. 3 представлены детали результатов эксперимента с анализом гемагглютинации (анализа ГА) для измерения ингибирования продукции вируса, вызванной экспрессией shPHK из обеих плазмид. Для проведения этого анализа клетки MDCK выращивали до логарифмической фазы и затем подвергали электропорации плазмидами shPHK с использованием прибора Amaxa Nucleofector. Затем трансфицированные клетки через 8 ч инфицировали низкопатогенным вирусом гриппа A H1N1 A/PR/8/34 (PR8) в диапазоне множественности инфекций (moi). Титр вируса (в единицах ГА) измеряли через 48 ч после инфекции выполнением анализов ГА. Анализы проводили в 96-луночной планшете с V-образным дном. Серийные двукратные разведения образцов вируса смешивали с равным объемом 0,5% суспензии (об./об.) куриных эритроцитов и инкубировали на льду в течение 1 ч. Лунки, содержащие прилипший однородный слой эритроцитов, оценивали в баллах как положительный результат.

В эксперименте с анализом ГА, pcU6-4 shNP-1496, содержащий минимальную промоторную последовательность, был более эффективен в вызове молчания вируса при всех тестируемых MOI, чем pcU6-4 (+100) shNP-1496, который содержал дополнительную промоторную последовательность выше по ходу транскрипции и ложную плазмиду.

Таблица 3

Результаты анализа гемагглютинации (анализа ГА)

	MOI .001	MOI .0001	MOI .00001
Ложная плазмида	32	32	16
pcU6-4 (+100) shNP-1496	32	16	4
pcU6-4 shNP-1496	4	2	2

Пример 3. Конструкция плазмид ddPHKi для экспрессии выбранных shPHK.

Промоторы куриной полимеразы III CU6-1 (номер доступа в GenBank DQ531567), cU6-3 (DQ531569), cU6-4 (DQ531570) и c7SK (EF488955) использовали в качестве матриц для конструкции плазмид экспрессии ddPHKi для выбранных shPHK, посредством одноэтапной PCR (фиг. 1). В PCR для конструкции плазмид использовался праймер TD135, спаренный с TD218 или TD275 для промотора cU6-1; TD175, спаренный, с TD216, TD274 или TD302 для промотора cU6-4; TD176, спаренный с TD217 для промотора cU6-3; TD269, спаренный с TD307 или TD316 для промотора c7SK (последовательность праймера и детали определенной амплифицированной shPHK показаны в табл. 4). Обратные праймеры в каждой PCR были сконструированы для содержания последних 20 нуклеотидов каждой промоторной

последовательности, смысловой shPHK, петли и антисмысловой последовательности shPHK и были очищены ВЭЖХ. Амплифицированные продукты экспрессионной полноразмерной кассеты лигировали в pGEM-T Easy и затем проводили определение последовательностей.

Из выбранных 13 shPHK экспрессионные плазмиды были успешно сконструированы для 7 из последовательностей. Конечные экспрессионные плазмиды shPHK, использованные в анализах ингибирования вируса, были названы pcU6-1-shPB2-2240, pcU6-1-shPA-2087, pcU6-3-shMP-592, pcU6-4-shNP-1496, pcU6-4-shNP-1484, pc7SK-shPB1-129, pcU6-4-shPB1-2257 и pc7SK-shPB1-2257. Также конструировали не относящуюся к cU6-1 контрольную плазмиду и использовали для ложного сравнения в анализах ингибирования вируса (см. ниже). Для этой ложной плазмиды прямой праймер TD135 спаривали с обратным праймером TD155, содержащим последние 20 нуклеотидов промотора chU6-11 и всех других нерелевантных компонентов shPHK (shlrr). Продукт PCR лигировали в pGEM-T Easy и затем проводили определение последовательностей.

Каждую плазмиду ddPHK конструировали так, что начало каждой последовательности shPHK находилось в положении +1 нативных транскриптов U6 или 7SK snPHK. Сайт рестрикционного фермента XhoI создавали методом генной инженерии ниже по ходу транскрипции от сигнала терминации для обеспечения возможности скрининга для выявления продуктов полноразмерной snPHK, вставленных в pGEM-T Easy. Все конечные векторы экспрессии snPHK состояли из любого из куриных полноразмерных промоторов U6 или 7SK, смысловой последовательности snPHK, петельной последовательности, антисмысловой последовательности snPHK, концевой последовательности и сайта XhoI. Петельная последовательность, использованная во всех snPHK, представляла собой 5' UUCAAGAGA 3'.

Пример 4. Тестирование выбранных snPHK на ингибирование вируса.

В табл. 5 сведены результаты экспериментов с анализом гемагглютинации (анализом ГА) для измерения ингибирования продукции вируса, вызванной плазмидами экспрессии snPHK. Для проведения этих анализов клетки MDCK, выращивали до логарифмической фазы и затем подвергали электропорации плазмидами shPHK с использованием прибора Amaxa Nucleofector™. Затем трансфицированные клетки через 8 ч инфицировали вирусом гриппа А, или низкопатогенным H1N1 A/PR/8/34 (PR8), или высокопатогенным H5N1 A/куриный/вьетнамский/008/2004 (P5T1), в диапазоне множественности инфекций (moi). Титр вируса (в единицах ГА) измеряли через 48 ч после инфекции выполнением анализов ГА. Анализы проводили в 96-луночных планшетах с V-образным дном. Серийные двукратные разведения образцов вируса смешивали с равным объемом 0,5% суспензии (об./об.) куриных эритроцитов и инкубировали на льду в течение 1 ч. Лунки, содержащие прилипший однородный слой эритроцитов, оценивали в баллах как положительный результат.

Таблица 4

Последовательность и детали использованных праймеров		
Название	Последовательность 5'-3'	Локализация/признак
TD135	CGAAGAACCGAGCGCTGC (SEQ ID NO:26)	cU6-1
TD155	GGGCTCGAGTTCCAAAAAGCGCAGTGTACTCCACTTCTCTTGAAGTGGAGTAACACTGCGCTGAA TACCGCTCTCTCTGAG (SEQ ID NO:27)	cU6-1 shlrr
TD175	GAATTGTGGGACGGCGGAAG (SEQ ID NO:28)	cU6-4
TD176	CAGACAGACGTCAGGCTTTC (SEQ ID NO:29)	cU6-3
TD216	CTCGAGTCCAAAAAGGATCTTATTCTTCGGAGTCTCTTGAAGTCCGAAGAAATAAGATCCAAACCC CAGTGTCTCTCGGA (SEQ ID NO:30)	cU6-4 shNP-1496
TD217	CTCGAGTCCAAAAACACTACAGCTAAGGCTATGGAGCAAATTCTCTTGAATTTGCTCCATAGCCTT AGCTGTAGTGGACTAAGAGCATCGAGACTG (SEQ ID NO:31)	cU6-3 shMP-592
TD218	CTCGAGTCCAAAAAGCAATTGAGGAGTGCCTGATCTCTTGAATCAGGCACTCTCAATTGCGAATA TCTCTACCTCTAGG (SEQ ID NO:32)	cU6-1 shPA-2087
TD232	GTCGACCGAAGAACCGAGCGCTGC (SEQ ID NO:33)	TD135 + Sall
TD233	GTCGACGAATTGTGGGACGGCGGAAG (SEQ ID NO:34)	TD175 + Sall
TD234	GTCGACGACAGACGTCAGGCTTTC (SEQ ID NO:35)	TD176 + Sall
TD269	GAGGCTCAGTGTACGCGAGA (SEQ ID NO:36)	c7SK
TD274	CTCGAGTCCAAAAAGATCTGTCCACCATGAATCTCTTGAATTCATGGTGAACAGATCAAACCC CAGTGTCTCTCGGA (SEQ ID NO:37)	cU6-4 shPB1-2257
TD275	CTCGAGTCCAAAAACGGGACTCTAGCATACTTATCTCTTGAATAAGTATGCTAGAGTCCCGGAATAT CTCTACCTCTAGG (SEQ ID NO:38)	cU6-1 shPB2-2240
TD302	CTCGAGTCCAAAAAATCTTATTCTTCGGAGACAATCTCTTGAATTTGCTCCGAAGAAATAAGATAAA CCCCAGTGTCTCTCGGA (SEQ ID NO:39)	cU6-4 shNP-1484
TD306	GTCGACGAGGCTCAGTGTACGCGAG (SEQ ID NO:40)	TD269 + Sall
TD307	CTCGAGTCCAAAAACAGGATACACCATGGTACTCTCTTGAAGTATCCATGGTGTATCTCGAAGGCT ACGAGCTGCCCAA (SEQ ID NO:41)	c7SK shPB1-129
TD316	CTCGAGTCCAAAAAGATCTGTTCCACCATGAATCTCTTGAATTCATGGTGAACAGATCAAAGCT ACGAGCTGCCCAA (SEQ ID NO:42)	c7SK shPB1-2257
TD343	CTCGAGTCCAAAAAATCTTATTCTTCGGAGACAATCTCTTGAATTTGCTCCGAAGAAATAAGATGA CTAAGAGCATCGAGACTG (SEQ ID NO:51)	cU6-3 shNP-1484

Во всех экспериментах с анализом ГА, суммированных в табл. 5, плазмиды, экспрессирующие shPB1-2257, shNP-1484 и shNP-1496, были способны очень эффективно ингибировать продукцию и PR8, и H5N1 вирусов по сравнению с ложной плазмидой. В случае shPB1-2257 и shNP-1484 они были способны полностью ингибировать репликацию обоих вирусов в ряде экспериментов, подтверждая их эффективность. Плазмиды, экспрессирующие shPA-2087 и shMP-592, также были способны эффективно ингибировать продукцию вирусов, но не так эффективно как shPB1-2257, shNP-1484 и shNP-1496. Молекула

shPB1-129 ингибировала продукцию низкопатогенного штамма PR8, но не ингибировала высокопатогенный штамм H5N1. Наконец, несмотря на первоначально идентифицированную в качестве потенциальной последовательности-мишени shPHK, shPB2-2240, была неспособна ингибировать репликацию любого из тестируемых вирусов.

Пример. 5. Конструкция трансгенов с Multi-Warhead (MWH).

Было определено, что существенную выгоду имеет экспрессия множества shPHK из одного трансгена для дальнейшего снижения риска вариативности вирусной последовательности-мишени для стратегии РНКi. Эти трансгены с Multi-Warhead (MWH) состоят из множественных транскрипционных единиц, каждой с другим куриным промотором pol III (cU6-1, cU6-3, cU6-4 и c7SK), экспрессирующим отдельные молекулы shPHK, нацеленной на консервативные последовательности описанных выше различных генов вируса гриппа А. Промоторные последовательности являются естественными для кур, и небольшие последовательности shPHK из 21 п.о. уже присутствовали бы у инфицированных А1 или вакцинированных птиц. Мишени РНКi являются абсолютно специфическими для вирусов гриппа А, и, таким образом, не было бы эффектов в виде промахов мишени при таком специфическом трансгене.

Были сконструированы 4 трансгена MWH из выбранных shPHK следующим образом.

а) MWH1 - cU6-3 shMP-592; cU6-1 shPA-2087; cU6-4 shNP-1496.

Каждый трансген MWH содержит 3 транскрипционные единицы, которые независимо экспрессируют одну молекулу shPHK из куриного промотора pol III. 3 отдельные транскрипционные единицы амплифицировали, используя одноэтапную PCR, и полученные фрагменты затем лигировали вместе для получения трансгена MWH (фиг. 2). Затем MWH может экспрессировать 3 отдельных shPHK из одного трансгена. Эти 3 транскрипционные единицы для MWH 1 представляют собой cU6-4 shNP-1496; cU6-3 shMP-592 и cU6-1 shPA-2087. Транскрипционную единицу cU6-4 shNP-1496 амплифицировали, используя прямой праймер TD233 и обратный праймер TD216, транскрипционную единицу cU6-3 shMP-592 амплифицировали, используя прямой праймер TD234 и обратный праймер TD217, и транскрипционную единицу cU6-1 shPA-2087 амплифицировали, используя прямой праймер TD232 и обратный праймер TD218 (детали праймеров описаны в табл. 4). Каждый из продуктов PCR клонировали в pGEM-T Easy, и каждый содержал рестрикционный ферментный сайт 5' SalI и рестрикционный ферментный сайт 3' SalI. Оба эти рестрикционных сайта имеют совместимые выступающие концы, которые обеспечивали возможность последовательного лигирования вместе отдельных транскрипционных единиц для получения конечного трансгена MWH (фиг. 2).

Таблица 5

Воздействия shPHK на продукцию вируса в клетках MDCK
Цифры в скобках представляют величины множественности инфекции (moi)

Эксперимент	Экспрессионная конструкция shPHK	Продукция вируса (титр в единицах ГА)							
		PR8 (0.1)	PR8 (0.01)	PR8 (0.001)	PR8 (0.0001)	PR8 (0.00001)	H5N1 (0.01)	H5N1 (0.001)	H5N1 (0.0001)
1	Ложная	512	256	64	16				
	pcU6-4 shNP-1484	256	128	16	4				
	pc7SK shPB1-2257	128	16	4	0				
	pcU6-4 shPB1-2257	128	32	4	0				
2	Ложная			256	128	128			
	pcU6-4 shNP-1496			64	32	8			
	pcU6-4 shNP-1484			32	16	2			
	pcU6-4 shPB1-2257			0	0	0			
	pcU6-1 shPB2-2240			256	128	128			
	pc7SK shPB1-129			128	64	32			
3	Ложная			64	128	64			
	pcU6-4 shNP-1496			32	8	2			
	pcU6-4 shNP-1484			0	0	0			
	pcU6-4 shPB1-2257			0	0	0			
	pcU6-1 shPA-2087			128	128	32			
	pcU6-3 shMP-592			128	32	32			
4	Ложная						64	16	4

	pcU6-4 shNP-1484					0	0	0
	pcU6-3 shNP-1484					0	0	0
	pcU6-4 shPB1-2257					0	0	0
5	Ложная					64	32	16
	pcU6-4 shNP-1496					2	2	2
	pcU6-4 shPB1-2257					0	0	0
	pc7SK shPB1-2257					8	16	16
6	Ложная		64	32	8			
	pcU6-4 shNP-1496		16	8	2			
	pcU6-1 shPA-2087		32	16	8			
	pcU6-3 shMP-592		32	8	4			
	pcU6-4 shPB1-2257		0	0	0			
7	Ложная					64	64	32
	pcU6-4 shNP-1496					8	2	0
	pcU6-1 shPA-2087					64	32	16
	pcU6-3 shMP-592					32	16	4
	pcU6-4 shPB1-2257					0	0	0
	pcU6-1 shPB2-2240					64	64	32
	pc7SK shPB1-129					64	64	32
8	Ложная					64	64	32
	MWN 1					32	16	8
	MWN 2					64	64	16
	MWN 3					8	8	4
	MWN 4					4	4	0

б) MWN2 - cU6-4 shPB1-2257; cU6-1 shPB2-2240; c7SK shPB1-129.

Эти 3 транскрипционные единицы для MWN 2 представляют собой cU6-4 shPB1-2257; cU6-1 shPB2-2240; и c7SK shPB1-129. Транскрипционную единицу cU6-4 shPB1-2257 амплифицировали, используя прямой праймер TD233 и обратный праймер TD274, транскрипционную единицу cU6-1 shPB2-2240 амплифицировали, используя прямой праймер TD232 и обратный праймер TD275, и транскрипционную единицу c7SK shPB1-129 амплифицировали, используя прямой праймер TD306 и обратный праймер TD307 (детали праймеров описаны в табл. 4). Каждый из продуктов PCR клонировали в pGEM-T Easy и последовательно лигировали для построения конечного трансгена MWN, как описано выше и на фиг. 2.

с) MWN3 - cU6-4 shNP-1484; cU6-1 shPA-2087; c7SK shPB1-2257.

Эти 3 транскрипционные единицы для MWN3 представляют собой: cU6-4 shNP-1484; cU6-1 shPA-2087 и c7SK shPB1-2257. Транскрипционную единицу cU6-4 shNP-1484 амплифицировали, используя прямой праймер TD233 и обратный праймер TD302, транскрипционную единицу cU6-1 shPA-2087 амплифицировали, используя прямой праймер TD232 и обратный праймер TD218 и транскрипционную единицу c7SK shPB1-2257 амплифицировали, используя прямой праймер TD306 и обратный праймер TD316 (детали праймеров описаны в табл. 4). Каждый из продуктов PCR снова клонировали в pGEM-T Easy и последовательно лигировали для построения конечного трансгена MWN, как описано выше и на фиг. 2.

д) MWN4 - cU6-4 shPB1-2257; cU6-3 shNP-1484; cU6-1 shPA-2087.

Эти 3 транскрипционные единицы для MWN4 представляют собой: cU6-4 shPB1-2257; cU6-3 shNP-1484 и cU6-1 shPA-2087. Транскрипционную единицу cU6-4 shPB1-2257 амплифицировали, используя прямой праймер TD233 и обратный праймер TD274, транскрипционную единицу cU6-3 shNP-1484 амплифицировали, используя прямой праймер TD234 и обратный праймер TD343, и транскрипционную единицу cU6-1 shPA-2087 амплифицировали, используя прямой праймер TD232 и обратный праймер TD218 (детали праймеров описаны в табл. 4). Каждый из продуктов PCR снова клонировали в pGEM-T Easy и последовательно лигировали для построения конечного трансгена MWN, как описано выше и на фиг. 2.

4 конечных трансгена MWN также тестировали на их способность ингибировать продукцию вируса в анализе ГА с использованием вируса гриппа А H5N1 (табл. 4, эксперимент 8). MWN 3 и 4 были наиболее эффективными трансгенами. MWN 1 также эффективно ингибировал продукцию вируса H5N1, тогда как MWN 2 не был таким эффективным как MWN 1.

Пример 6. Клонирование трансгенов MWN в вектор pStuffit.

Каждый MWN клонировали в плазмиду pStuffit (фиг. 3). Эта плазида содействует вставке трансгенов MWN между фрагментами наполнителя/буфера куриной геномной ДНК для потенциальной защиты последовательностей MWN и от процесса вставки трансгена, и от прочитанной внешней транскрипции. Фрагменты наполнителя ME1 и GRM5 были выбраны из больших интронных последовательностей из куриного генома (т.е. геномные "пустыни"), и они лишены транскрипционных элементов, которые могли

бы мешать экспрессии трансгена MWN. Определенные области, описанные в GenBank, представляют собой

ME1 1500 (chr3) gb|AADN02002420.1 30995-32489 п.о.;

ME1 200 (chr 3) gb|AADN02002420.1 5079-5276 п.о. и

GRM5 1500 (chr 1) gb|AADN02004814.1 13141-13113, 13078-12911, 12848-11638 п.о.;

GRM5 200 (chr 1) gb|AADN02004814.1 10126-9927 п.о.

Конструирование плазмиды pStuffit.

Плазмиду pStuffit конструировали клонированием четырех областей куриного генома в определенном порядке, продиктованном использованием рестрикционных ферментных сайтов, в вектор клонирования pIC20H (фиг. 3). Перечисленные в табл. 6 фрагменты сначала амплифицировали PCR, используя праймеры, перечисленные в табл. 7, а затем отдельно клонировали в pGEM-T Easy (Invitrogen) и определяли последовательности. Затем эти фрагменты подвергали эксцизии из pGEM-T Easy и последовательно клонировали, используя рестрикционные ферментные сайты, перечисленные в табл. 5. Во-первых, GRM5 200 клонировали в pIC20H, а затем в ME1 200, GRM5 1500 и ME1 1500. На каждой стадии клонирования полученную плазмиду проверяли переваром рестрикционного фермента и определением последовательностей ДНК. Конечная собранная плазмида была обозначена как pStuffit.

Таблица 6

Конструирование pStuffit
Обозначения клонированных фрагментов и праймеров, использованных при их амплификации

Название фрагмента	Праймеры	Ферментные сайты
GRM5 200	TD277 / TD278	<i>EcoRI</i> / <i>EcoRV</i>
ME1 200	TD281 / TD282	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>
GRM5 1500	TD279 / TD280	<i>EcoRV</i> / <i>XhoI</i>
ME1 1500	TD283 / TD284	<i>SphI</i> / <i>BamHI</i>

Таблица 7

Конструирование pStuffit
Обозначения и последовательность праймеров PCR. Подчеркнуты рестрикционные ферментные сайты

Название праймера	Последовательность праймера	Фермент клонирования
TD277	<u>GAA TTC</u> CAT ACC ACT GCG AGG GTG CCA AGT CAT GGG ACT GAT ACT C (SEQ ID NO:43)	<i>EcoRI</i>
TD278	GAT ATC TTA ATT AAC TGG AAG GTT GCA GTA AG (SEQ ID NO:44)	<i>EcoRV</i>
TD279	GAT ATC TTG TCC CTT CCA GGA ACA G (SEQ ID NO:45)	<i>EcoRV</i>
TD280	CTC GAG ATT TAA ATA GAT TGC AGC ACA AGG AG (SEQ ID NO:46)	<i>XhoI</i>
TD281	GGA TCC TTA ATT AAC TGG AAA CTA GGA CGT GGA AG (SEQ ID NO:47)	<i>BamHI</i>
TD282	GAA TTC CGA GAC CAT CCA CGT GCT GCT TAC TGC AGC TAC GTC GAA TG (SEQ ID NO:48)	<i>EcoRI</i>
TD283	GCA TGC ATT TAA ATG ACA GCA GCA GGT GAA AGA C (SEQ ID NO:49)	<i>SphI</i>
TD284	GGA TCC TCA AGT GGG TGC TCA GGA AG (SEQ ID NO:50)	<i>BamHI</i>

Вставка трансгенов MWN в pStuffit.

Вектор pStuffit имеет необычный рестрикционный сайт *EcoRI*, расположенный между последовательностями GRM5 200 и ME1 200 для обеспечения возможности вставки каждого трансгена MWN. Каждый трансген MWN был вставлен в pStuffit лигированием в этот рестрикционный сайт *EcoRI*. Были также включены *PacI* и *SwaI* для обеспечения возможности эксцизии конструкции с варьирующимися количествами фланкирующей последовательности (фиг. 3). Рестрикционные ферментные сайты *HindIII* вектора pIC20H могут использоваться для эксцизии всей клонированной последовательности. Поэтому конечные плазмиды pStuffit, содержащие каждую из вставок MWN, переваривали рестрикционным ферментом *HindIII* для высвобождения конечной вставки для очистки и использования для опосредованного спермой процесса переноса гена (SMGT).

Пример 7. Основанный на линкере опосредованный спермой перенос гена.

Процесс доставки конструкции в оплодотворенную куриную яйцеклетку может достигаться основанным на линкере опосредованным спермой переносом гена. Эта процедура проводится, как описано в патенте США № 7067308. Вкратце, свежесобранную куриную сперму промывают и инкубируют с мышиным моноклональным антителом mAbC (секретируемым гибридомой с присвоенным номером доступа в ATCC PTA-6723) и затем с конструкцией ДНК. Добавленное моноклональное антитело содействует

связыванию ДНК со спермой. Затем куры искусственно осеменяются комплексом спермы/ДНК. Процесс повторяют 4 раза с интервалом 72 ч между осеменениями. Яйца собирают ежедневно через интервал два дня после первого осеменения до 3 дней после конечного осеменения.

Пример 8. Вставка трансгенов MWH в Tol2 и доставка курам.

Трансгены MWH 3 (SEQ ID NO: 21) и MWH 4 (SEQ ID NO: 61) клонировали в вектор pmini-Tol2/MCS (SEQ ID NO: 64); Balciunas et al., 2006) транспозона Tol2. Оба трансгена удаляли из вектора pGEM-T Easy двойным перевариванием SalI и XhoI. Затем этот фрагмент лигировали в необычный сайт XhoI в пределах множественных клонирования вектора транспозона Tol2.

Процесс доставки конструкции MWH 3 Tol2 (SEQ ID NO: 62) и конструкции MWH 4 Tol2 (SEQ ID NO: 63) в куриный эмбрион может быть достигнут использованием примордиальных зародышевых клеток (PGC). Вкратце, PGC собирают из донорских куриных эмбрионов, или из крови, когда возраст эмбриона составляет 2 дня, или из гонад эмбриона в возрасте 5,5 дней. PGC очищают из крови или ткани гонад, используя магнитное антителное разделение клеток (MACS). Очищенные PGC затем подвергают электропорации конструкциями Tol2 и отдельной плазмидой, кодирующей транспозазу Tol2 (pCMV-Tol2; SEQ ID NO: 66; Balciunas et al., 2006), с использованием прибора Amaxa Nucleofector. Затем эти клетки инъецируют назад в эмбрион-реципиент в возрасте 2,5 дней. Трансформированные PGC мигрируют для формирования гонад развивающегося эмбриона.

Процесс доставки конструкций Tol2 в куриный эмбрион может также достигаться прямой электропорацией бластодермы свежеснесенных яиц. Вкратце, свежеснесенное оплодотворенное яйцо вскрывают для обнаружения бластодермы. В бластодерму инъецируют ДНК конструкции Tol2 вместе с плазмидой, кодирующей транспозазу Tol2, используя микрокапиллярную пипетку. Затем проводят электропорацию бластодермы in ovo, используя устройство для электропорации BTX ECM830 Electro Square Porator. PGC локализуются в центре бластодермы, и если эти клетки трансформированы конструкцией после электропорации, они будут продолжать становиться зародышевыми клетками внутри гонад развивающегося эмбриона.

Пример 9. Скрининг потомства поколения G0 для выявления трансгенов.

Небольшое количество крови берут или из вены крыла или из кончиков перьев однонедельного потомства поколения G0. Геномную ДНК получают из вены крыла, используя мининабор для анализа ДНК в крови QIAmp DNA Blood Mini kit (Qiagen). ДНК из крови кончиков перьев получают, используя раствор для экстракции ДНК QuickExtract™ DNA Extraction Solution (Epicentre Biotechnologies). Проводят два теста этих образцов для подтверждения присутствия конструкции.

Саузерн блоттинг.

PCR проводят на геномных образцах, используя прямые и обратные праймеры, перечисленные в табл. 8. Затем смесь PCR наносят на агарозный гель, переносят на мембрану и гибридизируют радиоактивно меченным зондом блокированной нуклеиновой кислоты (табл. 8). После гибридизации и промывания в растворе с высокой строгостью требований к его составу на мембрану воздействуют рентгеновской пленкой. На положительный результат указывает полоса правильного размера, выявляемая на итоговой ауторентгенограмме.

Таблица 8

Олигонуклеотиды, использованные в PCR анализе Саузерн блоттинга

Функция	Обозначение	Последовательность
Прямой праймер	TD320	TTG CCC CCA AAC AGC AA (SEQ ID NO:55)
Обратный праймер	TD321	GAC CAT CCA CGT GCT GCT TA (SEQ ID NO:56)
Зонд	TD319	CAT TCG ACG TAG CTG CA (SEQ ID NO:57)

Количественная PCR в реальном масштабе времени.

PCR в реальном масштабе времени проводят на геномных образцах, используя праймеры, перечисленные в табл. 9. В анализе используется связывание реагента SYBR Green с двунитевой ДНК и последующий анализ кривой плавления для определения положительного образца.

Таблица 9

Праймеры, использованные в анализе PCR в реальном масштабе времени

Функция	Обозначение	Последовательность
Прямой праймер	BC_F_03	GCA GCA CGT GGA TGG TCT C (SEQ ID NO:58)
Обратный праймер (промотор cU6-4)	TD251	TCT TCC GCC GTC CCA CAA TT (SEQ ID NO:59)
Обратный праймер (промотор cU6-3)	TD252	GCT TAG AAA GCC TGA CGT CT (SEQ ID NO:60)

Пример 10. Тестирование для выявления трансгенных птиц.
LB-SMGT.

Птица, идентифицированная в качестве трансгенной в популяции поколения G0, сохраняется и содержится до полового созревания. После полового созревания птица используется в экспериментах спаривания для генерирования трансгенного потомства поколения G1, которое имеет копию конструкции в каждой клетке. Саузерн блоттинг и PCR в реальном масштабе времени снова используются для демонстрации трансгенной природы потомства поколения G1.

Более детальный анализ с использованием геномных Саузерн блоттингов и PCR в отношении сайта вставки и числа копий конструкции проводится на этих птицах.

Птицы поколения G1, идентифицированные как обладающие релевантной вставкой конструкции, выращиваются до половой зрелости. Некоторые из потомства поколения G2 от этих птиц используются в испытаниях на животных для верификации их устойчивости к различным штаммам птичьего гриппа. Другие птицы поколения G2 анализируются для выявления экспрессии конструкции в различных тканях и в различные возрасты.

Транспозон Tol2.

Вылупляться будут эмбрионы поколения G0, которые получили или PGC, трансформированные Tol2, или были подвергнуты электропорации конструкцией Tol2. Содержатся и выращиваются до половой зрелости только самцы цыплят поколения G0. Сперму птиц собирают у самцов птиц, и PCR выполняют для подтверждения того, содержат ли птицы релевантную конструкцию. Птиц, которые дают положительный результат в отношении PCR, используют в экспериментах спаривания для генерирования трансгенного потомства поколения G1, которое имеет копию конструкции в каждой клетке. Снова используют Саузерн блоттинг и PCR в реальном масштабе времени для демонстрации трансгенной природы потомства поколения G1.

Пример 11. Модельная система - трансгенная мышь, устойчивая к гриппу А.

Авторы сконструировали 2 кассеты shPHK трансгена для генерирования трансгенных мышей. Каждая кассета содержала промотор U6 мыши для экспрессии или shNP-1496, или shEGFP. Затем оба трансгена использовали для генерирования трансгенных мышей с использованием лентивирусной технологии. Вкратце, кассеты shPHK трансгена shNP-1496 и shEGFP клонировали в вектор переноса лентивирусного гена (AusGene, Bentleigh, Australia). Затем трансгенные вирусные конструкции упаковывали в лентивирусные частицы. Определяли лентивирусные титры и лентивирусные частицы инъецировали в перивителлиновое пространство ранней стадии мышинных эмбрионов. Эмбрионы повторно имплантировали ложно беременным самкам мышей и проводили скрининг полученного потомства анализом Саузерн блоттинга. Получали трансгенных мышей-основателей, которые имели устойчивую интеграцию любого трансгена. Затем основателей спаривали с мышами дикого типа для генерирования потомства поколения F1. Затем трансгенных мышей поколения F1 тестировали в эксперименте с контрольным заражением для определения устойчивости к инфекции вирусом гриппа А.

В эксперимент с контрольным заражением были включены 3 группы, каждая из которых включала 5 мышей. Каждая из групп 1 и 2 включала 5 мышей с shPHK shNP-1496. Группа 3 включала 5 мышей с shPHK shEGFP. Группы 2 и 3 получали интраназальное контрольное заражение низкопатогенным вирусом гриппа А H1N1 A/PR/8/34 (PR8) в количестве 5×10^2 TCID₅₀. Контрольное заражение группы 1 проводили солевым раствором с фосфатным буфером (PBS) без вируса. Массу тела контролировали ежедневно в течение 10 дней после контрольного заражения и в конце эксперимента мышей умерщвляли и образцы легких брали для измерения вирусной РНК с использованием qPCR.

Как показано на фиг. 4, у трансгенных мышей с трансгеном shNP-1496 были превосходные уровни устойчивости к инфекции по сравнению с мышами с нерелевантным трансгеном shEGFP. Мыши shNP-1496 не теряли массу тела в ходе эксперимента при сравнении с контрольной группой, получавшей PBS. Мыши shEGFP проявили статистически значимое снижение массы тела, указывающее на активную инфекцию вирусом гриппа. При измерении содержания вирусной РНК в образцах легких от мышей в группах 2 и 3, у мышей с трансгеном shNP-1496 имелось уменьшение вирусной РНК более чем на 90% по сравнению с мышами, содержащими нерелевантный трансген shEGFP. Как правило, эти результаты ука-

зывают на то, что трансгенные мыши, содержащие молекулу shPHK, которая специфически нацелена на вирус гриппа А, такую как shNP-1496, высокоустойчивы к экспериментальному контрольному заражению вирусом гриппа А H1N1 A/PR/8/34 (PR8).

Специалистам в данной области будет понятно, что в изобретение, показанное в определенных вариантах осуществления, могут быть внесены многочисленные вариации и/или модификации без отхода от сущности или широкоописанного объема изобретения. Поэтому настоящие варианты осуществления следует рассматривать во всех отношениях как иллюстративные, а не ограничивающие.

Все публикации, обсужденные или указанные в ссылках, полностью включены в настоящее описание.

Настоящая заявка испрашивает приоритет заявки на патент США 60/938315 и заявки на патент Австралии 2007902616, полные содержания которых включены в настоящее описание путем ссылки.

Любое обсуждение документов, актов, материалов, устройств, изделий или тому подобного, которое было включено в настоящее описание, предназначено исключительно для цели обеспечения контекста для настоящего изобретения. Это не следует воспринимать как допущение того, что любой или все эти вопросы составляют часть основы предшествующего уровня техники или являются общеизвестными в области, релевантной настоящему изобретению, поскольку они существовали до даты приоритета каждого пункта формулы данной заявки.

Ссылки

- Balciunas et al. (2006) PLoS Genet. 10:e169.
- Bosselman et al. (1989) Science, 243:533-534.
- Chim et al. (1993) Cell, 74:504-514.
- Fire, et al. (1998) Nature, 391:806-811.
- Freier, et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA, 83:9373-7.
- Higashibata, et al. (2004) J Bone Miner Res, 19:78-88.
- Hoggatt, et al. (2002) Circ Res, 91:1151-59.
- Kawakami, et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA, 97:11403-11408.
- Ketting, et al. (1999) Cell, 99:133-141.
- Koga, et al. (1996) Nature, 383:30.
- Lavitrano, et al. (1989) Cell, 57:717-723.
- Love et al. (1994) Bio/Technology, 12:60-63.
- Naito et al. (2006) Nucleic Acids Res, Jul. 34 (WebServerIssue):W448-50.
- Needleman, S.B. and Wunsch, C.D. (1970) J Mol Biol, 48: 443-453.
- Nicholson, et al. (2005) Lancet, 362:1733-1745.
- Ratcliff, et al. (1999) Plant Cell, 11:1207-1216.
- Tabara, et al. (1999) Cell, 99:123-132.
- Taxman, et al. (2006) BMC Biotechnol, Jan 24, 6:7.
- Thoraval et al. (1995) Transgenic Research 4:369-36.
- Zamore, et al. (2000) Cell, 101:25-33.
- Zhang, et al. (2004) Genome Res 14:79-89.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая по меньшей мере три молекулы РНК, содержащие двунитевую область, где молекулы РНК снижают репликацию вируса гриппа А в клетке животного по сравнению с изогенной клеткой животного, инфицированной вирусом гриппа А, не имеющей молекул РНК, где двунитевые области содержат нуклеотидные последовательности, которые по меньшей мере на 95% идентичны нуклеотидной последовательности, выбранной из

- (i) SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 12,
- (ii) SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 15 и
- (iii) SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8.

2. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.1, где двунитевые области содержат нуклеотидные последовательности, которые по меньшей мере на 95% идентичны SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 12.

3. Композиция, содержащая три выделенных и/или экзогенных молекул нуклеиновой кислоты, где двунитевые области содержат последовательности нуклеотидов, которые по меньшей мере на 95% идентичны последовательностям, выбранным из

- (i) SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 12,
- (ii) SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 15 и
- (iii) SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8.

4. Композиция по п.3, где двунитевые области содержат последовательности нуклеотидов, которые по меньшей мере на 95% идентичны SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 12.

5. Вектор, содержащий конструкцию нуклеиновой кислоты по п.1 или 2.

6. Клетка, содержащая конструкцию нуклеиновой кислоты по п.1 или 2, композицию по п.3 или 4 и/или вектор по п.5.

7. Трансгенный организм, не являющийся организмом человека, содержащий конструкцию нуклеиновой кислоты по п.1 или 2, композицию по п.3 или 4, вектор по п.5 и/или клетку по п.6.

8. Трансгенный организм по п.7, который представляет собой курицу, индюшку или утку.

9. Композиция, содержащая конструкцию нуклеиновой кислоты по п.1 или 2, вектор по п.5 и/или клетку по п.6.

10. Способ лечения и/или профилактики инфекции индивидуума вирусом гриппа А, причем способ включает введение индивидууму конструкции нуклеиновой кислоты по п.1 или 2, композиции по п.3 или 4, вектора по п.5 и/или клетки по п.6.

11. Способ снижения экспрессии одного или нескольких генов вируса гриппа А в клетке, включающий введение в клетку композиции по п.3 или 4.

12. Применение конструкции нуклеиновой кислоты по п.1 или 2, композиции по п.3 или 4, вектора по п.5 и/или клетки по п.6 для получения лекарственного средства для лечения и/или профилактики инфекции вирусом гриппа А.

13. Способ идентификации животного, содержащего конструкцию нуклеиновой кислоты по п.1 или 2 или композицию по п.3 или 4, включающий определение присутствия или отсутствия конструкции по п.1 или 2 и/или композиции по п.3 или 4 в образце, полученном у животного.

14. Способ выведения устойчивого к гриппу трансгенного животного, отличного от человека, включающий:

- (i) введение конструкции нуклеиновой кислоты по п.1 или 2 в клетку животного,
- (ii) отбор трансгенной клетки, не являющейся клеткой человека, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты,
- (iii) регенерацию трансгенного животного, отличного от человека, из трансгенной клетки, не являющейся клеткой человека,
- (iv) выведение трансгенного животного, отличного от человека, для получения трансгенного потомства и

(v) отбор трансгенного потомства, которое устойчиво к гриппу.

15. Способ получения пищевого продукта, причем способ включает:

- (i) введение конструкции нуклеиновой кислоты по п.1 или 2 в клетку животного,
- (ii) выбор трансгенной клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты,
- (iii) регенерацию трансгенного животного из трансгенной клетки,
- (iv) выведение трансгенного животного для получения трансгенного потомства и
- (v) получение пищевого продукта из трансгенного потомства.

16. Способ получения трансгенного животного, отличного от человека, включающий:

- (i) введение в клетку первой нуклеиновой кислоты, содержащей транспозон, где нуклеиновая кислота содержит конструкцию нуклеиновой кислоты по п.1 или 2,
- (ii) введение в клетку второй нуклеиновой кислоты, кодирующей транспозазу,
- (iii) выбор трансгенной клетки, содержащей первую нуклеиновую кислоту в геноме клетки,
- (iv) регенерацию трансгенного животного, отличного от человека, из клетки и
- (v) выведение трансгенного животного.

17. Трансгенное животное, отличное от человека, устойчивое к гриппу, где указанное трансгенное животное содержит конструкцию нуклеиновой кислоты по п.1 или 2.

18. Применение трансгенного организма по пп.7, 8 или 17 для выведения и/или для производства пищевых продуктов.

Список последовательностей

<110>	МАТ МАЛЫТА ЭДВАНСТ ТЕКНОЛОДЖИЗ ЛИМИТЕД КОММОНВЕЛТ САЙЕНТИФИК ЭНД ИНДАСТРИАЛ РИСЕРЧ ОРГАНИЗАЦИИ	
<120>	Лечение и профилактика гриппа	
<130>	506962	
<150>	US 60/938,315	
<151>	2007-05-16	
<150>	AU 2007902616	
<151>	2007-05-16	
<160>	65	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	2341	
<212>	РНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	Консенсусная последовательность гена PB2 вируса гриппа А	
<400>	1	
agcraaagca ggucaaaauu auucaauaug gagaagaaua aagaauuamg agaucuaug	60	
ucacaguccc gcacucgcga gaucuaaca aaaaaccacug uggaccuauu ggccauaau	120	
aagaaauaca caucaggaag acaagagaag aaccucguc ucaagaugaa auggaugaug	180	
gcaaugaauu auccaauccac agcggacsaag agaaauauag agaugauucc ugaagggaau	240	
gaacaagggc agacgcucug gacgaagaca aaugaugcug gaucggacag ggugauggug	300	
ucuccccuag cuguaaucug guggaaucgg aauuggcccg cgaacauggc aguccauuu	360	
ccaaagguuu acaaaaacua cuugagaag guugaaggu uaaaacaugg aaccuucggu	420	
cccgucuuu uccgaaccca aguaaaaua cgcgcgcgag ugaauuaaa uccuggccau	480	
gcagauuca gugcuaaaga agcacaagu gucaucaugg agguccuuuu cccaauaga	540	
guvggagcua gaauauugac aucagagucg caauugacaa uaacgaaga gaaagaaga	600	
gagcuccaag auuuaagau ugcuccuuu augguugcau acauguuuga aagggaacug	660	
guccgcmeta ccagauuccu accgguagca ggcggaacaa gcaguguga cauugaggua	720	
uuucauuuga cucaagggac cugcugggaa cagauguaa cuccaggcgg agaugugaga	780	
aaugacgaug uugaccagaag uugaucauc gcugccaaga acauuguuag gagagcaacg	840	
guuacagcgg auccaucguc aucacugcug gagauguguc acagcacaca aaauuggugg	900	
auaaggauug uggacaucuu uaggcaaaau ccaaucagag aacaagcugu ggauuaucg	960	
aaagcagcaa uggugucgag gaucaguuu uccuuagcu uggagggcu cauuuacaa	1020	
agaaacaugg gaucuuccgu camgaaggaa gaggaaguc uacaggcaa ccccaacaa	1080	
uugaauuaa gaguacauga gggguauagag gaauucacaa ugguuaggcg gagggcaaca	1140	
gcuaucuga ggaaggcaac uagaaggcug auucaguuua uaguaagugg aagagacgaa	1200	
caaucaaucg cugaggcgaau cauuuagca augguuuucu cacaggagga uugcaugaua	1260	
aaaggcugucc gaggcgaucu gaauuucgua aacagagcaa accaaagauu aaaccccaug	1320	
caucaacucc ugaagacaauu ucaaaaggay gcaaaaguc uauuacagaa uuggggaaau	1380	
gaacccauug auaaugucau ggggaugauc ggaauuuac cugacaugac uccagcaca	1440	
gaauugucac ugaagagggu aagaguuagu aaaaugggag ugaugauua uccagcacu	1500	
gagagaguaug uuguaauguu ugacccuuu uaaaggguuc gagaucagcg ggggaacgua	1560	
cucuuaucuc ccgaagagggu cagcgaaacc cagggaacag agaaauugac aaauacauu	1620	
ucaucauaa ugauguggga aucaacggu ccugagucag ugcuuuuu aaccuaucaa	1680	
uggaucaua gaaacuggga gacugugaag auucaauugu cucaagacc caggaugcug	1740	
uacaauaaga uggaguuuua accguuccaa uccuugguac cyaagcugc cagaggucaa	1800	
uacaguggau uugugagaac auuuuuccaa caaaugcgug acguacuggg gacaauugau	1860	
acuguccaga uauaaaagcu gcuaaccauu gcagcagccc caccggagca gagcagaau	1920	
caguuuuuu cucaaacugu gaauugaga ggcuccaggaa ugaauuacu cguaggggc	1980	
aaucucccug uguucaaua caauaaggca accaaaaggc uaccguuuu uggaaaggac	2040	
gcaggugcau uaacagagga uccagauag gggcagcccg gaguggauc ugcagucug	2100	
aggggaauucy uauuucaggg caaggaggac aaaaagauug gaccagcauu gagcaucau	2160	
gaacugagca aucuugcga agggga meta gcuaauugc ugauagggca aggaagacug	2220	
guuguuguaa ugaaacgtaa accggacucu agcauacua cugacagcca gacagcgacc	2280	
aaaagaauuc ggauggccau cauuuagugu cgaauuuuu aaaaacgacc uguuuuac	2340	
w	2341	
<210>	2	
<211>	2341	
<212>	РНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	Консенсусная последовательность гена PB1 вируса гриппа А	
<400>	2	
agcgaagca ggcacacau ugaauaggau gucauucca cuuuacuuu cuugaagua	60	
ccagucmeta augcuuaag uaccacuuu ccuuuacug gagaccucc auacagccau	120	
ggaacaggga cagguaacac caugcacaca gucaacagaa caccacaua uucagaaaa	180	
ggaaugggga caacaaacac agagacugga gcccccaac ucaaccgcau ugauggacca	240	

cuaccugagg	auaaugagcc	cagugggau	gcacaaacg	auuguguuu	ggaagcaug	300
gcuuuccuug	aagaauccca	cccagggauc	uuugaaacu	cguugcuuga	aacgauggaa	360
auuguucaac	aaacaagagu	ggauaaacug	acccaagguc	gccagaccua	ugacuggaca	420
uuagaauaga	accaaccggc	ugcaacugcu	uuugccaaca	cuuagaaaa	cuucagauug	480
aacggucuaa	cagccaaua	aucgggacgg	cuauuagau	uccucaagga	ugugauggaa	540
ucaauggaa	aggaagaaau	ggagauaaca	acacauuucc	agagaagag	aagrgugagg	600
gaccaacuga	ccaagaaaa	ggucacacaa	agaacaaug	ggaagaaaa	acaaaggcug	660
aacaaaaaga	gcuaccugau	aagagcacug	acacugaaca	caaugacaa	agaugcagaa	720
agaggcaaa	ugaagaggcg	agcrauuaga	acaccggaa	ugcaauucag	aggauucgus	780
uacuuuguu	aaacacuaqc	gaggagauuc	ugugagaaac	uugagcauc	uggacuccca	840
gucggaggga	augagaagaa	ggcuaaaaug	gcaaacgucg	ugagggaau	gaugacuaac	900
ucacaagaa	cugaacucuc	cuuacaaau	acuggagaca	auaccaaug	gaugagaaau	960
cagaauccua	ggauuguuu	ggcaaugaa	acruacauca	caaggaaaca	gccagaauug	1020
uuucggaug	ucuuagcau	ugcyccuaa	auguucuaa	acaaaauggc	gagayuaagga	1080
aaagguaca	uguucgaaag	uaagagcaug	aaguuacgaa	cacaaauacc	agcagaaaug	1140
cuugcaaaa	uugaucuaa	auacuuaau	gaauuaacga	aaaagaaaa	ugagaaaaa	1200
agrcucuaa	uaauagaugg	uacagccuca	uuagcccuug	gaugaugau	gggcauguuc	1260
aacaugcuga	guacaguccu	aggaguuuca	aucugaauc	uuggacagaa	aagguaacac	1320
aaaaccacau	auugguugga	cggacuccaa	uccucugaug	auuucgucuc	caucguaaa	1380
gcaccgauc	augagggaau	acaagcagga	guggauaggu	uuauaggac	uuguaaacua	1440
guuggaauca	auaugagcaa	gaagaaguc	uacauaaauc	ggacagggac	auuugaauuc	1500
acgagcuuu	ucuaaccgua	uggauuuua	gccaauuuca	guuuggagcu	gccaguuuu	1560
ggagugucug	gaauuaaaga	aucggccgac	augagcauug	guguaacagu	gauaaaraac	1620
aaauugaua	acaaacgacc	ugggccagca	acagcucaga	uggcucuaa	gyuauuacuc	1680
aaggacuaa	gauaacaua	ccgaugccac	agaggggaua	cgcuaaucca	aacragagaa	1740
ucauucgagc	ugaagaagcu	gugggagcaa	acccguuca	aggcaggacu	guugguuua	1800
gaugggagac	caaaucuaa	caauauccga	aaucuccaua	uuccugargu	cugcuuraaa	1860
ugggaauuga	uggaugsaga	uuaccagggc	agacugugua	auccucugaa	uccruucguc	1920
agccauaagg	aaauugaauc	uguaaacaau	gcugauguaa	ugccagcua	uggccgggac	1980
aaagauuagg	aaauugaugc	cguugcaacu	acacauucau	ggauuccuaa	aaggaaucgu	2040
uccauucua	auacgagua	aaggggaaau	cuugaggau	aacagauua	ccagaagugc	2100
ugcaaucau	ucgagaauu	cuuccccagc	aguucauuc	ggaggccagu	uggaaauucc	2160
agcaugguag	agcccauagg	gucuaaggcc	cgaauugacg	acgaaauua	uuucgaguc	2220
ggaaaggaua	agaaagaaga	guuugcugag	aucaugaaga	ucuguuccac	cauuagaagar	2280
cucagacggc	aaaaauagug	aauuuagcuu	guccuucgug	aaaaaaugcc	uuuuuucac	2340
u						2341
<210> 3						
<211> 2181						
<212> PFK						
<213> Искусственная						
<220>						
<223> Консенсусная последовательность гена РА вируса приппа А						
<400> 3						
auaggagacu	uuugucgaca	augcuucau	ccaaugauug	ucgarcuugc	ggaagaggca	60
augaagagau	auggggaaga	uccgaazauc	gaacgaaca	aguuugcugc	aaauugcaca	120
cacuuaggag	ucuguuuacu	guauucggau	uuuacuuua	uugaugaacg	gagugaauc	180
auauuugag	aaucuggaga	uccgaauuca	uuauugaaac	accgaauuga	auuaauugaa	240
ggaagagacc	gaacgauggc	cuggacugug	gugaauagua	ucugcaaacac	cacagagauu	300
gagaaaccua	aauuucuccc	agauuuugau	gacuaacaa	agaaccgaa	caucgaaau	360
ggagugacac	ggagggaagu	ucauacauac	uaucuggaga	aagccaaaca	gauaaaaucc	420
gagaagacac	auauuacacu	auucucuuuc	acaggggagc	aaauugccac	caaaaggagc	480
uacaccucug	uugaagagag	cagggccaa	auuaaaacca	ggcuguuac	cauaaggcag	540
gaaauggcca	guaggggucu	augggaaucc	uuucgucuu	ccgaagagag	cgaagagaca	600
auugaagaga	aaauugaaau	cacuggaacc	augccgagac	uugcagacca	aaucuccca	660
ccgaacuuuc	ccaggccuua	aaacuuuaga	gccuauugug	auaggauucga	accgaaccggc	720
ugcauuagag	gcaagcuuuc	ucaaauguca	aaagaaguga	augcuagaau	ugagccauuu	780
uuagaagaca	cggccagccc	ucucagacua	ccugaugggc	cuccuugcuc	ucaggccugc	840
aaguuucugc	uugaugaugc	ccuuaaaaa	agcaucgaag	acccgaugca	ugagggggag	900
gggaauaccac	uaucgaugc	aaucaaaugc	augaagacau	uuuucggcug	gaaagagccc	960
aacauucuga	aaaccacuga	aaaagguaa	aaaccacauu	accuccuggc	uuggaagcaa	1020
gugcuggcag	aaucuccaaga	uuuugaauu	gagggaagaaa	ucccaaaaa	aaagaacau	1080
aaaaaaaca	gccaguuuga	gugggcacum	ggugagaaca	uggcaccaga	gaagauagac	1140
uuuagggacu	gcaagagauu	uagcgauua	agacaguau	acagugauga	accagagucu	1200
agauacacug	caagcuggau	ucagagugaa	uucaacaagg	caugugaauu	gacagauucg	1260
aguuuggauu	aaucugauga	aaugagagaa	gacguagcuc	caauugagca	cauugcaagu	1320
augagaaggga	acuaauuuac	agcggaauga	ucccauuuca	gggccacuga	auacauaaug	1380

aaggagugug	acauaaacac	agcccgugug	aaugcauccu	gugcagccau	ggaugacuuu	1440
caacugauuc	caaugauaag	caaugcaga	accaagaag	gaagacgga	aacuaaucug	1500
uauygauuca	uuuaaaagg	gagauccac	uuagggaug	auaccgaug	gguaauuuu	1560
gugaguug	aaucucucu	uacugaucg	agrcuggagc	cacacaagug	ggaaaaguc	1620
uguguccug	agauaggaga	cauguccuc	cggacugcag	uaggccaaug	uucamggcc	1680
auguuccug	auguaagaac	caauggaacc	uccaagauca	aaugaaaug	gggcauggaa	1740
augaggcgau	gccuucucu	aucccuuca	caauugaaa	gcaugauuga	agccgagucu	1800
ucugucaaa	agaggagacu	gaccaaaaga	uucuuugaa	ayaauucaga	aacauggccg	1860
auuggagagu	ccccaaagg	augggaggaa	ggcuuccug	gaaagguug	cagaaccuug	1920
cuggcgaagu	cuguguucaa	caguuaauu	gcaucuccac	aacucgagg	guuuucagcu	1980
gaaucaagaa	aaugucucu	cauugcucag	gcacuuagg	acaaccugga	accugggacc	2040
uucgaucuug	gagggcuaua	ugaagcaauu	gaggagugcc	ugauuaacga	uoccuggguu	2100
uugcuuaug	cgucuuuguu	caacuccuuc	cucgcacaug	cacugaaaua	guugugcaca	2160
ugcuacuauu	ugcuauccau	a				2181
<210>	4					
<211>	1565					
<212>	PHK					
<213>	Искусственная					
<220>						
<223>	Консенсусная последовательность NP вируса гриппа А					
<400>	4					
agcaaaagca	ggguagauaa	ucacucaccg	agugacauca	acaucauggc	guucsaaggc	60
accaaacgau	cuuaugaaca	gauggaacu	gguggagaa	gccagaauug	uacugagauc	120
agggcaucug	uuggaagaa	gguuagugg	auugggagg	ucuaauaca	gaugugcaca	180
gaucucaaac	ucagugacua	ugaaggagg	cugauccaga	acagcauac	aaugagagga	240
augguacucu	cugcauuuga	ugaagaagg	aacagauacc	uggaagaaca	ccccagugcg	300
gggaaggacc	cgaagaagac	uggagggucca	auuuauccga	ggagagaccg	gaauugggug	360
agagagcuua	uucuguaacga	caagaggag	aucaggaggga	uuuggcguca	agcgaacaa	420
ggagaggacg	caacugcugg	ucuyaccac	cugaugauau	ggcauuccaa	ucuaauugau	480
gccacauiuc	agagaacgag	agcucucgug	cguacuggaa	uggaccccag	gaugugucuc	540
cugaugcaag	gucacacucu	cccagaggga	ucuggagcug	ccggugcagc	aguraagggg	600
guagggacaa	ugguagugga	gcugauucgg	augauaaaac	gagggaucaa	cgaaccggaau	660
uucugggagg	gcgaauaug	aagaagaaca	aggauugcau	augagagaa	gugcaaacuc	720
cuccaaaggga	aaucocaaac	agcagcaca	agagcauuga	uggaucaggu	gcgagagagc	780
agaaaucucc	ggauugcuga	aaugaaagau	cucuuuuuc	uggcacgguc	ugcacucacuc	840
cugagaggau	cagugggcca	uaaguccugc	uugccugcuu	guguguaacg	acuuagcagug	900
gccaguggau	augacuuga	gagagaagg	uacucucug	uuggaauaga	uccuuuccgy	960
cugcucaaa	acagccagggu	cuuagucuc	auuagaccaa	augagaaucc	agcacauaag	1020
agucaauiag	uguggauggc	augccacucu	gcagcauuug	aggaccuuag	agucucaagu	1080
uucauacag	ggacaagagu	gguccaaga	ggacarcuau	ccaccagagg	gguucaauu	1140
gcuucaauug	agacauugga	rgcaauggac	uccaacacuc	uugaacugag	aagugagauu	1200
ugggcuauaa	gaaccagaag	cggaggaaac	accaaccagc	agagggcuc	ugcaggagacg	1260
aucagcguc	agcccauuu	cucgguaacg	agaaaccuuc	ccuucgaaa	agcgaaaccau	1320
auggcagcau	uuacagggra	uacugagggc	agaaacgucg	acaugaggac	ugaaaucaua	1380
agaaugaug	aaagugccag	accagaagau	guuucuuucc	agggcgggg	agucuuccag	1440
cucucggacg	aaaaggcacc	gaacccgau	gugccuuccu	uugacaugac	uaaugaaggga	1500
ucuuuuuuu	ucggagacaa	ugcagaggag	uaugacaauu	aaagaaaaau	accuuuguuu	1560
cuacu						1565
<210>	5					
<211>	1122					
<212>	PHK					
<213>	Искусственная					
<220>						
<223>	Консенсусная последовательность гена M1 вируса гриппа А					
<400>	5					
ugcaggaaau	cgaugcaga	aagcaggua	auguugaag	augagucuc	uaaccgagggu	60
cgaacguac	guucucua	ucauccguc	aggccccc	aaagccgaga	ucgcgcgaaa	120
acuugaagau	guuuugcag	gaagagaac	cgaucucgag	gcucucaugg	augggcuaaa	180
gacaagacca	auccugucac	cucugacuaa	agggauiiug	ggauuuguu	ucacgucac	240
cugcccgau	gagcgaggac	ugcagcgua	acgcuuuguc	cagaaugcc	uaauuggaaa	300
uggagaucca	aaauauugg	uaagggcagu	uaagcuauu	aaagagcuga	aaagagaaaau	360
aacauuccau	gggcuagg	aggucgcacu	cagcuacua	acyggugcac	uuccaguuug	420
caugggucuc	auauacaaca	ggaugggaac	ggugacuacg	gaaguggcuu	uuggccuagu	480
guuguccacu	uugagcaga	uugcagauuc	acagcaucgg	ucucacagac	agauvgcaac	540
uauaccnaac	ccacuauuca	gcaugagaa	cagaauugug	cuggccagca	cuacagcuua	600
gycuauggag	cagauggcgg	gaucaguga	gcaggcgcg	gaagccauug	agrucgcuaa	660
ucaggcuagg	cagauggugc	aggcaaugag	gacaauugg	acucauccua	acucuauguc	720
uugucugaga	gaauaucuc	uugaauuuu	gcaggccuac	cagaaacgaa	ugggagugca	780

gaugcagcga uucaagugau ccumugugug uugccgcaar uaucauuggg aucuugcacu	840
ugauauugug gauucuuugau cguuuuuuu ucaaaugcau uuaucguccg cuuaauuacg	900
guuugaaaa agggccukcu acggcaggcg uaccugaguc uaugagggaa gaguaccggc	960
aggaacagca gagugcugug gauguugacg auggucauuu uguaacaua gaauuggagu	1020
aaaaaacuac cuuguuuua cuumkrccgs wwkacuuua cagucugucc augccgagag	1080
ugaucgccgc ggcggucacg aacuccagca ggacccgaug uu	1122
<210> 6 <211> 19 <212> РНК <213> Искусственная	
<220> <223> нить dsРНК	
<400> 6 cagguaacac cauggaуac	19
<210> 7 <211> 19 <212> РНК <213> Искусственная	
<220> <223> нить dsРНК	
<400> 7 gauucguuac accauugaa	19
<210> 8 <211> 19 <212> РНК <213> Искусственная	
<220> <223> нить dsРНК	
<400> 8 cgggacucua gcauacuuu	19
<210> 9 <211> 19 <212> РНК <213> Искусственная	
<220> <223> нить dsРНК	
<400> 9 gcaauugagg agugccuga	19
<210> 10 <211> 21 <212> РНК	
<213> Искусственная	
<220> <223> нить dsРНК	
<400> 10 ccaaggaaau cugaуacga a	21
<210> 11 <211> 21 <212> РНК <213> Искусственная	
<220> <223> нить dsРНК	
<400> 11 gaguaaucaa ggaucuuuu u	21
<210> 12 <211> 21 <212> РНК <213> Искусственная	
<220> <223> нить dsРНК	
<400> 12 aucuuuuuu uucggagaca a	21
<210> 13 <211> 19 <212> РНК <213> Искусственная	
<220> <223> нить dsРНК	
<400> 13 ggaucuuuu uuuucggag	19
<210> 14 <211> 19 <212> РНК <213> Искусственная	
<220> <223> нить dsРНК	
<400> 14 cacuaaucag acaugagaa	19
<210> 15 <211> 19 <212> РНК <213> Искусственная	
<220> <223> нить dsРНК	

<400> 15		
cuacaagcuaa ggcuaugga		19
<210> 16		
<211> 4749		
<212> ДНК		
<213> Искусственная		
<220>		
<223> Конструкция нуклеиновой кислоты		
<400> 16		
agcttgcatg catttaaatg acagcagcag gtgaaagaca gacataaacac caggcacagc	60	
actctctgtg acctcaaaag gcaactagtg octacatgcc acttcaaggg aagtgettgt	120	
cccaactctgc tctgcactgg tgcagcctca cctcgagcac tgtgtgcagt tctgggagcc	180	
acagtatatg aaggacataa aactagtata gagcacccaa aggaaggcta tgaagatggg	240	
gaagggtgagt gaggaatggc tgaggctcct tggctctgcac agcccagagc agaggaggtc	300	
tgaggagacg actcatggca gccatggct cctcaagagg ggaagtagagg ggaagtgtctg	360	
agatgtgctc cctgatgaca gcaacaggac ttgaacagac agtgggggtt aggaaaaggt	420	
tcttcaccag agggcgtgg gcatggaaca ggctccctag ggcagtggac atgacctga	480	
gttactgtag ttcaaggaaac agagggttgg acatcatgat ttcttgatgc cccctccagc	540	
ccctgaaate ctgtgtgtga ttctgtgaga gtgtttgggc aatactctca ggcuaagggt	600	
ttgaattttg ggtggtgctg tgtggagtcg ggaagtggac tcaatgtacc ttgttggttc	660	
cttccaactc acaatattct gtgattctat gatacatgag ccaatcacac aagatccaaa	720	
agtccttttg attccaate ctcatgtccc actaaaatca tctactatg aatcctctat	780	
attattacag aaatgtctca gctcaacta accaaaaat tgcaagaact ggaatctgtat	840	
gctttgaate agagctagggt gacttaaaag tagattccaa ataactctaa agacatgggtg	900	
tcaattgcaa actgcacag aaaaggagaa agaaccctcc agcctccacc tcccaaatcc	960	
acagaacctt acagcttccc tgcagtgcct gaatctgaga taccactcag ggaacagtta	1020	
tgttagtgtg agatctgtag agatacctat ccaattactt tcaatgtgag tacactaata	1080	
ttgctgtctg gcatattgct acatgtttca gcatcaacta caatttctaa tcttttccct	1140	
taactgtctc gtcccttgta atacaacagt aatacagggt tgccataaaa gccctttggt	1200	
gagagctggt gacaatgtgc tctgcaggtc cctatgtccc agtaggcac ctgagctctac	1260	
tgaggagctg cctgtggaag totcccagga catgctgagc accacagaac agttgcactg	1320	
ctgaaccctc agagctgata agctcagcgc cctgcacagc atcagatctg ctcgaggctc	1380	
tcagccatg ctgccattga gctgcacaaac ctggggcact tccagaagg aggtgactgc	1440	
tgtgtgaaac caaggactgc agacagaaac ctgggggaaa aagggcaccg agggcttctc	1500	
gagcacccac ttgaggatcc ttaattaaat ggaactagg acgtggaagt catatacaat	1560	
tcaagatgca agtttaattt atctgcagag aaattgtgtt tcaagaagga agaatacaca	1620	
gggtaatgtc ataacctctt cactcaacca catggtaggt aacctagagc taccactgag	1680	
ctcacatctc tgcccccaaa cagcaaacat tcgacgtagc tgcagttaagc agcacgtgga	1740	
tggtctcgga attcgattgt cgaaccagaca gacgtcaggc ttcttaagcc tggactgagt	1800	
aagagcggaa gagctccaca gcactctgag tgcgcacaga ccgcgcgtac aggcacacgc	1860	
cgcgcgcccg ctctctcagg cactgcccgc gacagcccag cgggaggctc tgagcgcccg	1920	
cgtataaatt gcataaagaa ctaccacagg gccctcgcgc gcggaacgg gcaaaaagg	1980	
gcttctaata tggaaatatt acgccgaatc gcgttacaaa tgggctaagc gggcctaaga	2040	
gttaacaaga tgtgtatta agcggagcct ttgtgtggga agaatggag tagtcactgt	2100	
gttctaanaa aacttgacga atgagccttt aaataccgca gtctcgatgc tottagtcca	2160	
ctacagctaa ggcattggag caaatttcaa gagaatttgc tccatagcct tagctgtagt	2220	
gttttttggg actcgaccga agaaccgagc gctgtgtgac ttlaagtccc accaaaactc	2280	
tgaagaaaag aagccagacc cggcactcag cgggcagccc ggcctcccg ccgccccaca	2340	
gtgcccgccg cgtgcatttg catagcgagg tgctgcagg gggaaactca cccctcaag	2400	
tccgcccccc gcttcccgcc cgtgtcccg cactcatca gtgctgtgag ctgtctgtgt	2460	
cccccagcac gcactctttg ctgttctaac ccggaggctt gccctatcct tgaggtttct	2520	
attttttagg ctataaatac cgcctaggag gttagagatat tgcgaattga ggaagtgcctg	2580	
attcaagaga tcaggcactc ctcaattgct tttttggaac tcgaagaatt gtgggacggc	2640	
ggaagacggg ctcccgcccc gccctatat gcaagcaga gaacttccc ccgtgcaccg	2700	
cgcgcactcg gaagagaatt tgggcacttc agacccaaaa aaaaacccaa aactctctcg	2760	
aaaaagaag aactctcagc gactaaatag ggaattttgt taaagagggt ataccagaag	2820	
aagaaatatg caaatcaaac gccagctcac cgtactttaa aaatcatgat ataagagg	2880	
cttaataact gtccgagaga cactggggtt tggatcttat ttcttcggag tcaagagac	2940	
tcgaagaaa taagatcctt ttttggaaat cgagaatcac tagtgaatto cataccactg	3000	
cgaagggtgc aagtcatggg actgatactc tttaacgtct ttatcaatga cctagaaggt	3060	
gttattgaat gaacctgtag tgaattgctg atgactgaac tgagtgtcac agttaatatg	3120	
agagaaggga gagaatatg agagaatgt tgaagggaact agactgttcc agaagaaaag	3180	
gttccaggca gatcttactg caaccttcca gttaattaa atactctgtc ccttccagga	3240	
acagggaagt tattaaaaaa aaaaaagtc ccaaaaaa aaaaaaata ctatgctgaa	3300	
gtaaggaat tcagtaaaac agaaaaagag atattaataa tatggattac ttaagtttt	3360	
gaattatttt cctttcaata gactaactgt tagaaacatt ctgaatagtg cctctatact	3420	

cagtgcccta tgttcacgtt cactaattca aaacagaaaa aaaaaaaaaa attcctgtca	3480
tggttttttt ttgtctgttt gtttgtttgt ttgtttttcc tacttaagat ctltgccctcc	3540
catttacaet ggaatttaat tcagtacoto cygtaattct ggtattctac attcaatato	3600
tttagcaaat ctttctgtgt tagccagatt actccaacat aagattttct gttctggga	3660
aggatgccc tccctgagat atgcaaggtc aggtcggtg ggtgtgtgg cacctgatgg	3720
agctgtagat gtccctgttc attgcagggg atttgaactg aatggccttt aagggtcctt	3780
ttcaactcaa acagttgaat gattctgtgt ttccaagga tagggagggt cctaaccatc	3840
aaagctagac tgggaagaa gaaaaagaca aaattcttg gttatttcat tgctttggtta	3900
gttccatcag cagataaaat tataggtctc ttcttggtct agtgaagaa atgcctggga	3960
atcattttat cacaanaato ttctgtttg catgttttct tctgaactta ccaatcacac	4020
taaagaggtt ggattaaat ttgggaaggt tgagcagaaa atgtttctaa gtattaatat	4080
caattcttca catttaaat gtgcaaatat ttgaggggt gttagtagg tttgtctctc	4140
tgaatttac ctttatggtt taatcaggtg atgcctccag ttgtgcaagt agccactaac	4200
aataatgttt ttctctacta atgggaaggt ggcaaacctt atattcagt gattactaat	4260
aattttaagg aggaagtctt ttaactctaa ttaacagaa atgtgagtaa caaatgacgg	4320
atattgttca taaaacaaca gtcatcttct cttactgttg taaatataac attgtatttt	4380
acataagcca gtcaaaaac ttccaaagt ttgatagtt ccagattgta actcctgatg	4440
cttagctcta tcaggatgat atgactcaga aacgttagtt ctatcaacct agtttccaac	4500
tcttccctgc tttaaatgat ttgtggagct ctactctgaa ccagcctggc ttggaagtaa	4560
atctccttca ctcatcatca gcacactttt ttgaaaagc cactgaactt atagaatcct	4620
acttatgttg tggctcgatg aacatgtgtt aacactgtg atcaggggag cgggagtgag	4680
cagtacagga gggaaaatat gattggaac tccctgtgct gcaatctatt taaatctcga	4740
gtctgcgaa	4749
<210> 17	
<211> 4700	
<212> ДНК	
<213> Искусственная	
<220>	
<223> Конструкция нуклеиновой кислоты	
<400> 17	
agcttgcagt catttaaatg acagcagcag gtgaaagaca gacataaac caggcacagc	60
actcctgtgt acctcaaaag gcactagtta cctacatgcc acttcaaggg aagtgtttgt	120
cccactctgc tctgcaactgg tgcagcctca cctcgagcac tgtgtgcagt tetgggagcc	180
acagtatatg aaggacataa aactagtata gagcacccaa aggaaggcta tgaagatggg	240
gaaggtgagt gaggaatggc tgaggtccct tggctctgac agcccagagc agaggaggtc	300
tgaggagagc actcatggca gccataggct cctcaagagg ggagtgagg ggaagtgcctg	360
agatgtgtgc cctgatgaca gcaacaggac ttgaacagac agtgggggtt aggaaaaggt	420
tcttcaccag agggcgggtgg gcatggaaca ggctccctag ggcagtggac atgacctga	480
gttactgtag ttcaaggaaac agagggttgg acatcatgat ttcttgatgc ccttccagc	540
cctgaaatc ctgtgtgtga ttctgtgaga gtgtttgggc aatactctca ggcaaaaggt	600
ttgaattttg ggtggtgctg tgtggagtcn ggagttggac tcaagtatcc ttgttggttc	660
cttccaactc acaatattct gtgattctat gatcatgag ccagtacatc aagatccaaa	720
agtccttttg attcccaatc ctcatgtccc actaaaatca tctactatg aatccttcat	780
attattacag aaatgctcaa gctcaacta accaaaaaat tgcaagaact ggaatctgtat	840
gctttgaatc agagctaggt gacttaaaag tagattccaa ataactctaa agacatggtg	900
tcatttgcaa actgcatcag aaaaggagaa agaaaccccc agctctccac tcccaatcc	960
acagaccttt acagctttcc tgcagtgcct gaactgtaga taccactcag ggaacagta	1020
tgttagtga agatctgtag agatacctat ccaattactt tcaatgtgag tacactaata	1080
ttgtgtctg gcatattgct acatgtttca gcatcaacta caatttctaa tcttttctc	1140
tactgttccct gtcccttgta atacaacagt aatacagggg tggcataaaa gccctttggt	1200
gagagctggt gacaatgtgc tctgcaggtc cctatgtccc agtaggcacac ctgagtctac	1260
tgaggagctg cctgtggaag tctcccagga catgctgagc accacagaac agttgcactg	1320
ctgaaccccc agagctgata agctcagcgc cctgcaagac atcagatctg ctcgagctcc	1380
tcagcacatg ctgccattga gctgcacaac ctggggcact tocaagaagg aggtgactgc	1440
tgtgtgaac caaggactgc agacagaaac ctgggggaaa aagggcaccg agggcttctc	1500
gagcacccac ttgaggatcc ttaattaact ggaacctagg acgtggaagt catatacaat	1560
tcaagatgca agttaatttt atctgcagag aaattgtgtt tcaagaagga agaatacaca	1620
gggtaatgct ataacctctt cacttaacca catggtaggt aacctgagc taccactgag	1680
ctcacatcct tgccccaaa cagcaaacat tgcacgtagc tgcagtgaac agcacgtgga	1740
tggtctcgga attgcggccg cgggaattcg attgtcgacg aattgtggga cggcggaaga	1800
cgggtcccg ccccgccct atatgcaag cagagaaact cccgcgtgc accgcgcgca	1860
atcggaagag aatttgggca ctccagacc aaaaaaaaa ccaaaacttc tgcgaaaaag	1920
aaagaatctc agcggagtaa ataggattt ttgttaaga ggtgatacca gaagaagaaa	1980
tatgcaata caacgccagc tcacogctac ttaaaaatca tgatataata gaggcttaaa	2040
tactgtcga gagacactgg ggtttgatct gttccacct tgaattcaag agattcaatg	2100
gtggaacaga tcttttttgg aactcgaccg aagaaccagc cgctgctggc cttaaagtcc	2160

cacccaaact ctgaagaac gaagcagac ccggcactca gggggcagcc cgcgcctccc	2220
gccgcccac agtgcgcgc gcgtgcattt gcatagcgcg gtgctgcag ggggaaactc	2280
accccctcaa gtccgcccc cgttccgcg ccgctgtccc gcaactcact agtgetgtgc	2340
gctgtctgtg tccccacga cgcactcttt gctgttctta cccggaggtt tgcctatcc	2400
ttgaggttct tattttttag gctataaata ccgcctagga ggtagagata ttcggggaact	2460
ctagcatact tattcaagag ataagtatgc tagagtcocg ttttttggaa ctogaogagg	2520
ctcagtgtca cgcagagcgc gggacgagcg ctccgagccc tcccagtgcc gcccccagg	2580
caggcgcgcc gccgcagctc ccgcgagccc gccagtggga aggcctctgt ttgcataacg	2640
cgcaagccct gctgggagga aagcggagcg agaaagagcg ttaacgtgcg ccgagtgttt	2700
tagagcaaaa gcattcagac ctgaagcagc gctgagagat gccctctgcg cccatttact	2760
ggaacgttca gacccaccgc aagtcaccgt gaccttgagg acactgagct gttggccgtt	2820
atatagcact tggggcagct cgtagctttc aggatacacc atggataact caagagagta	2880
tccatgggtg atcctgtttt tggaactcga gaatcantag tgaattcgcg gcccggaatt	2940
ccataccact gcgaggggtg caagtcattg gactgatact ctttaacgtc ttatcaatg	3000
acctagaaag tgttatgaa tgaacctgta gtgagttgct gatgaactgaa ctgagtgcta	3060
cagttaatat gagaagaagg agagaatat gagagaaatg ttgagggaac tagacttggt	3120
cagaagaaaa ggttccagcg agatcttact gcaaccttcc agttaattaa gatattctgt	3180
cccttccagg aacaggaaga ttattaaaa aaaaaagtc accataaaaa aaaaaaaat	3240
actatgctga agtaaggaaa ttccagtaac aagaaaaaga gatattaata atatggatta	3300
ctttaagttt tgaattattt tcccttcaat agagtaactg ttagaacat tctgaatagt	3360
gcctctatac tcaagtccct atgttcacgt tcactaattc aaaaacagaa aaaaaaaaa	3420
gattcctgtc atgggttttt ttgtctgtt tgtttgtttg ttgttttttc ctacttaaga	3480
tcttgccctc ccatttacac tggaaattaa ttcagtaact ccggttaatt tggatttcta	3540
caatcaatat ctttagcaaa tctttctgct gtagccagat tactccaaca taagatttct	3600
ggtttctggg aaggatgcgc atccctgaga tatgcaaggt caggctggat ggggtgctgg	3660
gcacctgatg gagctgtaga tgtccctgtt cattgcaggg gatttgaact gaatggcctt	3720
taagggtcct ttcaaotca aacagttgaa tgattctgtg gtttccaagg atagggaggg	3780
tcotaacatt caaagctaga ctgggaaga agaaaaagac aaaaattctt ggtattttca	3840
ttgctttggt agttccatca gcagataaaa ttataggtct cttcttggtc tagtgtaaga	3900
aatgcctggg astcatttta tcacaaaaat ctttctgttt gcattgttttc ttctgtactt	3960
accaatcaca ctaaatgagt tggattaaaa ttttgggagg ttgagcagaa aatgttctta	4020
agtattaata tcaattcttc acatttaaaa tgtgcaata ttttgagggg tgttagtagg	4080
cttgcctct ctgaaattta cctttatggt ttaatcaggt gatgcctcca gttgtgcaag	4140
tagccactaa caataatgtt ttttctact aatgggaagg tggcaaacat tatattcagt	4200
ggattactaa taattttaag gaggaagctt ttcaatcta attacaaga aatgtgagta	4260
acaatgacg gatatttgtc ataaaaaac agtcactctc tcttacatgt gtaaatata	4320
cattgtattt tacataagcc agtcagaaat ctccacaagt ctggatagt tccagattgt	4380
aaactcgtat gcttagctct atcaggatga tatgactcag aaacgttagt tctatcaacc	4440
tagtttccaa ctcttccttg cttttaatga tttgtggagc tctactctga accagcctgg	4500
cttgaagta aatctccttc actcactcgc agcacacttt ttttgaaaag ccaagtcact	4560
tatagaatcc tacttatgtt gtggctcgat gaacatgtgt taacactgtg gatcagggga	4620
gcgggagtag gcagtacagg agggaaaata tgattggaaa ctccttgtgc tgcaatctat	4680
ttaaatctcg agctcgogaa	4700
<210> 18	
<211> 4706	
<212> ДНК	
<213> Искусственная	
<220>	
<223> Конструкция нуклеиновой кислоты	
<400> 18	
agcttgcatg catttaaatg acagcagcag gtgaaagaca gacataaac caggcacagc	60
actcctgtgt acctcaaaag gcaactagtg cctacatgcc acttcaaggg aagtgcctgt	120
cccaactctgc tctgcaactgg tgcagcctca cctcgagcac tgtgtgcagt tctgggagcc	180
acagtatatg aaggacataa aactagtata gacacccaa aggaaggcta tgaagatggg	240
gaaggtgagt gaggaatggc tgaggctcct tggctctgcac agcccagagc agaggaggtc	300
tgaggagacg actcatggca gccataggct cctcaagagg ggagtagagg ggaagtgtctg	360
agatgtgtct cctgatgaca gcaacaggac ttgaacagac agtgggggtt aggaaaaagt	420
tcttcaccag agggcggttg gcatggaaca ggctccctag ggcagtggac atgaacctga	480
gttactgtag ttcaaggaa acaggggttg acatcatgat ttcttgatgc ccttccagc	540
ccotgaaatc ctgtgtgtga ttctgtgaga gtgtttgggc aatactctca ggcacagggt	600
ttgaattttg ggtggtgtctg tgtggagtca ggagtggac tcaatgatcc ttgttggttc	660
cttccaaact acaattattct gtgattctat gatacatgag ccagtacatc aagatccaaa	720
agtccttttg attcccaatc ctcatgtccc actaaaatca tctactatg aatccttcat	780
attattacag aaatgctcaa gctcaacta accaaaaaat tgcaagaact ggatctgtat	840
gctttgaatc agagctaggt gacttaaaag tagattccaa ataactctaa agacatggtg	900
tcattttgca actgcatcag aaaaggagaa agaaccctcc agcctccacc tcccaaatcc	960

```

acagaccttt acagcttttc tgcagtgccct gaactctgaga taccactcag ggaacagtta 1020
tgttagtgtg agatctgtag agataacctat ccaatttactt tcaatgtgag tacactaata 1080
ttgctgtctg gcataattgct acatgtttca gcatacaacta caattttctaa tcttttccctc 1140
tactgttccct gtcccttgta atacaacagt aatacaggggt tggcataaaa gccctttgggt 1200
gagagctggg gaccaatgtgc tctgcaggtc cctatgtccc agtaggacac ctgagctctac 1260
tgaaggagctg cctgtggaag tctcccaagg catgctgagc accacagaac agttgcactg 1320
ctgaaccccc agagctgata agctcagcgc cctgcaagac atcagatctg ctcgaggctcc 1380
tcagcacatg ctgccattga gctgcacaac ctggggcact tocaagaagg aggtgactgc 1440
tgtgtgaac caggagctgc agacagaac ctgggggaaa aagggcaccg agggcttccct 1500
gagcaccac ttgaggatcc ttaattaaact ggaactagg acgtggaagt catatacaat 1560
tcaagatgca agttaatttt atctgcagag aaattgtgtt tcaagaagga agaatacaca 1620
gggtaatgtc ataacctctt cacctaacca catggtaggt aacctgagc taccactgag 1680
ctccatcctc tgcctccaaa cagcaaacat tgcagctagc tgcagtaagc agcagctgga 1740
tggtctcggg attgcggccg cgggaattcg attgtcgacg aattgtggga cggcggaaga 1800
cgggtcccg cccgcctct atatgcaagg cagagaactt cccgcctgc accgcgcga 1860
atcggaagag aatttgggca cttcagacc aaaaaaaac ccaaaacttc tgcgaaaaag 1920
aaagaatctc agcggagtaa atagggattt ttgttaaaga ggtgatacca gaagaagaaa 1980
tatgcaata caagccagc tcaccgctac ttaaaaaatca tgatataata gaggtctaaa 2040
tactgtccga gagacactgg ggtttatctt atttcttcgg agacaattca agagattgtc 2100
tccgaagaaa taagattttt ttggaactcg accgaagaac cgagcctgc tggcctttaa 2160
gtccaccaaa aactctgag aaacgaagcc agaccggca ctcagcgggc agcccgccgc 2220
tcccgccgc ccacagtgcc gcgcgcgtgc atttgcatag cgcgtgtctc gcagggggaa 2280
actcacccc tcaagtccgc ccccgcttc ccgcgcgtg tccgcacct catcagtctc 2340
gtcgcctgtc tgtgtccccc agcacgcact ctttgtgtt cttaccggga ggcttgcct 2400
atccttgagg tttctatttt ttaggctata aataccgctc aggaggtaga gatattcgca 2460
attgaggagt gctgattca agagatcagg cactctcaa ttgctttttt ggaagtcgac 2520
gaggctcagt gtcacgcaga gcgcgggacg agcgtctcga gccctcccag tgcgcctccc 2580
caaggcaggg cggccggcgc agctcccgcc agcccgccag tgggaaggct ctgctttgca 2640
taacgcgcaa ggcctgtctg gaggaaagcg gagcgagaaa gagcgttaac gtgcgcgag 2700
tgttttagag caaaagcatt cagacotgaa gcagcgtga gagatgcctc tgcgcctcat 2760
ttactggaac gttcagaccc accgcaagtc accgtacct tgaggacact gagctgttgg 2820
ccgttatata gcacttgggg cagctcgtag ctttgatctg ttccaccatt gaattcaaga 2880
gattcaatgg tggaacagat cttttttgga actcgagaat cactagtga ttccggccgc 2940
cgaattccat accactgcga gggtgccaa tcatgggact gatactcttt aacgtcttta 3000
tcaatgacct agaaagtgtt attgaatgaa cctgtagtga gttgctgat actgaactga 3060
gtgctacagt taatatgaga gaaggagag aaatatgaga gaaatgttga ggaactaga 3120
cttgttcaga agaaaaggtt ccaggcagat cttactgcaa ccttcagtt aattaagata 3180
cttgtccct tccaggaca ggaagattat taaaaaaaa aaagtcacca taaaaaaaa 3240
aaaaatacta tgcagaagta aggaattca gtaacaaga aaaagagata ttaataatat 3300
ggattacttt aagttttgaa ttattttctt ttcaatagag taactgttag aaacattctg 3360
aatagtgct ctatactcag tgccctatgt tccggtcac taattcaaaa cagaaaaaaa 3420
aaaaaagatt cctgtcatgg ttttttttg tctgtttgt ttgtttgtt ttttctac 3480
ttaagatctt gccctcccat ttacactgga atttaattca gtacctcgg taattctggt 3540
attctacatt caatatcttt agcaaatctt tctgctgtag ccagattact ccaacataag 3600
attctggtt tctgggaagg atgccatcc ctgagatag caaggtcagg ctggatggg 3660
tgctgggcac ctgatggagc tctgatgtc cctgttcatt cgaagggtt tgaactgaat 3720
ggcctttaag ggtccttttc aactcaaca gttgaatgat tctgtgttt ccaaggatag 3780
ggagggtcct aacattcaaa gctagactgg gaaagaagaa aaagacaaaa attcttggt 3840
atttcattgc tttgttagtt ccactcagc ataaaaattat aggtctcttc ttggtctagt 3900
gtaagaaatg cctgggaatc attttatcac aaaaactctt ctgtttgcatt gtttctctc 3960
gtactacca atcacactaa atgagttgga ttaaaatttt gggaggttga gcagaaaatg 4020
ttcttaagta ttaatatcaa ttcttcacat ttaaaatgtg caaatatttt gaggggtgtt 4080
agtaggcttt gctcctctga aatttacctt tatggtttaa tcaggtgatg cctccagttg 4140
tgcaagtagc cactaacat aatgtttttt cctactaatg ggaagggtgc aaacattata 4200
ttcagtggaat tactaataat tttaaggagg aagtcctttc aatotaatta acaagaaatg 4260
tgagtaacaa atgacggata ttgtcataa aacaacagtc atctctctt acatgtgtaa 4320
atataacatt gtattttaca taagccagtc agaaactctc acaagtcctg gatagttcca 4380
gattgttaact cctgatgctt agctctatca ggaatgatag actcagaac gttagttcta 4440
tcaacctagt ttccaaactc tcttgcctt taatgattg tggagctcta ctctgaacca 4500
gcctggcttt gaagtaaatc tcttccactc atcatcagca cactttttt gaaaagccac 4560
gtcaactata gaactactat tatgtgttg ctcgatgaac atgtgttaac actgtggatc 4620
aggggagcgg gagtgaagc tacaggagg aaaaatgat tggaaactcc ttgtgctgca 4680
atctatttaa atctcgagct cgcgaa 4706

```

<211> 1242
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Конструкция 1 множественных shRNA

<400> 19
 gaattcgatt gtcgaccaga cagacgtcag gctttctaag cctggactga gtaagagcgg 60
 aagagctcca cagcactctg agtgcgcaca gacgcgcgt acagcgaca gccgcgcggc 120
 ogctccttca ggcactgcgg acgacagccc aggcggagggt cctgagcgcc ggcgctaagt 180
 ttgcataaag aactaccag gagccctcgc gcgcggaaac gggcaaaaag ggccttctaa 240
 tatggaaata ttacgcggaa tcgcgttaca aatcggttaa gcgggcctaa gagttaacaa 300
 gatgtgctat taagcggagc cttttgggtg gaagaaatgg agtagtcaat gtgttctaaa 360
 agaacttgca gaatgagcct ttaaataccg cagtctcgat gctcttagtc cactacagct 420
 aaggctatgg agcaaatctc aagagaattt gctccatagc cttagctgta gtgttttttg 480
 gaactcgacc gaagaaccga gcgtgctgg ccttaaagtc ccacaaaaac tctgaagaaa 540
 cgaagccaga ccgcgcactc agcgggcagc ccgcgcctcc cgcgcgcccc cagtgcgcgc 600
 cgcgtgcatt tgcatagcgc ggtgctcgca gggggaaact caccctctca agtccgcccc 660
 ccgcttcccg ccgcgtgtcc gcgacctcat cagtgtgtgt cgtgtgtgt gtccccagc 720
 acgcactctt tctgttctt acccgagggc ttgcccctac cttgaggttt ctatttttta 780
 ggcataaat accgcctagg aggtagagat attcgcaatt gaggagtgcc tgattcaaga 840
 gacaggcac tctcaattg cttttttgga actcgacgaa ttgtgggacg gcggaagacg 900
 ggtcccccgc ccgcctctat atgcaaaaca gagaacttcc gcgcgtgcac cgcgcgcaat 960
 cgggaagaaa ttgtggcact tcagacccaa aaaaaaacc aaaaactctg cgaaaaagaa 1020
 agaactctag cggagtaaat agggattttt gttaaagagg tgataccaga agagaaata 1080
 tgcaaataca acgcagctc accgctactt aaaaatcatg atataataga ggccttaata 1140
 ctgtccgaga gacactgggg ttgggatctt atttcttcgg agtcaagag actccgaaga 1200
 aataagatcc ttttttgga ctcgagaatc actagtgaat tc 1242

<210> 20
 <211> 1181
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Конструкция 2 множественных shRNA

<400> 20
 gcgcgcgcgg gaattcgatt gtcgacgaat tgtgggacgg cggaaagacgg gctccccccc 60
 cgcctctata tgcaaaagcag agaacttccc gccgtgcacc gcgcgcaatc ggaagagaat 120
 ttgggcactt cagacccaaa aaaaaaccca aaacttctgc gaaaaagaaa gaatctcagc 180
 ggagtaataa gggatttttg ttaaaggagt gataccagaa gaagaaatat gcaaatacaa 240
 cgcagctca ccgctactta aaaatcatga tataatagag gcttaaatac tgtccgagag 300
 aactgggggt ttgatctgtt ccaccattga attcaagaga ttcaatggtg gaacagatct 360
 tttttggaac tcgacogaag aaccgagcgc tgcgtgccct aaagtccacc caaaactctg 420
 aagaaacgaa gccagacccg gcactcagcg gccagcccgc gctccccgc gccccacagt 480
 gccgcgcgcg tgcatttgca tagcgcggtg ctcgcagggg gaaactcacc cctcaagtc 540
 cgcctccgcg ttcgcgcgcg ctgtcccgca cctcatcagt gctgtgcgt gtctgtgtcc 600
 cccagacgc actctttgct gttcttaccg ggaggtctgc cctatccttg aggtttctat 660
 tttttagct ataataccg cctaggaggt agagatatcc cgggactcta gcatacttat 720
 tcaagagata agtatgctag agtcccgttt ttgggaactc gacgaggtct agtgtcagc 780
 agagcgcggg acgagcgtc cagaccctcc cagtgcgcgc ccaaggcag gccgcgcggc 840
 gcagctcccc gcagcccgc agtgggaagg ctctgtttg cataacgcgc aaggcctgct 900
 gggaggaaag cggagcgaga aagagcgtta acgtgcgcgc agtgttttag agcaaaagca 960
 ttcagacctg aagcagcgt gagagatgcc tctgcgcgcc atttactgga acgttcagac 1020
 ccacgcgaag tcaccgtgac cttgaggaca ctgagctgtt ggcggttata tagcaacttg 1080
 ggcagctcgt agctttcagg atacaccatg gatacttcaa gagagtatcc atggtgtatc 1140
 ctgtttttgg aactcgagaa tcactagtga attcgcggcc g 1181

<210> 21
 <211> 1196
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Конструкция 3 множественных shRNA

<400> 21
 gcgcgcgcgg gaattcgatt gtcgacgaat tgtgggacgg cggaaagacgg gctccccccc 60
 cgcctctata tgcgaaggcag agaacttccc gccgtgcacc gcgcgcaatc ggaagagaat 120
 ttgggcactt cagacccaaa aaaaaaccca aaacttctgc gaaaaagaaa gaatctcagc 180
 ggagtaataa gggatttttg ttaaaggagt gataccagaa gaagaaatat gcaaatacaa 240
 cgcagctca ccgctactta aaaatcatga tataatagag gcttaaatac tgtccgagag 300
 aactgggggt ttatcttatt tcttcggaga caattcaaga gattgttccc gaagaaataa 360
 gatttttttg gaactcgacc gaagaaccga gcgtgctgg ccttaaagtc ccacaaaaac 420
 tctgaagaaa cgaagccaga ccgcgcactc agcgggcagc ccgcgcctcc cgcgcgcccc 480
 cagtgcgcgc cgcgtgcatt tgcatagcgc ggtgctcgca gggggaaact caccctctca 540

agtcgcgcgc ccgcttcccg cccgctgtcc cgcacctcat cagtgtgtgt cgtgtgtgt	600
gtcccccagc acgcactctt tgctgttctt acccgagggc ttgccctatc cttgaggttt	660
ctatttttta ggtataaat accgcctagg aggtagagat attgcgaat gaggagtgc	720
tgattcaaga gatcaggcac tctcaattg cttttttgga agtcgacgag gctcagtgtc	780
acgcagagcg cgggacgagc gctccgagcc ctcccaagtgc cgcctcccaa ggcagggcgg	840
ccggcgacgc tccccgcagc ccgcagtggt gaaggtcttg ctttgcataa cgcgcaaggc	900
ctgctgggag gaaagcggag cgagaaagag cgttaacgtg cgcagagtgt tttagaagca	960
aagcattcag acctgaagca gcgctgagag atgcctctgc cgcctattta ctggaacgtt	1020
cagaccacac gcaagtcacc gtgaccttga ggacactgag ctgttgcccg ttatatagca	1080
cttggggcag ctctagctt tgatctgttc caccattgaa ttcaagagat tcaatgttg	1140
aacagatctt ttttggaaat cgagaatcac tagtgaatc gcggccgcga attcca	1196
<210> 22	
<211> 325	
<212> ДНК	
<213> Искусственная	
<220>	
<223> Последовательность промотора cu6-1	
<400> 22	
cgaaagaacc agcgtgtgtg gccttaagt cccacaaaa ctctgaagaa acgaagccag	60
accgggcaat cagcgggcag cccgcgcctc ccgcgcgcgc acagtgcgc gcgcgtgcat	120
ttgcatagcg cgggtgtctgc agggggaaac tcacccctc aagtcgcgc cccgtctccc	180
gcccgctgtc ccgcacctca tcagtctgt gcgctgtctg tgtcccccag cagcactct	240
ttgtgtttct taccggagg cttgccttat ccttgagggt tetatttttt aggcataaaa	300
taccgcctag gaggtagaga tatto	325
<210> 23	
<211> 394	
<212> ДНК	
<213> Искусственная	
<220>	
<223> Последовательность промотора cu6-3	
<400> 23	
cgacagacgc tcaggctttc taagcctgga ctgaagaa gcggaagagc tccacagcac	60
tctgagtgcg cacagaccgc gcgtacagcg cacagccgcg cggccgcctc ttcaggcaat	120
gccgacgaca gccacaggcg aggtcttgag cgcgcgcgct aaatttgcac aaagaactac	180
ccaggagccc tcgcgcgcgc aaacggggcaa aaaggggctt ctaatatgga aatattacgc	240
cgaatcgcgt tacaatcgcg ctaagcgggc ctaagagtta acaagatgtg ctatttaagc	300
gagccttttg gtgggaagaa atggagtgt caetgtgttc taaaagaact tgcagaatga	360
gcctttaaat accgcagtct cgtgtctctt agtc	394
<210> 24	
<211> 287	
<212> ДНК	
<213> Искусственная	
<220>	
<223> Последовательность промотора cu6-4	
<400> 24	
tgaattgtgg gacggcggaa gacgggtccc cgcctccccc ctatatgcaa agcagagaaac	60
ttcccgccgt gcaccgcgcg caatcggaa agaatttggg cacttcagac ccaaaaaaaa	120
accxaaact tctgcgaaaa agaaagaatc tcagcggagt aaataggat ttttgtaaa	180
gaggtgatac cagaagaaga aatatgcaaa tacaacgcca gctcaccgt acttaaaaat	240
catgatataa tagaggctta aatactgtcc gagagacact ggggttt	287
<210> 25	
<211> 783	
<212> ДНК	
<213> Искусственная	
<220>	
<223> Последовательность промотора 75K	
<400> 25	
gtccagccat ccacctccca ccaatacttc cccactgaac catgtccctc agtagcacag	60
ggtttgtgga acgcctcttg ggacggtgcc tccccacct gccacgcagc ccatccagc	120
acctgacact tctggagacg aaatttttcc taacgtccaa cctgagtctc cctgggtgca	180
acttgaggct gttccctga ctcccatgc tagttactg ggaagaaaag acccctaaga	240
ccaccocgtg caaccaccag cccatcccca ccacgcccac tgaccggggc cctcagtgcc	300
acagcagcac ggttctcgag cgttcgcag gacggtgagc actgcccga acctctgcac	360
ggctcaqca acgcgaactt cagccggggt cgtgtcccag gagccggcgg cttcggagcg	420
cagagcgagc cgggagagct ccggccgcgg gaggtcagt gtcacgcaga gcgcgggacg	480
agcgtctcca gccctcccag tgccgcccc aaggcagggc ggcgggcgca gctccccga	540
gcccgccagt ggaaggctc tgccttgcat aacgcgcaag gcctgtctgg aggaagcgg	600
agcgagaaag agcgttaacg tgccccagat gtttagagc aaagcattc agacctgaag	660
cagcgtgag agatgcctct gcgcgccatt tactgaaac gttcagaccc accgcaagtc	720
accgtgacct tgagacactg agctgttgcc cgttatatag cacttggggc agctcgtagc	780
ttt	783
<210> 26	

<211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Праймер олигонуклеотида

<400> 26
 cgaagaaccg agcgcctgc 18

<210> 27
 <211> 85
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Праймер олигонуклеотида

<400> 27
 gggctcgagt tccaaaaaag cgcagtggtta ctccacttct cttgaaagtg gagtaaacact 60
 gcgctgaata ccgcttcctc ctgag 85

<210> 28
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Праймер олигонуклеотида

<400> 28
 gaattgtggg acggcggaag 20

<210> 29
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Праймер олигонуклеотида

<400> 29
 cagacagacg tcaggctttc 20

<210> 30
 <211> 83
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Праймер олигонуклеотида

<400> 30
 ctcgagttcc aaaaaaagat cttatttctt cggagtctct tgaactccga agaaataaga 60
 tccaaacccc agtgtctctc gga 83

<210> 31
 <211> 99
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Праймер олигонуклеотида

<400> 31
 ctcgagttcc aaaaaaacact acagctaagg ctatggagca aattctcttg aaatttgctc 60
 catagcctta gctgtagtgg actaagagca tcgagactg 99

<210> 32
 <211> 83
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Праймер олигонуклеотида

<400> 32
 ctcgagttcc aaaaaagcaa ttgaggagtg cctgatctct tgaatcaggc actcctcaat 60
 tgcgaatata tctacctct agg 83

<210> 33
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Праймер олигонуклеотида

<400> 33
 gtcgaccgaa gaaccgagcg ctgc 24

<210> 34
 <211> 26
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Праймер олигонуклеотида

<400> 34
 gtcgacgaat tgtgggacgg cggaag 26

<210> 35
 <211> 26
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Праймер олигонуклеотида

<400> 35
 gtcgaccaga cagacgtcag gctttc 26

```

<210> 36
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Праймер олигонуклеотида

<400> 36
gaggctcagt gtcacgcaga                20

<210> 37
<211> 83
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Праймер олигонуклеотида

<400> 37
ctcgagttcc aaaaaagatc tgttcacca ttgaatctct tgaattcaat ggtggaacag    60
atcaaacccc agtgtctctc gga                                           83

<210> 38
<211> 83
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Праймер олигонуклеотида

<400> 38
ctcgagttcc aaaaaacggg actctagcat acttatctct tgaataagta tgctagagtc    60
ccggaatata tctactctct agg                                           83

<210> 39
<211> 87
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Праймер олигонуклеотида

<400> 39
ctcgagttcc aaaaaaatct tatttctctg gagacaatct cttgaattgt ctccgaagaa    60
ataagataaa cccagtgctc tctcgga                                       87

<210> 40
<211> 25
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Праймер олигонуклеотида

<400> 40
gtcgacgagg ctcagtgta cgcag                25

<210> 41
<211> 83
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Праймер олигонуклеотида

<400> 41
ctcgagttcc aaaaaacagg atacaccatg gatactctct tgaagtatcc atggtgtatc    60
ctgaaagcta cgagctgccc caa                                           83

<210> 42
<211> 83
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Праймер олигонуклеотида

<400> 42
ctcgagttcc aaaaaagatc tgttcacca ttgaatctct tgaattcaat ggtggaacag    60
atcaaaagcta cgagctgccc caa                                           83

<210> 43
<211> 46
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Праймер олигонуклеотида

<400> 43
gaattccata ccactgcgag ggtgccaaagt catgggactg atactc                46

<210> 44
<211> 32
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Праймер олигонуклеотида

<400> 44
gatattctta ttaactggaa ggttcagta ag                32

<210> 45
<211> 25
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Праймер олигонуклеотида

<400> 45
gatattctgt ccctccagg aacag                25

```


<210>	46	
<211>	32	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	Праймер олигонуклеотида	
<400>	46	
	ctcgagattt aaatagattg cagcacaagg ag	32
<210>	47	
<211>	35	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	Праймер олигонуклеотида	
<400>	47	
	ggatccttaa ttaactggaa actaggacgt ggaag	35
<210>	48	
<211>	47	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	Праймер олигонуклеотида	
<400>	48	
	gaattccgag accatccacg tgctgcttac tgcagctac tgaatg	47
<210>	49	
<211>	34	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	Праймер олигонуклеотида	
<400>	49	
	gcattccattt aaatgacacg agcaggtgaa agac	34
<210>	50	
<211>	26	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	Праймер олигонуклеотида	
<400>	50	
	ggatcctcaa gtgggtgctc aggaag	26
<210>	51	
<211>	87	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	Праймер олигонуклеотида	
<400>	51	
	ctcgagttcc aaaaaaatct tattttctcg gagacaaatct ctggaattgt ctccgaagaa	60
	ataagatgac taagagcatc gagactg	87
<210>	52	
<211>	21	
<212>	РНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	Последовательность, кодирующая dsРНК	
<400>	52	
	cagcgaccsa aagaauucg a	21
<210>	53	
<211>	21	
<212>	РНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Последовательность, кодирующая dsРНК	
<400>	53	
	aagaauucgg auhgccsauc a	21
<210>	54	
<211>	19	
<212>	РНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Последовательность, кодирующая dsРНК	
<400>	54	
	guggauucuu gaucgucuu	19
<210>	55	
<211>	17	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер олигонуклеотида	
<400>	55	
	ttgccccaa acagcaa	17
<210>	56	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	

```

<220>
<223> Праймер олигонуклеотида

<400> 56
gaccatccac gtgctgctta                                20

<210> 57
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Праймер олигонуклеотида

<400> 57
cattcgacgt agctgca                                    17

<210> 58
<211> 19
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Праймер олигонуклеотида

<400> 58
gcagcacgtg gatggtctc                                19

<210> 59
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Праймер олигонуклеотида

<400> 59
tcttccgcgcg tccacaatt                                20

<210> 60
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Праймер олигонуклеотида

<400> 60
gcttagaag cctgacgtct                                20

<210> 61
<211> 1206
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Конструкция нуклеиновой кислоты

<400> 61
gacgtcgacg aattgtggga cggcggaaga cgggctcccg ccccgccctc atatgcaaaag    60
cagagaactt cccgcgtgac accgcgcgca atcggaagag aatttgggca cttcagaccc    120
aaaaaaaaac ccaaaacttc tgcgaaaaag aaagaatctc agcggagtaa atagggattt    180
ttgttaaaga ggtgatacca gaagaagaaa tatgcaata caacgcacgc tcaccgctac    240
ttaaaaatca tgatataata gaggcttaaa tactgtccga gagacactgg ggtttgatct    300
gttccaccat tgaattcaag agattcaatg gtggaacaga tcttttttgg aactcgacca    360
gacagacgtc aggttttcta agcctggact gagtaagagc ggaagagctc cacagcactc    420
tgagtgcgca cagaccgcgc gtacagcgca cagccgcgcg gccgtctcct caggcaactgc    480
cgacgacagc ccaggcgagag gtcttgaagc ccggcgctaa atttgcataa agaactaccc    540
aggagccctc gcgcgcgga aaggcggaaa aggggcttct aatatgaaa tattacgcgc    600
aatcgcttta caaatcggtc aagcgggcct aagagttaac aagatgtgct attaagcgga    660
gccttttggc gggaagaat ggagtagtca ctgtgttcta aaagaacttg cagaatgagc    720
ctttaaatca cgcagtctcg atgctottag tctcttattt ctcggagac aattcaagag    780
attgtctccg aagaataaag atttttttgg aactcgacgc aagaaccgag cgtgtctggc    840
cttaaagtcc caccaaaact ctgaagaaac gagccagac ccggcactca gcgggcagcc    900
cgcgctccc gccgcccac agtgccgcgc gcgtgcattt gcatagcgcg gtgctcgcag    960
ggggaaactc accccctcaa gtccgcccccc cgcttccgcg ccgctgtccc gcacctcacc    1020
agtgtctgac gctgtctgtg tccccagca cgcctctttt gctgttctta cccggaggct    1080
tgccctatcc ttgagggttc tatttttttag gctataata ccgcctagga ggtagagata    1140
ttcgcaattg aggagtgcct gattcaagag atcagggaact cctcaattgc ttttttgaa    1200
ctcgag                                                1206

<210> 62
<211> 1664
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Конструкция нуклеиновой кислоты

<400> 62
cagagggtga aagtacttga gtaattttac ttgattactg tacttaagta ttatttttgg    60
ggatttttac ttacttgag tacaattaa aatcaatact tttaacttta cttaattaca    120
tttttttaga aaaaaagta ctttttactc cttacaattt tatttacagt caaaaagtac    180
ttatttttgg gagatcactt cattctattt tcccttgcta ttacaaaacc aattgaattg    240
cgctgatgcc cagtttaatt taaatagatc tctcgacgaa ttgtgggacg gcggaagacg    300
ggctcccgcc ccgcccctat atgcaaggca gagaacttcc cgcctgtcac cgcgcgaat    360

```

cggaagagaa ttgggcact tcagacccaa aaaaaaaccc aaaacttctg cgaanaagaa	420
agaatctcag cggagtaaat agggattttt gtaaaagagg tgataccaga agaagaata	480
tgcaaataca acgccagctc accgctactt aaaaatcatg atataataga ggcttaata	540
ctgtccgaga gacactgggg ttatcttat ttcttcggag acaattcaag agattgtctc	600
cgaagaata agattttttt ggaactcgac cgaagaaccg agcgtgctg gccttaagt	660
ccacccaaaa ctctgaagaa acgaagccag acccggcact cagcgggcag ccgcgcctc	720
ccgccgcccc acagtgcgcg gcgcgtgcat ttgcatagcg cgggtgctgc agggggaaac	780
tcacccctc aagtcgcgc ccgcctccc gcccgctgtc ccgcacctca tcagtgtgt	840
ggcgtgtctg tgccccccag caccgactct ttgctgttct tacccgagg cttgccctat	900
cottgaggtt totattttt aggcataaa tacgcctag gaggtagaga tattcgcaat	960
tgaggagtgc ctgattcaag agatcaggca ctctcaatt gcttttttg aagtcagga	1020
ggctcagtgt cagcgagagc ggggacgag cgtccgagc cctccagtg ccgccccc	1080
aggcaggcg gccggcgag ctccccgag ccgcgcagtg ggaaggctct gctttgcata	1140
acgcgcaagg cctgtggga ggaagcgga gcgagaaga gcttaacct gcgcgagtg	1200
ttttagaca aaagcattca gacctgaagc agcgtgaga gatgcctct gcgccattt	1260
actggaactg tcagaccac ccgaagtcac cgtgacctg aggacactga gctgtggcc	1320
gtatataagc acttggggca gctcgtagct ttgatctgt ccaccattga attcaagaga	1380
ttcaatggtg gaacagatct ttttggaa tcgaggtcga ctctagagcg gcgcgcgca	1440
ctagtgaatt ccattggatat caagcttaaa caagaatctc tagttttctt tctgtcttt	1500
acttttactt ccttaatact caagtacaat ttaattggag tacttttta cttttactca	1560
agtaagattc tagccagata cttttacttt taattgagta aaattttccc taagtacttg	1620
tactttact tgagtaaaat ttttgagtac tttttaccc tctg	1664
<210> 63	
<211> 1723	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Конструкция нуклеиновой кислоты	
<400> 63	
cagaggtgta aagtacttga gtaattttac ttgattactg tacttaagta ttatttttgg	60
ggatttttac ttactttgag tacaattaaa aatcaatact tttaacttta cttaattaca	120
tttttttaga aaaaaagta ctttttactc cttacaattt tatttacagt caaaaagtac	180
ttatttttgg gagatcactt cattctattt tcccttgcta ttaccaaac aattgaattg	240
cgtgatgcc cagtttaatt taatatagatc tctcgacgaa ttgtgggacg gcggaagacg	300
ggctcccgcc ccgccctat atgcaaaaga gagaacttcc cgcgtgacac gcgcgcgaat	
cgaagagaga ttgggcact tcagacccaa aaaaaaaccc aaaacttctg cgaanaagaa	
agaatctcag cggagtaaat agggattttt gtaaaagagg tgataccaga agaagaata	
tgcaaataca acgccagctc accgctactt aaaaatcatg atataataga ggcttaata	
ctgtccgaga gacactgggg ttgatctgt tccaccattg aattcaagag attcaatggt	
ggaacagatc ttttttgaa ctgaccaga cagacgtcag gctttctaag cctggactga	
gtaagagcgg aagagctcca cagcactctg agtcgcaca gaccgcgctg acagcgaca	
gccgcgcgcg cgtctcttca ggcactgcg acgacagccc aggcggaagt cctgagcgc	
ggcgttaaat ttgcataaag aactaccag ggcctctgc gcgcggaac gggcaaaaag	
ggccttctaa tatggaata ttacgcgcaa tcgcgttaca aatcggttaa gcgggcctaa	
gagtaacaaa gatgtgctat taagcggagc cttttggtgg gaagaaatgg agtagtact	
gtgttctaaa agaacttcca gaatyagcct ttaaataccg cagtctgat gctcttagtc	
tcattttctc tcgagacaaa ttcaagagat tgtctccgaa gaaataagat ttttttgaa	
ctgacgaga gaaccgagcg ctgctggcct taaagtccca ccaaaactct gaagaaacga	
agccagaccc ggcactcagc gggcagcccg cgcctccgc cgcgccacag tgccgcgcgc	
gtgcatttgc atagcgcggt gctgcaggg ggaactcac cccctcaagt ccgccccccg	
ctcccgccc gctgcgcgc acctcatcag tgcgtgctgc tgtctgtgtc cccagcacg	
cactcttgc tgttcttacc cggaggcttg cctatcctt gaggtttcta ttttttaggc	
tataaatacc gcttaggag tagagatatt cgcgaattgag gagtgcctga ttcaagagat	
caggcactcc tcaattgctt ttitggaaact cgaagtgcac tctagagcgg ccgcgcgcac	
tagtgaattc catggatctc aagcttaaac aagaatctct agttttcttt cttgctttta	
cttttacttc ctttaacttc aagtacaatt ttaattggagt acttttttac ttttactcaa	
gtaagattct agccagatac ttttactttt aattgagtaa aattttccct aagtacttgt	
actttcactt gagtaaaatt tttagtact ttttacacct ctg	
<210> 64	
<211> 3459	
<212> ДНК	
<213> Искусственная Последовательность	
<220>	
<223> pminiTol2	
<400> 64	
gggcgaattg ggcacagagg tgtaaagtac ttgagtaatt ttacttgatt actgtactta	60
agtattattt ttggggattt ttactttact tgagtacaat taaaaatcaa tacttttact	120
ttacttaatt tacatttttt tagaaaaaaa agtacttttt actccttaca attttattta	180

cagtcacaaa gtaacttattt ttggagatc acttcattct atttccctt gctattacca	240
aaccaattga attgcgctga tgcccagttt aatttaata gatctggcca tctagagcgg	300
ccgcgcgcac tagtgaatc catggatc aagctaaac aagaatctct agttttcttt	360
cttgctttta cttttaactc ctttaactc aagtacaatt ttaatggagt acttttttac	420
ttttactcaa gtaagattct agccagatac ttttactttt aattgagtaa aattttccct	480
aagtacttgt actttcactt gagtaaaatt tttagtact ttttacacct ctgctcgacc	540
atatgggaga gctcccaacg cgttggatgc atagcttgag tattctatag tgtcacctaa	600
atagcttggc gtaactatgg tcatagctgt ttctgtgtg aaattgttat ccgctcaca	660
ttccacacaa catacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc ctgggggtgoc taatgagtga	720
gctaactcac attaatggc ttgcgctcac tgcccgttt ccagtcggga aacctgtcgt	780
gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgc cggggaagag cgttttgcgt attgggcgct	840
cttcgccttc ctgcctcact gactcgctgc gctcgtcgt tcggctgcgg cgagcggat	900
cagctcactc aaaggcggtc atcgtttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga	960
acatgtgagc aaaaagccag caaaaagcca ggaacgttaa aaaggccgcg ttgctggcgt	1020
ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaa tcgacgctca agtcagaggt	1080
ggcgaaaccc gacagacta taaagatacc aggcgtttcc ccttggaaag tccctcgtgc	1140
gctctcctgt tccgacctg ccgcttaacg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa	1200
gcgtggcgct ttctcatagc tccgctgta ggtatctcag ttcggttag gtcgttcgct	1260
ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccc ttoagccoga ccgctgcgoc ttatccggtc	1320
actatgctct tgagtcacac ccggttaagac acgacttatc gccactggca gcagccactg	1380
gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag ccggtcctac agagttcttg aagtgtgac	1440
ctaactacgg ctacactaga agaacagtat ttggtatctg cgtctgtctg aagccagtta	1500
ccttcggaaa aagagtttgt agctcttgat ccggcaaaac aaccacgcgt ggtagcggtg	1560
gttttttgtt ttgcagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt	1620
tgatcttttc tacgggggtc gaogctcagt ggaacgaaaa ctacgttaa gggattttg	1680
tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta	1740
aatcaatcta aagtatatat gagtaaacct ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg	1800
aggcacctat ctacagatc tgtctatttc gttccatcat agttgcctga ctcccgtcg	1860
tgtagataac taacatacgg gagggtttac catctggccc cagtgcgtga atgataccgc	1920
gagaccacag ctacccgctt ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaaggcccg	1980
agcgcagaag tggctcctga actttatccg cctccatcca gtctattaat tgttgcggg	2040
aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgccaa cgttgttgcc attgctaacg	2100
gcctcgttgt gtcacgctcg tcgtttggtc tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat	2160
caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc ggttagctcc ttccgtcttc	2220
cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact catggttatg gcagcactgc	2280
ataattctct tactgtcatg ccatcgttaa gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa	2340
ccaagtcaat ctgagaatag tgtatcggcg gaccgagttg ctcttgcccg ggtcaatac	2400
gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgt catcatttga aaacgtttct	2460
cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taacccactc	2520
gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta ctttccacg cgtttctggg tgagcaaaaa	2580
caggaaaggc aaatgcgcga aaaaagggaa taagggcgac acggaaatgt tgaatactca	2640
tactcttctt ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat	2700
acatatltga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tcgcgcaca tttcccgaa	2760
aagtgcacc tgatgcggtg tgaataaccg cacagatgcg taaggagaaa ataccgcac	2820
aggaaattgt aagcgttaat attttgttaa aattcgctt aaattttgt taaatcagct	2880
cattttttaa ccaataggcc gaaatcggca aaatccctta taaatcaaaa gaatagaccg	2940
agataggggt gagtgttgtt ccagtttga acaagagtc actattaaag aacgtggact	3000
ccaacgtcaa agggcgaaaa accgtctatc agggcgatgg cccactacgt gaacatcac	3060
cctaataaag ttttttgggg tcgaggtgoc gtaaaacact aaatcggaac cctaagggga	3120
gccccgatt tagagcttga cggggaagc cggcgaaagt ggcagaaaag gaagggaaga	3180
aaagcaaaag agcgggcgct agggcgctgg caagtgtagc ggtcacgctg ccggtaacca	3240
ccacacccgc cgcgtttaat gcgcgcgtac agggcgctc cattcgccat tcaggctgcg	3300
caactgttgg gaaggcgat cgttcgggc ctcttcgcta ttacgcacgc tggcgaaaag	3360
gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccagg ttttccagt cagcagttg	3420
taaaacgacg gccagtgat tgtaatacga ctcaactata	3459
<210> 65	
<211> 5693	
<212> ДНК	
<213> Искусственная н43оследовательность	
<220>	
<223> pCMV-Tol2	
<400> 65	
ggccgccacc atggaggaa gattgtatc atcagcagct gcgagcagca cagtccaaaa	60
tcagccacag gatcaagagc acccgtggcc gtatcttcgc gaattctttt ctttaagtgg	120
tgtaaaaaa gattcattca agatgaaatg tgcctctgt ctcccgctta ataaagaaat	180
atcgcccttc aaaagttcgc catcaaacct aagggaagcat attgagagaa tgcacccaaa	240

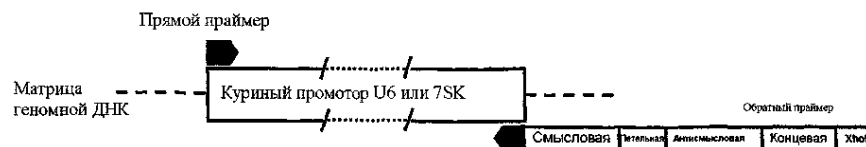
ttacctcaaa aactactcta aattgacagc acagaagaga aagatcggga cctccaccca	390
tgcttcacgc agtaagcaac tgaagtga ctcagtttcc ccagtcacac atgtgtctcc	360
agtcaactgt aacaaagcta tattaaggta catcattcaa ggacttcato ctttcagcac	420
tgttgatctg ccactattta aagagctgat tagtacactg cagcctggca tttctgtcat	480
tacaaggcct actttacgct ccaagatagc tgaagctgct ctgacatga aacagaaagt	540
gactgctgcc atgagtgaag ttgaatggat tgcaaccaca acggattggt ggactgcacg	600
tagaaagtca ttcatgtgtg taactgtcoa ctggatcaac cctggagtc ttgaaagaca	660
ttcgcgtgca cttgcctgca aaagattaat gggctctcat acttttgagg tactggccag	720
tgccatgaat gatccact cagagtatga aatacgtgac aaggttggtt gcacaaccac	780
agacagtggc tccaacttta tgaaggcttt cagagttttt ggtgtggaaa acaatgatat	840
cgagactgag gcaagaaggt gtgaaagtga tgacctgat tctgaaggct gtgtgaggg	900
aagtgtggt gtggaattcc aagatgctc acgagctcct gaccaagacg atggcttcga	960
attccagcta ccaaaacatc aaaagtgtgc ctgtcactta cttaacctag tctcaagcgt	1020
tgatgcccaa aaagctctct caaatgaaca ctacaagaaa ctctacagat ctgtctttgg	1080
caaatgccaa gctttatgga ataaaagcag ccgactggct ctgacgctg aagctgttga	1140
atcagaagc cggcttcagc ttttaaggcc aaaccaaacg cggtggaatt caacttttat	1200
ggctgtgac agaattcttc aaatttgcaa agaagcagga gaaggcgcac ttcggaatat	1260
atgcacctct cttgaggttc caatgtttaa tccagcagaa atgctgttct tgacagagt	1320
ggccaacaca atgcgtccag ttgcaaaagt actcgacatc ttgcaagcgg aaacgaatac	1380
acagctgggg tggctgctgc ctagtgtcca tcagttaagc ttgaaacttc agcgactcca	1440
ccattctctc aggtactgtg acccacttgt ggaatgccta caacaaggaa tccaacacg	1500
attcaagcat atgtttgaag atcctgagat catagcagct gccatccttc tccctaaatt	1560
tcggaacctct tggacaatg atgaaccat cataaaacga ggcattggact acatcagagt	1620
gcactgtgag cctttggacc acaagaagga attggccaac agttcatctg atgatgaaga	1680
tttttgcct tctttgaac cgacaacaca tgaagccagc aaagagttgg atggatatct	1740
ggcctgtgtt tcagacacca gggagtctct gctcacgttt cctgctattt gcagcctctc	1800
tatcaagact aatacacctc ttcccgcatc ggtgcctgt gagaggcttt tcagcactgc	1860
aggattgctt ttcagcccca aaagagctag gcttgacact aacaattttg agaatcagct	1920
ctactgaag taaatctga ggttttacaa ctttgatgag actagtctga agggcgcaatt	1980
ctgcagatat ccactacact ggccggccgcg gggatccaga catgataaga tacattgatg	2040
agtttgaca aaccacaact agaatgcagt gaaaaaaatg ctttatttgt gaaatttgtg	2100
atgctattgc tttatttgta accattataa gctgcaataa acaagttaac aacaacaatt	2160
gcattcattt tatgttccag gttcagggg aggtgtggga ggtttttctg gctcctctag	2220
agtgcacctg caggcatgca agcttggctt aatcatggtc atagctgitt cctgtgtgaa	2280
attgttatcc gtcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct	2340
ggggtgctta atgagtgagc taactacatc taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc	2400
agtcggaaaa cctgtctgctc cagctgcatt aatgaatcg ccaacgcgcg gggagaggcg	2460
gtttcggtat tgggcgtctc tccgctcctc cgtcactga ctcgctgcgc tcggtcgttc	2520
ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag	2580
gggataacgc aggaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aacctgaaaa	2640
aggccgcgtt gctggcggtt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaac	2700
gacgtcaag tcagaggtgg cgaaccocga caggactata aagataccag gcgtttcccc	2760
ctggaaagctc cctcgtgcgc tctctgttc cgaccctgac gcttaccgga taactgtccg	2820
cctttccccc ttccgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcaagt	2880
cgggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcaoga acccccgtt cagcccgacc	2940
gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtcccaacc ggttaagcac gacttatcgc	3000
cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgotacag	3060
agttcttgaa gtgtggcct aaactacgct acactagaag gacagtattt ggtatctgcg	3120
ctctgtgaa gccagttacc ttccgaaaaa gagttgtag ctcttgatcc ggcacacaaa	3180
ccaccgctgg tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag	3240
gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgtcagtggt aacgaaaaact	3300
caogttaagg gattttgttc atgagattat caaaaaggat ctccacctag atccttttaa	3360
attaasaatg aagtttttaa tcaactaaa gtatatatga gtaactttgt tctgcaggtt	3420
accaatgctt aatcagtga gacatctatc cagcagctctg tctatttctg tcatccatag	3480
ttgctgact ccccgctgtg tagataacta cgatacggga gggettacca tctggcccca	3540
gtgtgcaat gataccgcga gaaccacgct caccgctccc agatttatca gcaataaacc	3600
agccagccgg aaggcccgag ccgagaagtg gtctcgcaac tttatccgcc tccatccagt	3660
ctattaattg ttcccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg	3720
ttgttgccat tgcacaggc atcgtgtgtg caccgtcgtc gtttggtatg gcttcatca	3780
gtccgggttc ccaacgatca agcgagtta catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg	3840
ttagctcctt cggctcctcg atcgttgca gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca	3900
tggttatggc agcactgcac aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcctttctg	3960
tgactggtga gtaactcaac aagtcattct gagaatatg tatcggcga ccgagttgct	4020
cttgcgccgc gtcaatacgg gataataccg cgcacatag cagaacttta aaagtgtca	4080

```

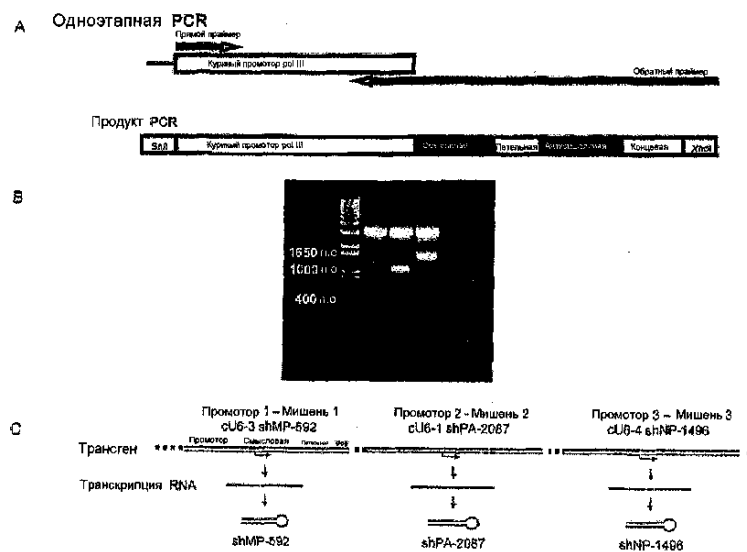
tcattgaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca 4140
gttcgatgta acccactcgt gcaccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg 4200
ttcttgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgcgcgaaa aaagggaata agggcgacac 4260
ggaaatgttg aatactcata ctcttctctt tccaatatta ttgaagcatt tatcagggtt 4320
attgttccat gaggcgatac atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggttc 4380
cgcgccatt tcccgaaaa gtgcacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat 4440
taacctataa aaataggcgt atcacgagc cctttcgtct cgcgcgttct ggtgatgacg 4500
gtgaaaacct ctgacacatg cagctcccg agacggcac agcttctctg taagcggtg 4560
ccgggagcag acaagcccg cagggcgctg cagcgggtgt tggcgggtgt cggggctggc 4620
ttaactatgc ggcatcagag cagattgtac tgagagtgc aatatgogg tgtgaatac 4680
cgacacatg cgtaaaggaga aaatacogca tcaggcgcca ttgcacatc aggcctgcga 4740
actgttggga agggcgatcg gtgcgggctt cttcgtatt acgcacgctg cgcgaagggg 4800
gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa cgcacgggtt ttccagtc aacgctgtga 4860
aaacgacggc cagtgaattc gagcttgcac gcttcaggt cgttacataa cttacgtaa 4920
atggcccgcc tggctgaccg ccaacgacc cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg 4980
ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttaaggt 5040
aaactgcoca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtaogccc cctattgacg 5100
tcaatgacgg taaatggccc gctggcatt atgccagta catgacctta tgggacttcc 5160
ctacttgga gtacatctac gtattagtc togtattac catggtgatg cggttttggc 5220
agtacatcaa tggcggtgga tagcgtttg actcacggg atttccaagt ctcaccccca 5280
ttgacgtcaa tgggagtttg ttttgccac aaatcaacg ggaatttcca aaatgtcgt 5340
acaactccgc cccattgacg caaatgggg gtagcggtgt acggtgggag gtctatataa 5400
gcagagctcg tttagtgaac cgtcagatcg cctggagacg ccatacagc tgttttgacc 5460
tccatagaag acacccggac cgtaccagcc tccgactct agaggatccg gtactcgagg 5520
aactgaaaaa ccagaaagtt aactggaag tttagtctt ttgtcttta ttccagttcc 5580
cggatccggt ggtggtgcaa atcaaaagaa tgctctcag tggatgttgc ctttactct 5640
aggcctgtac ggaagtgtta cttctgctct aaaagctgcg gaattgtacc cgc 5693

```

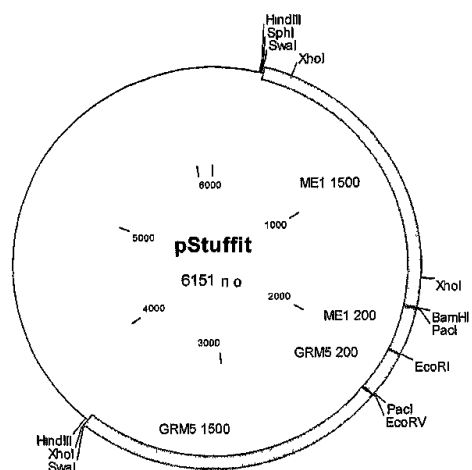
PCR для кассет экспрессии shRNA



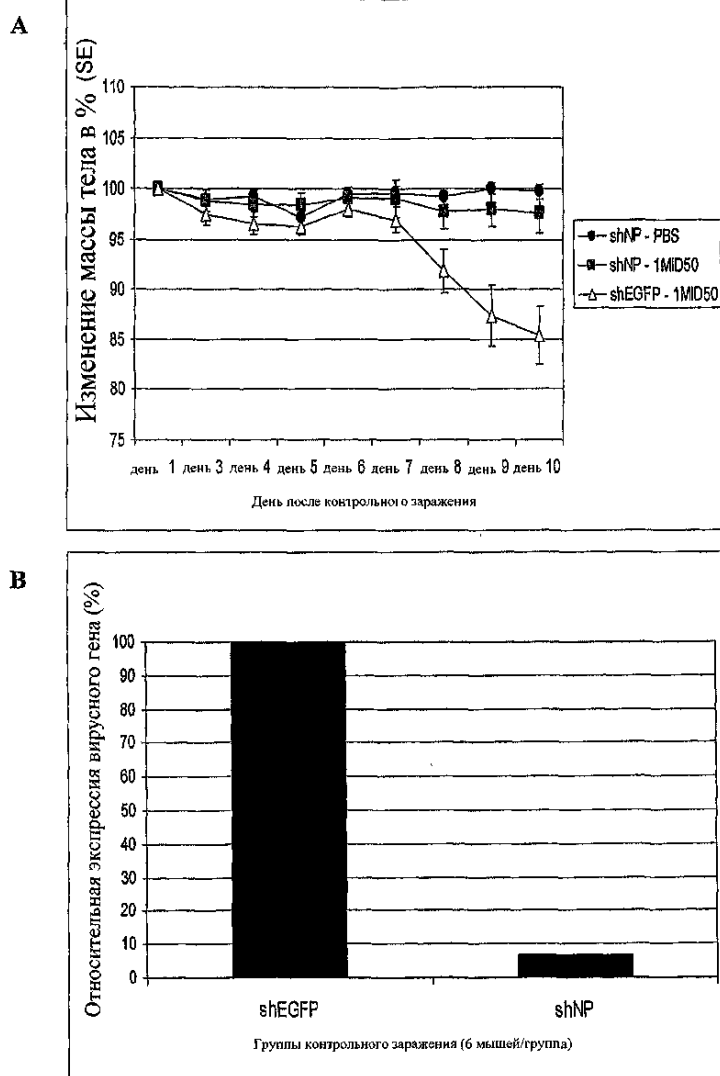
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2