

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 017948

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2013.04.30

(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)

(21) Номер заявки  
200971059

(22) Дата подачи заявки  
2008.05.16

(54) ЛЕЧЕНИЕ И ПРОФИЛАКТИКА ГРИППА

(31) 60/938,315; 2007902616

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

(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)

(57) Настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновых кислот, содержащим двунитевую область, и конструкциям нуклеиновых кислот, кодирующими их, которые можно использовать для лечения и/или профилактики гриппа. В частности, настоящее изобретение относится к конструкциям нуклеиновых кислот, кодирующими 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.

B1

017948

017948  
B1

### Область изобретения

Настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновых кислот, содержащим двунитевую область, и конструкциям нуклеиновых кислот, кодирующими их, которые можно использовать для лечения и/или профилактики гриппа. В частности, настоящее изобретение относится к конструкциям нуклеиновых кислот, кодирующими 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 (HA) и нейраминидазу (NA), которые необходимы для прикрепления вируса и выхода из клеток. Другие основные вирусные белки включают нуклеопротеин, нуклеокапсидный структурный белок, матричные белки (M1 и M2), полимеразы (PA, PB1 и PB2) и неструктурные белки (NS1 и NS2).

У вируса гриппа А известны по меньшей мере 16 подтипов HA (H1-H16) и 9 NA (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 HA, тогда как высокопатогенные штаммы имеют многоосновный сайт расщепления. Подтипы H5 и H7 могут вызвать высокопатогенные инфекции у домашней птицы, и было показано, что определенные подтипы преодолевают видовые барьеры и становятся инфекционными для людей. Высокопатогенные вирусы H5 и H7 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 гибридизируется 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 курице, то конструкция нуклеиновой кислоты желательно 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 большом 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 shPHK. Схематическое представление стратегии PCR, используемой для получения векторов экспрессии shPHK. В PCR использовались прямые праймеры, спаренные с обратными праймерами, содержащими все компоненты shPHK. Все конечные продукты PCR состояли из куриного промотора U6 или 7SK, смысловой shPHK, петли, антисмысловой shPHK, 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 shPHK (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 shPHK к целевым генам вируса гриппа А.

Фиг. 3 - плазмидная карта pStuffit (6151 п.о.). На карте имеют метку и защищованы 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 направлены на гены вируса гриппа A, 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 A, в частности инфекции вирусом птичьего гриппа.

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

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 подроде организма таксономического класса Aves (птицы), такие как, но ими не ограничиваясь, курица, индюшка, утка, гусь, перепел, фазаны, попугаи, выорки, 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, родайллендские, австралийские, корнишские, минорские, амрокские, калифорнийские серые, итальянские оранжевые, а также линии индюшек, фазанов, перепелов, уток, страусов и другой домашней птицы, разводимой в промышленных количествах.

Термин "домашняя птица" включает 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 A, 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 РА (РА), гемагглютинину (НА), нуклеокапсидному белку (NP), нейраминидазе (НА), 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 связанный 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 "индивиду" 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, слону, мокроту, жидкость глазных линз, потовую жидкость, фекалии, мочу, молоко, асцитическую жидкость, слизь, синовиальную жидкость, жидкость брюшной полости, трансдермальные экссудаты, глоточные экссудаты, бронховоальвеолярный 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 (смеяться) 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 депротеинизированной 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 двунитевой РНК подавляет экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты, с которой молекула двунитевой РНК имеет существенную или полную гомологию. Однако позднее было показано, что интерференции РНК можно достичь с использованием двунитевых 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 ненуклеотиды.

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 РНК<sub>i</sub> 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 антисмыловые области, где антисмыловая 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 антисмыловую нить, где антисмыловая 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 РНК<sub>i</sub>, 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 РНК<sub>i</sub> эквивалентен другим терминам, используемым для описания специфической для последовательности интерференции РНК, такой как посттранскрипционный вызов молчания гена, транскрипционное ингибиование 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 однонитевую петлю над стволовой структурой, созданной двумя областями комплементарности оснований. Пример последовательности однонитевой 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 стволово-петельных структур, разделенных однонитевыми 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 мембранны. 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 алкилденины, 5-галоидурацил, 5-галоидцитозан, 6-азацитозин и 6-азатимин, псевдоурацил, 4-тиоурацил, 8-галоиддаденин, 8-аминоаденин, 8-тиоладенин, 8-тиоалкилденины, 8-гидроксилденин 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 взаимозаменяется 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% NaDODSO<sub>4</sub> 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% пирофосфат 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, фосфорилидат, 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 считываания, кодирующей двунитевую РНК. Конструкция нуклеиновой кислоты может содержать первую рамку считываания, кодирующую первую нить молекулы двунитевой РНК, причем комплементарная (вторая) нить кодируется второй открытой рамкой считываания 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 мишениями 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 считываания 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) считываания, 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 считываания, кодирующий одну или несколько двунитевых РНК. Примеры подходящих транспозонов включают Tol2, мини-Tol, "Sleeping Beauty", Mariner and Galihop.

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  $\beta$ -галактозидаза, люцифераза,  $\beta$ -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 аденоzinдеаминаза, аминогликозидная фосфотрансфераза, дигидрофолатредуктаза, гигромицин-В-фосфотрансфераза, или устойчивость к лекарственным средствам.

Если конструкция нуклеиновой кислоты трансфицируется 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, трансфенирована 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 транскрибиированной 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 транскрибиированной последовательностью, являются физически смежными с транскрибиированной последовательностью, т.е. они являются цис-действующими. Однако некоторые транскрипционные регуляторные элементы, такие как усилители, не должны быть физически смежными или расположеными в непосредственной близости к кодирующему последовательностям, чью транскрипцию они усиливают.

Под терминами "промотор РНК полимеразы III", или "промотор РНК pol III", или "промотор полимеразы III", или "промотор pol III" подразумеваются 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 генной 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, мышиным 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, flankирующей 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, flankирующей 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 птичьи 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 запустят 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 снизит 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 других 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 thy1. 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 полимераза, 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 гибридизироваться 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-мишени.

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-мишениям, 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 меченные 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 нуклиновых кислот, которые являются амплифицированными.

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 ЕР 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 связуются для образования одной единицы. Путем циклического изменения температуры, как при PCR, связанные лигированные единицы диссоциируются от мишени и затем служат в качестве "последовательностей-мишней" 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, афенофируса, афеноассоциированного вируса, ретровируса, поксивириуса или герпесвируса. Такие векторы включают хромосомные, эпизомные и полученные из вируса векторы, например векторы, полученные из бактериальных плазмид, бактериофагов, дрожжевых эпизом, 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, flankирующими открытые рамки считываания, кодирующие одну или несколько двунитевых РНК. Примеры подходящих транспозонов включают Tol2, мини-Tol2, "Sleeping Beauty", Mariner and Galluhop. 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 СНО, COS, 3T3, DF1, CEF, миеломы MDCK, почек детеныша хомячка (ВНК), HeLa или клеток Vero, клеток амфибий, таких как ооциты Xenopus, или клетки насекомых, такие как клетки Sf9, Sf21 или Tn5. Могут также использоваться клетки СНО, не имеющие гена DHFR (dhfr-CHO) или СНО 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, RPM11640 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, totипотентные или плuriпотентные 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 получаются 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 развиться 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 трансфектируются 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, свежесобранный сперм промывается и инкубируется с мышным 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 бластодерм в свежеотложенные яйца (патент США № 5162215; Bosselman et al., 1989; Thoraval et al., 1995). Ретровирусная нуклеиновая кислота, несущая ино-родный 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 Balcunas 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 плазмида, 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) воспроизведимо 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, эксквириенты и/или разбавители включают, но ими не ограничиваются, лактозу, сахарозу, порошок крахмала, порошок талька, сложные эфиры алканоевых 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 амфи菲尔ами, такие как композиции, раскрытие 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, желательно, многофункциональными молекулярными комплексами или масляно/водными катионными амфи菲尔ными 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 выпулления из яиц может немного снизиться, когда воздушный мешок не является мишенью для введения, хотя необязательно на промышленно неприемлемых 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 высущенного 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 высущенных или лиофилизованных 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 жидким 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, метилгидроксибензоат, 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 shPHK для включения в трансгены.

Для нацеливания на РНКи 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 siPHK для высокодивергентных вирусных последовательностей, Nai to et al., 2006) для идентификации высококонсервативных областей внутри выбранных генов, а также для прогнозирования последовательностей siPHK, скрининг которых может производиться для выбора shPHK. Эта компьютерная программа выявила ряд областей в пределах анализируемых геномных сегментов вируса гриппа А, которые представляли особый интерес для конструкции shPHK, 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 прогнозированных последовательностей siPHK из программы siVirus для скрининга с целью выбора shPHK (табл. 1). Имеются несколько алгоритмов для выбора потенциальных последовательностей siPHK для определенных генов-мишеней. Однако было показано, что многие из этих прогнозированных siPHK эффективно не функционируют при получении из экспрессированных shPHK. Taxman et al. (2006), в частности сконструировали алгоритм для прогноза эффективных молекул shPHK, и авторы разработали свою собственную модификацию алгоритма для улучшения прогноза shPHK. Авторы применили модифицированный алгоритм Taxman к 29 shPHK, выбранным с использованием программы siVirus с тем, чтобы выбрать последовательности для тестирования в качестве shPHK для специфического ингибирования репликации вируса гриппа А.

Таблица 1

Алгоритм выбора последовательностей shPHK, нацеленных на гены вируса гриппа А

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

Имеются 4 критерия для выбора shPHK с использованием алгоритма Taxman. 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 Taxman 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 ddPHK 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	GAUCUGUUCCACCAUUGAA (SEQ ID NO:7)
PB2-2240	CGGGACUCUAGCAUACUUA (SEQ ID NO:8)
PB2-8	CAGCGACCAAAAGAATTGGGA (SEQ ID NO:52)
PB2-10	AAGAATTGGATGGCCATCAA (SEQ ID NO:53)
PA-2087	GCAAUJGAGGAGUGCCUGA (SEQ ID NO:9)
NP-771	CCAGGAAAUGCUGAGAUCGAA (SEQ ID NO:10)
NP-1472	GAGUAAUGAAGGAUCUUUUU (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, тестирували 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-“шипильки” shNP-1496. Вторая плазмида содержит добавочную последовательность размером 100 п.о. выше по ходу транскрипции промотора cU6-4. Ождалось, 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 А 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-луночном планшете с V-образным дном. Серийные двукратные разведения образцов вируса смешивали с равным объемом 0,5% супензии (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 плазмида были успешно сконструированы для 7 из последовательностей. Конечные экспрессионные плазмида 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 плазмида прямой праймер TD135 спаривали с обратным праймером TD155, содержащим последние 20 нуклеотидов промотора chU6-11 и всех других нерелевантных компонентов shPHK (shirr). Продукт PCR лигировали в pGEM-T Easy и затем проводили определение последовательностей.

Каждую плазмиду ddPHKi 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 трансфектированные клетки через 8 ч инфицировали вирусом гриппа А, или низкпатогенным 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	GGGCTCGAGTTCCAAAAAAAGCGCAGTGTACTCCACTTCTCTTGAAGTGGAGTAACACTGCGCTGAA TACCGCTTCCCTCTGAG (SEQ ID NO:27)	cU6-1 shirr
TD175	GAATTGCGGACGGCGGAAG (SEQ ID NO:28)	cU6-4
TD176	CAGACAGACGCTCAGGCTTC (SEQ ID NO:29)	cU6-3
TD216	CTCGAGTTCCAAAAAAAGGATCTTATTCTCGGAGTCTCTTGAACCTCCGAAGAAATAAGATCCAAACCC CAGTGTCTCTCGGA (SEQ ID NO:30)	cU6-4 shNP-1496
TD217	CTCGAGTTCCAAAAAAACACTACAGCTAAGGCTATGGAGCAAATTCTCTTGAATTGCTCCATAGCCTT AGCTGTAGTGGACTAAGAGCATCGAGACTG (SEQ ID NO:31)	cU6-3 shMP-592
TD218	CTCGAGTTCCAAAAAAAGCAATTGAGGAGTGCTGATCTCTTGAATCAGGCACTCCTCAATTGCGAATA TCTCTACCTCTAGG (SEQ ID NO:32)	cU6-1 shPA-2087
TD232	GTCGACCGAGAGAACCGAGCGCTGC (SEQ ID NO:33)	TD135 + Sall
TD233	GTCGACGAAATTGCGGACGGCGGAAG (SEQ ID NO:34)	TD175 + Sall
TD234	GTCGACCGAGACAGCTCAGGCTTC (SEQ ID NO:35)	TD176 + Sall
TD269	GAGGCTCAGTGTACCGCAGA (SEQ ID NO:36)	c7SK
TD274	CTCGAGTTCCAAAAAAAGATCTGCTCCACATTGAATCTCTTGAATTCAATGGTGGAACAGATCAAACCC CAGTGTCTCTCGGA (SEQ ID NO:37)	cU6-4 shPB1-2257
TD275	CTCGAGTTCCAAAAAAAGGGACTCTAGCATACTTATCTCTTGAATAAGTATGCTAGAGTCCCAGGAATAT CTCTACCTCTAGG (SEQ ID NO:38)	cU6-1 shPB2-2240
TD302	CTCGAGTTCCAAAAAAATCTTATTCTCTGAGACAATCTCTTGAATTGCTCCGAAGAAATAAGATAAA CCCCAGTGTCTCTCGGA (SEQ ID NO:39)	cU6-4 shNP-1484
TD306	GTCGACGAGGCTCAGTGTACCGCAG (SEQ ID NO:40)	TD269 + Sall
TD307	CTCGAGTTCCAAAAAAACAGGGATACACCATGGATACTCTTGAAGTATCCATGGTGTATCCTGAAAGCT ACGAGCTGCCCAA (SEQ ID NO:41)	c7SK shPB1-129
TD316	CTCGAGTTCCAAAAAAAGATCTGCTCCACATTGAATCTCTTGAATTCAATGGTGGAACAGATCAAAGCT ACGAGCTGCCCAA (SEQ ID NO:42)	c7SK shPB1-2257
TD343	CTCGAGTTCCAAAAAAATCTTATTCTCGGAGACAATCTCTTGAATTGCTCCGAAGAAATAAGATGA CTAAGAGCATCGAGACTG (SEQ ID NO:51)	cU6-3 shNP-1484

Во всех экспериментах с анализом ГА, суммированных в табл. 5, плазмида, 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. Плазмида, 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 тестированных 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 вариабельности вирусной последовательности-мишени для стратегии PHKi. 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), экспрессирующими 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 A1 или вакцинированных птиц. Мишени PHKi 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
	MWH 1				32	16	8
	MWH 2				64	64	16
	MWH 3				8	8	4
	MWH 4				4	4	0

b) MWH2 - cU6-4 shPB1-2257; cU6-1 shPB2-2240; c7SK shPB1-129.

Эти 3 транскрипционные единицы для MWH 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 MWH, как описано выше и на фиг. 2.

c) MWH3 - cU6-4 shNP-1484; cU6-1 shPA-2087; c7SK shPB1-2257.

Эти 3 транскрипционные единицы для MWH3 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 MWH, как описано выше и на фиг. 2.

d) MWH4 - cU6-4 shPB1-2257; cU6-3 shNP-1484; cU6-1 shPA-2087.

Эти 3 транскрипционные единицы для MWH4 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 MWH, как описано выше и на фиг. 2.

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

Пример 6. Клонирование трансгенов MWH в вектор pStuffit.

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

бы мешать экспрессии трансгена MWH. 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 плазиды pStuffit.

Плазиду 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 плазиду проверяли переваром рестрикционного фермента и определением последовательностей ДНК. Конечная собранная плазиды 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	EcoRI / EcoRV
ME1 200	TD281 / TD282	BamHI / EcoRI
GRM5 1500	TD279 / TD280	EcoRV / Xhol
ME1 1500	TD283 / TD284	SphI / BamHI

Таблица 7

#### Конструирование pStuffit

Обозначения и последовательность праймеров PCR. Подчеркнуты рестрикционные ферментные сайты

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

Вставка трансгенов MWH в pStuffit.

Вектор pStuffit имеет необычный рестрикционный сайт EcoRI, расположенный между последовательностями GRM5 200 и ME1 200 для обеспечения возможности вставки каждого трансгена MWH. Каждый трансген MWH был вставлен в pStuffit лигированием в этот рестрикционный сайт EcoRI. Были также включены PacI и SwaI для обеспечения возможности эксцизии конструкции с варырующимися количествами фланкирующей последовательности (фиг. 3). Рестрикционные ферментные сайты HindIII вектора pIC20H могут использоваться для эксцизии всей клонированной последовательности. Поэтому конечные плазиды pStuffit, содержащие каждую из вставок MWH, 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, свежесобранные куриные сперму промывают и инкубируют с мышьяним 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 достигнуто 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 инъектируют 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 инъектируют 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 однодневального потомства поколения G0. Геномную ДНК получают из вены крыла, используя миниабор для анализа ДНК в крови QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen). ДНК из крови кончиков перьев получают, используя раствор для экстракции ДНК QuickExtract<sup>TM</sup> DNA Extraction Solution (Epicentre Biotechnologies). Проводят два теста этих образцов для подтверждения присутствия конструкции.

Саузерн blotting.

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 blottingа

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 blotting и PCR в реальном масштабе времени снова используются для демонстрации трансгенной природы потомства поколения G1.

Более детальный анализ с использованием геномных Саузерн blottingов 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 blotting 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 инъектировали в перивителлиновое пространство ранней стадии мышных эмбрионов. Эмбрионы повторно имплантировали ложно беременным самкам мышей и проводили скрининг полученного потомства анализом Саузерн blottinga. 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  $5 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>. 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 МАЛЬТА ЭДВАНС ТЕКНОЛОДЖИС ЛИМИТЕД  
КОМПОНЕНТ САЙЕНТИФИК ЭНД ИНДАСТРИАЛ  
РИСЕРЧ ОРГАНИЗЕЙШН

<120> Лечение и профилактика триппа

<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 триппа A

<400> 1	
agcraaagca ggucaaaauu auucaaaauu gagaagaaaua aagaauuuuam agaucuaauu	60
ucacaguccc gcacucucgca gauacuaaca aaaaccacug ugaccaauau ggccauauac	120
aagaauuaca caucaggaa gcaagagaag aaccucucuc ucagaauuag auggaauuag	180
gcaauuauu accucaucac agcggacaaag acaauuuauag aagaauuuuc uggaaauuau	240
gaacaaggcc agacgcucug gagcaagaca aauuauuug gauucggacag ggugauuug	300
ucuccccuau cuguaacuuu guggaaauuagg aauuaggccgc cacaaggugc aguccauuuu	360
ccaaagguuu acaaaacaua cuuugagaag guggaaagg uaaaacauuagg aaccuuucggu	420
cccgauuuu uccgaaacca aguuuauuuu cccggccgag uggauuuuuu uccuggccau	480
gcagauuca gugcuaaaga agcacaagau gucaucaugg agguuuuuu cccaaauuau	540
guggagggca gaaauuauuac auaagagugc caauuugaca uaaucggaa gaaagaaagaa	600
gacuccaaag aauuauuauu uggauuuuuu augguugcau acauuguugg auggggacug	660
guccggccaaa ccgauuuuccu acgggugacg ggccggaaaca gcagugugua cauugaggua	720
uugcauuuua cucaaggac cugcugggaa cagaauuaca cuccaggccg aagagagaga	780
aaugacgaug uugaccacag uygauauauc gugccggaaac aauuuguuuag gaggacaaac	840
guaucaaggcc auccacugug gagauguguc acagcacaca aauuuggugg	900
auaaggauug uggacauuccu uaggcaaaa ccaacuagg aacaaacuug ggauauauugc	960
aaacacgca ugggucuug gaucauucu uccuuuauu uuggaggccu cccuuucaaa	1020
agaaacaug gaucauucgu camgaaggaa gaggaauguc uuacaggca cccucaaca	1080
uugaaaaauu agauacauu gggguauuag gauuuuacaa ugguuggccg gaggggcaaca	1140
gcuaucucca gggaaagcaac uagaaggccu auuucaguuua uaguauuggg aagagacgaa	1200
caaucaauu cugaggccau cauuguuagc auggguuucu cacaggagga uugcaugaua	1260
aaggccgucu gggggccauu gauuuuucguu aaccaagccu accaaagguu aaaccccaau	1320
caucaacucc uggacacauu uaaaaaggay gcaaaagugc uauuuuagaa uuggggauuu	1380
gaacccauu auuauguuau gggggauuac ggaauuuuac cugacauugc ucccgacaca	1440
gaaauuucac uggagggag uagaguauu uaaauugggg uggauuauuuu uucccagcacu	1500
gagagaguu uuguaauuu uggccuuuuc uuaaggguuuc gagaucuagc gggggacqua	1560
cucuuauucu cccggccggg cccggccggg cccggccggg cccggccggg cccggccggg	1620
ucaucauca ugauguggga auucaacggu ccugagucu uggauuauuuu cccuuucaaa	1680
uggaucauca gaaacugggg aacuacggaa auucaagggu cucaagaccc cacggacug	1740
uacaauuaga ugggauuugga accguuuuacu uccuuuugua cyaaggccu cagaggucuu	1800
vacagugguu uugugagaaac auuauuuucaaa caaaaggccu acguacuggg gacauuuugau	1860
acugucccga uuaauaaggcu gcauacuuu gcaacggcc cccggccgg gaggccaaug	1920
cauuuuuuuu cucauacguu gaaauuuggg ggcucaggaa ugagaauuuu cccggccgg	1980
aaauucccuu uguucaacua caauaaggca accaaaaggcc uuacccuuu uggaaaggac	2040
ccaggccauu uaccaaggaa ucccaaggag gggccacccg gaguggaauc ugcaguacug	2100
aggggauuuc uaaaaucuagg caaggaggac aaaauuauu gaccacauu gaccaucaau	2160
gaacuugggaa auuuuugccaa gggggagaaa gcauauuguc uggauuuggcc agggacug	2220
guguugguu uggaaacgaa acgggacucu agcauacuuu cugacagcc gacggccacc	2280
aaaagaaauuuc ggauggccauu caauuauu gcaauuuuuu aaaaacgacc uugguuuucu	2340
w	2341
<210> 2	
<211> 2341	
<212> РНК	
<213> Искусственная	
<220>	
<223> Консенсусная последовательность гена PB1 вируса триппа A	
<400> 2	
agcggaaagca ggcuaaccau uugaaaggau gucaauccg cuuuacuuuu cuuugaaagca	60
ccagugccaa auggcaauuag uaccacauuc cuuuauuacug gagacccuuc auacaggccau	120
ggaacaggga caggauacac cauggacaca gucaacagaa cacaccaaua uucagaaaaag	180
ggaaguggaa caacaaacac agagacugga gcaccccaac ucaacccgau ugauggacca	240

cuaccugagg auuaugagcc caguggguau gcacaaacag auuuguguauu ggaagcaauu 300  
 gcuuuccuuu aagaauucca cccagggauc uuugaaaacu cggucuuuua aacgauggaa 360  
 auuuguuucaac aaacaaggau ggauaaccu acccaagguc gccagaccua ugacuggaca 420  
 uuugaaauagaa accaaccggc ugcaacugc uuggccaaca cuuavaaaaa cuucagauu 480  
 aacggucuua cagccaauga auccgggacgg cuuauagauu uccucaagga ugugauugga 540  
 ucaauuggua aggaagaaaa ggagauaaca acacauuuucc agagaaagag aagrgugagg 600  
 gacaacaua ccaagaaaaa gguccaccaa aagaacauuag ggaagaaaaa acaaaggcu 660  
 aacaaaaaga gcuaccugau aagagcacug acacuagaaca caauugacaa agaugcaga 720  
 agaggcaau ugaagagggc agcrauugca acacccggaa ugcaauuac aggauucus 780  
 uacuuuungu aaacacuacg gaggagauuc ugugagaaac uugagcaauu cggacuccca 840  
 guccggaggg auggagaaga ggcuaauuug gcaacacuug ugaggaaau gaugacuac 900  
 ucacaagaua cugacuucu cuuuacauu acuggagaca auaccaauuug gaugagaaau 960  
 cagaauucca ggauguuuuc ggcuaauuua acruacaua caaggacacca gccagaaugg 1020  
 uuucggaaug cuuuuaagcau ugcycuuua auuuuucua aaaaaauuggc gagayuagg 1080  
 aaaggauaca uguuucgaaag uaggagcaug auuuuaacgaa cacaauuacc agcagaaaaug 1140  
 cuugcaaca uugauuuuua auacuuuaua gaaauuaacgaa aaaaagaaaau ugagaaaaau 1200  
 agrccucau uuaauaggg uacagcetu uuggccuu gaaugauug uggcauuuuc 1260  
 aacauugcuga guacaguccu aggaguyuca auccugauu uuggacagaa aagguaaccc 1320  
 aaaaaccacau auuuggggg cggacuccaa uccucuugau auuuocucu caucguaaaau 1380  
 gcaccgaauu auvaggggau acaagcggaa guggauugg uuuuauaggac uuguaauacu 1440  
 guuuggaaaua auuugagcaaa gaagaagcua uacauuuauu ggcacggjac auuuuauuuc 1500  
 acgacuuuun uuuacccgca uggauuugua gccaaauuua guaaggagcu gcccaguuuu 1560  
 ggaqgucuug gaaauuaaua auccggccgac uugagcauug guguuuacgu gauuaazaac 1620  
 auuauugauua acaacgaccc uggggccgca acaagcucaga ugugcucuuca gyuauuucuac 1680  
 aaggacuaca gauuacacaua ccgaugccac agggggaua cgcaauucca aacragggaga 1740  
 ucaauucgac ugaagaagcu guggggacaa acccgcuuca accgaggacu guuugguuuca 1800  
 gauggggac caaaucuuua caauauccga aauuccauua uuccugargu cugeuuruua 1860  
 uggggauua uggauuaga uuacceaggc agacugugua auuccugaua uccruuucuuc 1920  
 agccauaagg aaaaauuau uguuacaaau gcuuugauua ugccagcuuca uggccggcc 1980  
 aagagauugg auuauugauuc cguuugcaacu acacauuuau ggaauuccua aaggaaaycu 2040  
 uccauuuucau avacgaguca aaggggaaau cuuaggggau aacagauugua ccagaagugc 2100  
 ugcaauuuau ucgagaaaa cuuccccccagc aguuuauuac gggaggccu uggeauuuucc 2160  
 agcauggugg aggcauggu gcuuaggccg cgaauuugacg cacgaauuua uuucgacuca 2220  
 ggaaggauua agaaagaaga guuuggcugag aucauagaaga ucguuuccac cauugaagar 2280  
 cucagacggc aaaaauuug uuuuauuucu guuccuucguu aaaaauuqcc uuguuuucuac 2340  
 u 2341

<210> 3  
 <211> 2181  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> Консенсусная последовательность лёжа РНК вируса гриппа А

<400> 3	
auugagacu uugugcgaca uugcuuaua ccaauuauu ugcacuuuug gggaaaaggca	60
auugaaagaaau uuggggaaau uccgaaaaauu gaaaccaaca aguuuugcugc aauauucaca	120
ccuuuugggg ucuuuuuuauu gaaauccgaa uuuuccuuua uugauuacg gggggaaauca	180
auuaauuquag aauuccggaga uccgaaauugca uuuuugaaac accgauuuga aauuaauugaa	240
ggaaagagacc gaaacgauuggc cuggacugug gugaaauugua ucugcaacac cacaggguu	300
gagaacaccua auuuuucccc agauuuugauu gacuacaaag agaaccgauu caucgaaaau	360
ggggugacac gggggaaau ucauacauac uauccggaga aaccccaacaa gaaaaaaaucc	420
gagaagacac auuuuucacauu auuuuucacauu acagggggggg aauuggccac caaagccgac	480
uacaccuuuug auugagagag caggccaaaga auuuuauucca ggcuguuuac cauuaaggca	540
gaaaauuggccu guauggggcuc auuggggauuc uuuucguuauu cccgaggggg cggagagaca	600
auuugagaca aauuuuugaaau cacuggaaacc uggccgacac uggccacucca augguccucca	660
ccggacuuuucu cccggcuuuga aacccuuuaga gccuuauuggg auuggggcugc accggaaacggc	720
ugcauugagg gcaaggccuuuc ucaaaauuca aagaagauu auggcuuauu ugagccauuu	780
uugaaagccaa cccggccccc uucuacgacua cccuauuggc cuccuucguc uccggccuc	840
aauguuccuuc uggggggcuc cuuuuuauua agcaucgaaag accccggacuca ugagggggag	900
ggggauaccc uuuacggauuca auuacaaugc auuacggacau uuuuucggug gaaagggccc	960
aaacauucguga aaccacaua aaaaagguaa aaccuuuauu accuccuuggc uuggggcaaa	1020
gugcuggccag aacuccaaaga uauugaaaaau gggggaaaaa ucccaaaaaa aaaaacaaug	1080
aaaaaaaacaa gccaaauuugaa gggggccacum gggggaaaca ugcccacca gaaagggcag	1140
uuugaggacu gcaaaagauu uaggcaucua agacaguauu acagugauug accagacuca	1200
agauacacuag caacggccau ucaagagaua uuuuacaaagg cauugauauu gacagauuc	1260
auuuggggauu aauuugagya auuaggaaag gacugauuca caauugagca cauugcaagu	1320
augagaaggaa acuuuuuuuac agccggauua ucccaauuca gggccacuca auacuuauug	1380

aaggagugu	acauaaacac	agccugug	aaugcaucc	gugcagccau	ggaugacuuu	1440					
caacugauuc	caugauaaag	caauugcaga	accaaaggaa	gaagccggaa	aaacuaucuq	1500					
uauggauuuca	uaauaaagg	gagaucccc	uaugggaaug	aaucggugu	gguaauuuuu	1560					
gugagauugg	aaauucucu	uacugaucc	agrcuggagc	cacacaagq	ggaaaagua	1620					
uguguccuc	agauaggaga	caugcuccc	cgagcugcag	uaggcaagu	uucamggccc	1680					
auguuccu	auguagaac	caauuggaacc	uccaagauca	aaaugaaau	gggcuugggaa	1740					
augaggcgu	cccvuucu	aaucuccuca	caauuuuua	gcaugauuu	agccagucu	1800					
ucugucu	agaaggacau	gaccaaagaa	uucuuuugaaa	ayaaucaga	aacauggcc	1860					
auuggagagu	cccccaagg	aguggaggaa	ggcucccauc	gaaaggug	cagaaccuu	1920					
cuggogea	cuuguuuca	cauuuuauuu	gcaucuccac	aaucgggg	guuuuucagcu	1980					
gaaucaagaa	aaauuuciu	cauucuicag	gcaucuuagg	aaacuccgg	accugggacc	2040					
uucgaucuu	gagggcua	uugaagcauu	gaggagugcc	ugeauuaacg	uuccugguu	2100					
uugcuuaau	cgucuuggu	caucuccu	cuucacaa	cacuuaaua	guuguggca	2160					
ugcuacua	ugcuacua	uugcuacua	uugcuacua	uugcuacua	uugcuacua	2181					
<210> 4											
<211> 1565											
<212> РНК											
<213> Искусственная											
<220> Консенсусная последовательность NP вириуса триппа А											
<223> Консенсусная последовательность NP вириуса триппа А											
<400> 4											
agcaaaagca						ggguagauua	ucacucaccc	agugacauca	acaucauggc	gucucaaggc	60
accaaaacgau						cuuauugaca	gaugggaaacu	gguggggaaac	cccgagaauc	uacugagau	120
agggcaucu						uuggaagaa	gguuuaggc	auuggggagg	ucauacauca	gaugugcaca	180
gaacucaaac						ucagugacu	ugaaggagg	cugauccaga	acagcauac	aaugagaga	240
auuggacu						cugauuuu	ugaaggagg	acacauacc	uggaagaaca	coccagugc	300
ggggaggacc						cgaaagaa	arac	uggaggucca	uuuuuucg	ggagagacgg	360
agagagcua						uucuguac	caaaagagg	aucaaggagg	uuuggcgu	aggeacaaau	420
ggagaggacg						caacucuc	ucuyaccac	cugauuuau	ggcauucca	ucauaau	480
ggccauau						agagaa	cgac	cgucucueg	cgucucug	uggaccagg	540
cugaucaag						grucacu	cccgagg	ucugggg	ccggggc	aguraagg	600
guagggacaa						uggugug	gcgauuuc	augauuaac	ggggauca	ceacggaa	660
uucuggag						gcgaaau	agg	gagauuu	augagaga	uugcaacau	720
cucaagg						aauc	caac	agaccaua	uggauca	gcgagag	780
agaaaucc						qdaau	uug	cuuauuuu	uggcact	uugcucu	840
cugagagau						cagug	ccca	uaaggu	uugcc	uugcugac	900
ggcagugau						augac	uug	gagaa	uacuc	uuggaa	960
cugcuu						aaac	ad	gcau	uugg	uuggc	1020
agucuuu						uug	ggc	acac	uugg	uuggc	1080
uucaucag						ggca	aaag	gacar	uuuc	uuggc	1140
gcuucau						aggaa	agg	ccacc	agg	gguuu	1200
uugggcua						uac	agg	ccaa	uuc	uuggc	1260
auacgcuu						uuc	agg	acc	acc	uugcagg	1320
auuggcua						uac	agg	ac	ac	uugcagg	1380
agaaauug						aa	agg	cc	cc	uugcagg	1440
cucucgg						aaa	gg	aa	cc	uugcagg	1500
uucuuuuu						ucg	gag	aa	uu	uugcagg	1560
cuacu											1565
<210> 5											
<211> 1122											
<212> РНК											
<213> Искусственная											
<220> Консенсусная последовательность гена M1 вириуса триппа А											
<223> Консенсусная последовательность гена M1 вириуса триппа А											
<400> 5											
ugcaggaaau						cgauagcaga	aagcaggua	auguugaa	augagucuu	uaaccgggu	60
cgaaacguac						guucucu	ucaucc	cg	cc	u	120
aciuuagau						guuuu	cg	aa	cc	u	180
gacaagacca						auccu	uuc	cg	cc	u	240
cguuucca						gagcgg	gg	cc	cc	u	300
ugggauucc						aaauuu	uagg	gg	gg	u	360
aaacuuucca						gggg	uagg	gg	gg	u	420
cauggguc						auauacaa	gg	gg	gg	u	480
guugucacu						uug	gg	gg	gg	u	540
uaucaccaac						ccac	uug	gg	gg	u	600
ggcuuau						agg	gg	gg	gg	u	660
ucaggcua						cg	gg	gg	gg	u	720
uggcugaga						gauau	uuc	uuc	uuc	u	780

gaugcagcga	uucaagugau	ccumuuuuug	uugccgcaar	uaucuuuggg	aucuuugcacu	840
ugauauuuug	gauuuuuuuau	ccuuuuuuuu	ucaauuuuuau	uaauuuuuuu	uuuuuuuuuu	900
guuuuuuuuu	aggccuuuuu	ccggcaggrr	uaccuuguuic	uaugaggggaa	gaguaccggc	960
aggaaacacaa	gagggcggug	gauguuuugc	uugguuuuuu	ugucaacaua	gaauuuggaa	1020
aaaaaaacaa	cuuuuuuuuu	curmkrcogs	wwkacuuugua	cagcucuucc	augccgagaa	1080
ugaucccgcc	ggccggccac	aacuccagca	ggaccggcaug	uu		1122
<210>	6					
<211>	19					
<212>	РНК					
<213>	Искусственная					
<220>						
<223>	нить dsРНК					
<400>	6					19
caggauacac	cauggauac					
<210>	7					
<211>	19					
<212>	РНК					
<213>	Искусственная					
<220>						
<223>	нить dsРНК					
<400>	7					19
gaucuuuucc	accuuuugaa					
<210>	8					
<211>	19					
<212>	РНК					
<213>	Искусственная					
<220>						
<223>	нить dsРНК					
<400>	8					19
cgggacucua	gcacuuuuua					
<210>	9					
<211>	19					
<212>	РНК					
<213>	Искусственная					
<220>						
<223>	нить dsРНК					
<400>	9					19
gcaauuugagg	agugccuuga					
<210>	10					
<211>	21					
<212>	РНК					
<213>	Искусственная					
<220>						
<223>	нить dsРНК					
<400>	10					21
ccagggaaau	cugagauca	a				
<210>	11					
<211>	21					
<212>	РНК					
<213>	Искусственная					
<220>						
<223>	нить dsРНК					
<400>	11					21
gaguuauuua	ggauuuuuuu	u				
<210>	12					
<211>	21					
<212>	РНК					
<213>	Искусственная					
<220>						
<223>	нить dsРНК					
<400>	12					21
auccuuuuuu	uuccggagaa	a				
<210>	13					
<211>	19					
<212>	РНК					
<213>	Искусственная					
<220>						
<223>	нить dsРНК					
<400>	13					19
ggauuuuuuu	uuuuucggag					
<210>	14					
<211>	19					
<212>	РНК					
<213>	Искусственная					
<220>						
<223>	нить dsРНК					
<400>	14					19
cacuuauca	acaugagaa					
<210>	15					
<211>	19					
<212>	РНК					
<213>	Искусственная					
<220>						
<223>	нить dsРНК					



cagtgcctca	tgttcaacgtt	cactaattca	aaacagaaaa	aaaaaaaaag	attctctgtca	3480
tggttttttt	ttgtctgttt	gtttgtttgt	tgttttttcc	tacttaatgt	cttgcctcc	3540
catttacact	ggaattttat	tcgttacact	cggttatttt	ggtattttac	atttaatate	3600
tttagcaaat	cttctgtgt	tagccagatt	acttcaacat	aaatgttctg	gtttctggga	3660
aggatgocca	tccttgagat	atgcaggtc	aggctggatg	gggtgctgg	cacctgtatgg	3720
agctgtatgt	gtccctgttc	atggcagggg	atggaaactg	atggccctt	aggggcttct	3780
ttcaactca	acagtgtat	gattctgtgg	tttccaaggaa	tagggaggg	ccttaacat	3840
aaagctagac	tgggaaagaa	gaaaaagaca	aaattcttgg	gttattttat	tgctttggta	3900
gttccatcg	cagataaaat	tatagggtctc	ttcttggct	agtgtaagaa	atgcctggga	3960
atcatttt	cacaaaaat	tttctgtttt	cattttttct	tctgtactta	ccaaatcacac	4020
taaatggat	ggatataat	tttgggggt	tgagcagaaa	atgttcttaa	gtttaatata	4080
caatttctca	catttaaat	gtgcaaatat	tttgggggt	gttagtaggc	tttgcctcc	4140
tgaatattac	ctttatgtt	taatcagggt	atgcctccag	ttgtcagaat	agccactaac	4200
aataatgtt	tttctctacta	atggaaatgt	ggcaaacatt	atattcagg	gattactaat	4260
aatttttaagg	aggaagtctt	ttcaatctaa	ttaacaagaa	atgtgagtaa	caaatgacgg	4320
stattttca	taaacaaca	gtcatcttc	cttacatgtg	taatataac	attgatattt	4380
acataaagcc	gtcagaaatc	ttcacaagtc	ttggatagt	ccagattgt	actctgtat	4440
cttagtctca	tcaggatgt	atgactcaga	aacgtttagt	ctatcaac	agtttccaaac	4500
tcttccttc	ttttaatgt	tttggagact	ctactctga	ccagctggc	tttgaagtaa	4560
atctccatca	ctcatcatca	gcacactttt	tttggaaagc	ccgttcaactt	atagaatct	4620
actttatgt	tggtctgtat	acatgttgg	aaactgtgg	atcaggggag	cgggactgt	4680
cgtacagaa	gggaaaatat	gattggaaac	tccttggct	gcaatctatt	taaatctcga	4740
gctegcga						4749
 <210> 17						
<211> 4700						
<212> ДНК						
<213> Искусственная						
 <220>						
<223> Конструкция нуклеиновой кислоты						
 <400> 17						
agcttgcatt	catttaatgt	acagcagcag	gtgaaagaca	gacataaac	caggcacage	60
actcctgtgt	acctcaaaaq	gcatacgat	tttgcattcc	acttcaagg	aaatgtttgt	120
cccaacttc	tctgtactgg	tgcagccatca	cattcagac	tgtgtgoagt	tctggggac	180
acagtatata	aaggacataa	sactagtata	gagcacccaa	aggaaaggta	tgaagatgg	240
gaagggtgt	gaggaatggc	tgagggtcc	tggtctgcac	agcccaagac	agaggaggtc	300
tgaggagac	actctatggc	gcctatgtgt	ccttcagagg	gggttggagg	ggaaatgtct	360
agatgtgttc	cctgtatgaca	gcacacggc	ttgaaacagac	atgtgggggt	aggaaaagg	420
tcttcaccc	aggggcgttgg	gcatggaaaca	ggctccctag	ggcagttgg	atgaccctga	480
gttactttag	ttaaaggaaac	agagggttgg	acatgtat	tttttgatgc	cccttccagc	540
ccttgaataa	ctgtgtgtga	ttttgtgaga	gtttttggc	ataacttca	ggaaaagggt	600
ttgaattttg	gggtgggtct	tgtggatgtc	ggagttggac	tcggatgtcc	ttgttgggtc	660
cttccaaactc	acataatttt	tggttctat	gatacatgg	ccgttacatc	aaatccaaa	720
agtccttttg	atcccaactc	ctcatgtccc	actaaatata	tcctactat	atcccttcat	780
attattacag	aatgtctca	gtcacaacta	acccaaaat	tgaagaaat	ggatctgtat	840
gttttgaatc	agagctatgt	gactttaaaag	tagttccaa	ataatcttaa	agacatgg	900
tcatgttca	actgtatcatg	aaaaggagaa	agaaaccccc	agctccacc	tcccaatcc	960
acagaccc	acgttttcc	tgcgtgtcc	gastctgaga	taccactcg	ggacacgtta	1020
tgttagtca	agatctgtat	ccattactt	tcaatgtgag	tacactata	1080	
ttgtctgtat	gtatattgt	gtatattgt	gtatattgt	caattttca	tcttttctc	1140
tactgttct	gtccccgtta	atacaacatgt	ataacaggtt	ttggcataaaa	gccttttgt	1200
gagagctgt	gacaatgtc	tctgcagggtc	ccatgttccc	agtaggacac	ctgagttctac	1260
tggggatgt	ctgtgtggaa	tctcccaaga	catgtgtgg	accacagac	agttgtactg	1320
ctgacaccc	agagctgtata	gtctgtgg	ccatgtgtgg	atcgatgtcc	1380	
tcggcactatg	ctggcatttg	gtcgtacaaac	ctggggact	tccaaagg	agggtactgc	1440
tgtgttggaa	caaggactgc	agacagaaac	ctggggaaa	aaaggccac	agggttct	1500
gagacccac	ttggggatcc	ttaattact	ggaaacttgg	acgttgaaat	catatataat	1560
tcaatgtca	agtttatttt	atctgtcag	aaattgtgtt	tcaagaagg	agataacaca	1620
gggttaatgtc	ataacacttt	cacctaacc	catggtagt	aaaccatgt	tacactgtat	1680
ctcatacttc	tgcctccaaa	cagcaaacat	tcgacatgtc	tgcgttgg	agcacgttga	1740
tgtttctgg	attggggcc	cgggaaatcg	atgtgtgg	cggtggaa	1800	
cgggttcc	ccccccccct	atatgtcaag	caaaaactt	ccggccctgc	accggcgca	1860
atcgaaag	attttggca	tttcagatcc	aaaaaaaac	ccaaaacttc	tgcgaaaag	1920
aaagaatctc	agcggtat	atagggtatt	ttgtttaaga	gtgtatcca	gaagaagaaa	1980
tatgtcaata	caacgccc	tcacccgtac	tttaataatca	tgatataata	gaggcttata	2040
tactgttca	gagactatgg	gtttagatct	ttttccat	tgtttcaag	agattcaat	2100
gtggacac	actcttttgg	aactcgacc	aagaacc	cgctgtggc	ctttaaagtcc	2160

cacccaaact	ctgaagaaac	gaagccagac	ccggcactca	gcgggcagcc	cgcgcctccc	2220
gcgcgcggcc	actgcgcgcg	gcgtgcatt	gatatacgccg	gtgcgcgcg	ggggaaactc	2280
acccctcaaa	gtccggcccc	cgcttcgcgc	ccgtgtcccc	gcacccatcc	agtgtgtgc	2340
gtctgtctgt	tcocccagca	cgcacttcc	gtctgttcca	cccgagggt	tgcctatcc	2400
tttaggtttc	tatttttag	gatataata	ccgccttagga	ggtagagata	ttccgggact	2460
cttagatact	tatccaaag	ataagtatgc	tagagtcgc	tttttggaa	ctcgacgagg	2520
ctcaagtgtca	cgcagagcgc	gggcgcgcgc	ctccgcgcgc	tcgcgtcc	gcgcggcaagg	2580
caggggggcc	ggcgccgc	ccgcgcgcgc	gcgcgcgggg	aggctctgt	ttgcataacy	2640
cgcaaggcc	gtctggaggaa	aaaggaggcc	agaaagagcc	ttaacgtgc	ccgagtgtt	2700
tagagcaaa	gcattcagac	ctgaaagcgc	gcgtggagat	gcctctgcgc	ccattttact	2760
ggaacgttca	gaccacccgc	aagtccacgt	gacccgtgg	acatgtgc	gttggccgtt	2820
atatacgact	tggggcgcgt	cgtagtttc	aggatacacc	atggatactt	caagagatg	2880
tccatgggt	atccgtttt	ttggactcga	gatcaactag	tgaattcgcg	gcgcgcaatt	2940
ccatccact	goggggggtc	caagtgcattg	gactgtatct	ctttaacgtc	tttataatgt	3000
acccatggaa	tggttattgaa	tgaacctgtt	gtggagttgt	gtatgtgc	ctgggtgtca	3060
cagttatata	gagagaagg	agagaaatata	gagagaataa	ttggggaaac	tagacttgtt	3120
cagaagaaaa	gggtccaggc	agatcttact	gcacccctcc	agttattaa	gatatcttgt	3180
ccctccagg	aacaggaaaga	ttttaaaaaa	aaaaaaatgc	accataaaaa	aaaaaaaat	3240
actatgtca	agtaaggaaa	tccagtaaac	aagaaaaaaa	gatatttaata	atatggatta	3300
ctttaatgtt	tgaatttattt	tccttcaat	agatgtactt	tttggaaat	tctgtatagt	3360
gccttatacc	tcatgtgcct	atgttcacgt	tcaacttcc	aaaacagaaa	aaaaaaaata	3420
gattctgtc	atggttttttt	tttgcgtgt	ttttgtttt	ttttttttt	ctactttaaga	3480
tcttgcctc	ccatatttac	tggatttaa	ttcgtgttcc	cggttaatcc	ttgttatttca	3540
catcaatata	ctttagatca	tctttctgt	gttgcgcgc	tactccaa	taagattttt	3600
gggttctgg	aaggatgc	atcccttgc	tatgtcaagg	caggctggat	gggggtgtgg	3660
gcacccgtat	gaggtgtata	tgtccctgtt	cattgcagg	gatgttgc	gaatggccctt	3720
taagggtcc	tttcaactca	aacagtgtat	tgttttgc	gtttccaaagg	ataggggagg	3780
toctaaatc	caaagctaga	ctggggaaag	aaaaaaaagac	aaaatatttt	gttttttca	3840
tttgcgttgc	agttccatca	gcagataaaa	ttatgtgtt	tttttttttgc	tagtgcata	3900
aatgcctgg	atccattttt	tcacaaaaat	tttgcgttt	gtatgtttt	ttttgtactt	3960
accacatca	ctaaatgtat	tggattaaaa	ttttgggggg	tttgcgttgc	aatgttttta	4020
agttatata	tcaatttttc	acataaaa	ttgtgcata	ttttgggggg	tttgcgttgc	4080
ctttgcct	ctgaaatata	ctttatgtt	ttatgtgtt	gtatgtccca	ttttgtgcag	4140
tagccactaa	caataatgtt	tttccatct	aatggggaa	tggcaacat	tatattcgt	4200
ggattactaa	taattttaa	gaggaggct	tttcaatcta	attacaaga	aatgtgtata	4260
acaatgtac	gatatttgc	ataaaaaaac	atgtcatctc	tcttacatgt	gtaaatataa	4320
cattgttattt	tacataagcc	atgcagaaat	tttcacaatg	tttgcgtatgt	tccagatgt	4380
aactcctgtat	gttgcgtat	tatgtacttgc	aaacgtttagt	tctatcaacc	4440	
tagttccaa	ctcttccctt	cttttaatgt	tttgcgttgc	tctactctgc	accagccctgg	4500
ctttgcgtat	aatcttcttc	actcatatc	agcacatctt	ttttggaaa	ccacgtcact	4560
tatagaaatcc	tacttatgtt	gttgcgtat	gaacatgtt	taactatgt	gttgcgttgc	4620
gcggggatgt	gcgttgcgtt	aggggaaaata	tgattggaaa	ctccctgtgc	tgcaatctat	4680
ttaaatctcg	agctcgccaa					4700
<210>	18					
<211>	4706					
<212>	ДНК					
<213>	Искусственная					
<220>						
<223>	Конструкция нуклеиновой кислоты					
<400>	18					
agcttgcatt	catttaatg	acacgcgcgc	gttgcgcgc	gacataaac	caggccacgc	60
actccgttgt	acccatccaa	gcacttgcgtt	cttccatgtcc	acttcaagg	aaatgttttt	120
cccaactctgc	tctgcactgg	tgcgcgcctca	cctcgagcac	tgtgtgcgtt	tctggggacc	180
acagttatgt	aaggacataa	aactgtata	gaggccacca	aggaaaggct	tgaagatgg	240
gaagggtgt	gaggaaatgc	tgagggtccct	tggctctgc	agccgcgcgc	agaggaggatc	300
tgaggagac	actcatgtca	gccttatgtt	cctcaagagg	ggatgttgc	ggatgttgc	360
agatgtgtc	cctgtatgt	gcaacaggac	tttgcgttgc	atgtgggggtt	aggaaaaagg	420
tcttcaccc	aggccgttgc	gtatgttgc	ggctccctgt	ggcgttgcgt	atgaccctgt	480
gttactgtat	ttcaaggaaac	agagggttgc	atcatatgt	tttgcgttgc	cccttccagg	540
ccctgaaatc	ctgtgtgt	tttgcgttgc	gttgcgttgc	aaatctctca	ggcaaaagggt	600
tttgcgttgc	gttgcgttgc	tttgcgttgc	gttgcgttgc	tttgcgttgc	tttgcgttgc	660
cttccaaatcc	acaatatttt	gtgttctat	gatatactgt	ccatgttccatc	aagatccaaa	720
atcccttttgc	atcccaatc	ctcatgtcc	actaaatata	tttgcgttgc	aatccttcat	780
attattacat	aatgtgtca	gttgcgttgc	acccaaaaat	tttgcgttgc	aatgtgtat	840
gtttgcata	agatgtgtt	gacttgcata	tttgcgttgc	tttgcgttgc	tttgcgttgc	900
tcatttgc	actgtatgt	aaaaggaa	agaaaccccccc	agccctccacc	ttccaaatcc	960







<210> 18		
<211> ДНК		
<213> Искусственная		
<220>		
<223> Праймер олигонуклеотида		
<400> 26		
cgaaagaaccc agccgtcgc		18
<210> 27		
<211> 85		
<212> ДНК		
<213> Искусственная		
<220>		
<223> Праймер олигонуклеотида		
<400> 27		
gggttcgagt tccaaaaaag cgcgttgc ctccatctt cttggaaatgt gagtaaacat		60
gcgttataa cccgttccctc ctgtat		85
<210> 28		
<211> 20		
<212> ДНК		
<213> Искусственная		
<220>		
<223> Праймер олигонуклеотида		
<400> 28		
gaatttgtggg acggccggaaag		20
<210> 29		
<211> 20		
<212> ДНК		
<213> Искусственная		
<220>		
<223> Праймер олигонуклеотида		
<400> 29		
caacacacacg tcaggcttcc		20
<210> 30		
<211> 83		
<212> ДНК		
<213> Искусственная		
<220>		
<223> Праймер олигонуклеотида		
<400> 30		
ctcgagttcc aaaaaaggat cttatcttctt cggagttctt tgaactccga agaaataaga		60
tccaaacccc aatgtctctc gga		83
<210> 31		
<211> 99		
<212> ДНК		
<213> Искусственная		
<220>		
<223> Праймер олигонуклеотида		
<400> 31		
ctcgagttcc aaaaaaactt acatgtttaagg ctatggatc aattcttctt aatattgtctc		60
catacgccatc gctgtatgtgg actaaagatca tcgagactgt		99
<210> 32		
<211> 83		
<212> ДНК		
<213> Искусственная		
<220>		
<223> Праймер олигонуклеотида		
<400> 32		
ctcgagttcc aaaaaagcaat ttgaggatgt cctgtatctt tgaatccggc actctctaat		60
tgcgaataatc tcttacccctc agg		83
<210> 33		
<211> 24		
<212> ДНК		
<213> Искусственная		
<220>		
<223> Праймер олигонуклеотида		
<400> 33		
gtcgacccgaa gaaccggacgc ctgc		24
<210> 34		
<211> 26		
<212> ДНК		
<213> Искусственная		
<220>		
<223> Праймер олигонуклеотида		
<400> 34		
gtcgaccaat ttggggacgg cggaaag		26
<210> 35		
<211> 26		
<212> ДНК		
<213> Искусственная		
<220>		
<223> Праймер олигонуклеотида		
<400> 35		
gtcgacccaga cagaacgtca gctttc		26

<210> 36		
<211> 20		
<212> ДНК		
<213> Искусственная		
<220>		
<223> Праймер олигонуклеотида		
<400> 36		
gagggtcaatgt gtcacsgcaga	20	
<210> 37		
<211> 83		
<212> ДНК		
<213> Искусственная		
<220>		
<223> Праймер олигонуклеотида		
<400> 37		
ctcgagttcc aaaaaaagatc tggccacca ttgaatctct tgaattcaat ggtggaaacag	60	
atcaaaacccc agtgtctctc gga	83	
<210> 38		
<211> 83		
<212> ДНК		
<213> Искусственная		
<220>		
<223> Праймер олигонуклеотида		
<400> 38		
ctcgagttcc aaaaaaagggg actcttagcat atttatctct tgaataagta tgcttagatc	60	
ccggaaataatc tctacccctc agg	83	
<210> 39		
<211> 87		
<212> ДНК		
<213> Искусственная		
<220>		
<223> Праймер олигонуклеотида		
<400> 39		
ctcgagttcc aaaaaaaatct tattttctcg gagacaatct cttgaattgt ctccgaaagaa	60	
ataaagataaa ccccaagtgtc tctcgaa	87	
<210> 40		
<211> 25		
<212> ДНК		
<213> Искусственная		
<220>		
<223> Праймер олигонуклеотида		
<400> 40		
gtcgacgagg ctcagtgtaa cgcaag	25	
<210> 41		
<211> 83		
<212> ДНК		
<213> Искусственная		
<220>		
<223> Праймер олигонуклеотида		
<400> 41		
ctcgagttcc aaaaaacagg atacaccatc gataactctct tgaagttatcc atgggtatc	60	
ctgaaagctt cggactgccc caa	83	
<210> 42		
<211> 83		
<212> ДНК		
<213> Искусственная		
<220>		
<223> Праймер олигонуклеотида		
<400> 42		
ctcgagttcc aaaaaaagatc tggccacca ttgaatctct tgaattcaat ggtggaaacag	60	
atcaaaagctt cggactgccc caa	83	
<210> 43		
<211> 46		
<212> ДНК		
<213> Искусственная		
<220>		
<223> Праймер олигонуклеотида		
<400> 43		
gaattccataa ccactgcgag ggtgccaatg catggactg atactc	46	
<210> 44		
<211> 32		
<212> ДНК		
<213> Искусственная		
<220>		
<223> Праймер олигонуклеотида		
<400> 44		
gatatctttaa ttaactggaa ggttgcagta ag	32	
<210> 45		
<211> 25		
<212> ДНК		
<213> Искусственная		
<220>		
<223> Праймер олигонуклеотида		
<400> 45		
gatatcttgt cccttccagg aacatc	25	

<210> 46		
<211> 32		
<212> ДНК		
<213> Искусственная		
<220>		
<223> Праймер олигонуклеотида		
<400> 46		
ctcgagattt aaatagattt 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		
gaatcccgag accatccacg tgctgtttac tgcaagctacg tcgaatg	47	
<210> 49		
<211> 34		
<212> ДНК		
<213> Искусственная		
<220>		
<223> Праймер олигонуклеотида		
<400> 49		
geatgcattt aaatgacacgc agcaggtgaa agac	34	
<210> 50		
<211> 26		
<212> ДНК		
<213> Искусственная		
<220>		
<223> Праймер олигонуклеотида		
<400> 50		
ggatcctcaa gtgggtgtc aggaag	26	
<210> 51		
<211> 87		
<212> ДНК		
<213> Искусственная		
<220>		
<223> Праймер олигонуклеотида		
<400> 51		
ctcgagttcc aaaaaatct tatttttcg gagacaatct ttgtattgt ctccgaagaa	60	
ataagatgac taagagcatc gagactg	87	
<210> 52		
<211> 21		
<212> РНК		
<213> Искусственная		
<220>		
<223> Последовательность, кодирующая dsРНК		
<400> 52		
cagcaccacaa aagaauucgg a	21	
<210> 53		
<211> 21		
<212> РНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Последовательность, кодирующая dsРНК		
<400> 53		
aagaauucgg auggccauca a	21	
<210> 54		
<211> 19		
<212> РНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Последовательность, кодирующая dsРНК		
<400> 54		
guuggauuuuuu dausdusuu	19	
<210> 55		
<211> 17		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Праймер олигонуклеотида		
<400> 55		
tgcggcccaaa acacgcaaa	17	
<210> 56		
<211> 20		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		



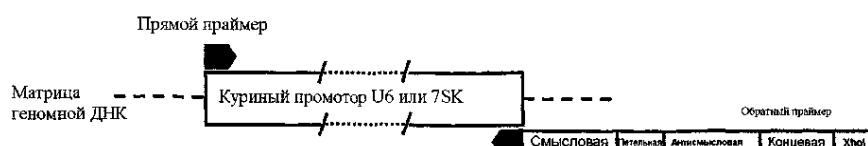




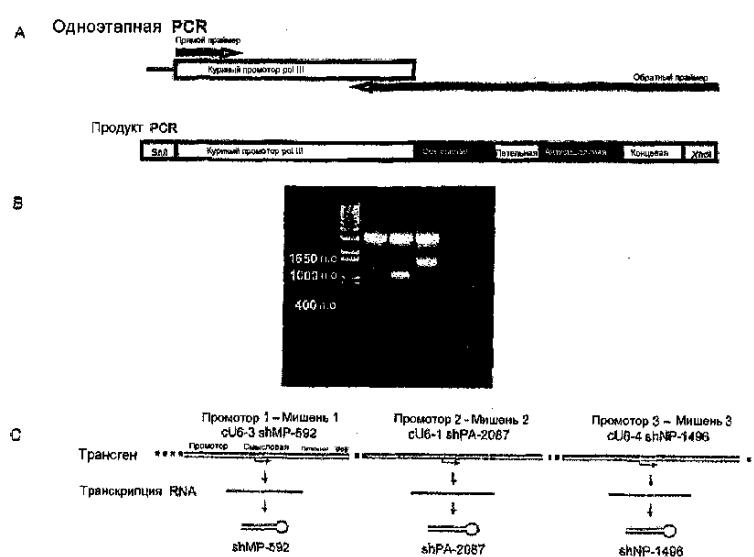
ttacactcaa aactactcta aattgacagc acagaagaga aagatcgga cttccaccca 300  
 tggctccagc agtaagcaac tgaaaatgtt ctcagttttt ccagtcacaa atgtgtctcc 360  
 agtcaactgtg aacaaagtcata tattaatgtt catcattcaaa ggacttcata ctttcagcac 420  
 tggatgttccatcata aagaggtgtt tagtacactg cagggctggca ttctgtcat 480  
 tacaaggccctt accttacgtt ccaagatagc tgaagtgctt ctgtatcgta aacagaaatgt 540  
 gactgtgtcc atgagtgttga ttgtatggat tgcaaccacca acggatgtt ggactgtcagc 600  
 tagaaaatgtt ttcatgtgtt taactgtctt ctggatcaac cctggaaatgtt tgaaagaca 660  
 ttccgtgtca ctggctgtca aagatgtt aatgggttcat atcttttgagg tactgtcccg 720  
 tgccatgtat gatataccat caggtatgtt aatactgtac aaggttgggtt gcaacaccac 780  
 agacagttgtt tccaaacttta tgaaggctt caggtttttt ggtgtggaaa acaatgtat 840  
 cgagactgtt gcaagaagggtt gtggaaatgtt tgacactgtat tctgtaaagggtt gtgggtgggg 900  
 aagtgtatgtt gtggaaatgtt aaggtgttca acgggtctgtt gccaaggacat atggcttcgtt 960  
 atttccatgtt cccaaacatc aaaaatgttgc ctgtatctt ctttacacttgc ttcgtatgtt 1020  
 tttgtatccaa aaaaatgttgc tttatgttca ctacaatgtt ctttacatgtt ctgttcttgg 1080  
 cttttatgttca ctggatgttca aatggatgtt ctttacatgtt ctgttcttgg 1140  
 atcagaatgtt ctttacatgtt ctttacatgtt ctttacatgtt ctgttcttgg 1200  
 ctttacatgtt ctttacatgtt ctttacatgtt ctttacatgtt ctgttcttgg 1260  
 attcacatgtt ctttacatgtt ctttacatgtt ctttacatgtt ctgttcttgg 1320  
 attcacatgtt ctttacatgtt ctttacatgtt ctttacatgtt ctgttcttgg 1380  
 gcccaacaca attcacatgtt ctttacatgtt ctttacatgtt ctgttcttgg 1440  
 acatgttcttgc ttttacatgtt ctttacatgtt ctttacatgtt ctgttcttgg 1500  
 attcacatgtt ctttacatgtt ctttacatgtt ctttacatgtt ctgttcttgg 1560  
 ttttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 1620  
 ttttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 1680  
 ttttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 1740  
 ggcctgtgtt ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 1800  
 tatcaagact aatacaccctt ttccgtatcgtt gctgtgttgc ttttgc ttttgc ttttgc 1860  
 ttttgc 1920  
 ttttgc 1980  
 ttttgc 2040  
 ttttgc 2100  
 atgtatgttgc ttatgttgc accattataa gctgtatgttgc acaatgttgc acaatgttgc 2160  
 gcatgttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 2220  
 agtgcacccgtt ctttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 2280  
 atttatgttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 2340  
 ggggttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 2400  
 agtgcgttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 2460  
 gtttgcgttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 2520  
 ggttgcgttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 2580  
 agtgcgttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 2640  
 gggataacgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 2700  
 agggccgttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 2760  
 ctggatgttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 2820  
 ctttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 2880  
 ttccgtatgttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 2940  
 gtttgcgttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 3000  
 ctggatgttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 3060  
 ctggatgttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 3120  
 ctggatgttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 3180  
 ctggatgttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 3240  
 ctggatgttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 3300  
 ctggatgttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 3360  
 ctggatgttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 3420  
 ctggatgttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 3480  
 ctggatgttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 3540  
 ctggatgttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 3600  
 ctggatgttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 3660  
 ctggatgttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 3720  
 ctggatgttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 3780  
 ctggatgttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 3840  
 ctggatgttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 3900  
 ctggatgttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 3960  
 ctggatgttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 4020  
 ctggatgttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc ttttgc 4080

tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgcgtg tttagatcca 4140  
 gttcgatgtt acccactctgtt gcaccccaactt gatcttcgcg atctttttactt ttcaccacgt 4200  
 tttctgggtt agcaaaaaca ggaaggcataa atgcccgtaa aaaggaaata agggcgacac 4260  
 ggaatgtt aataactcata ctcttcctttt ttaaatattttt tttagcattt tttttttttt 4320  
 atttgttcat gageggatac atatttgaat ttatgttataa aaataacaa atagggtttc 4380  
 cggcgacatc tccccgaaaaa gtggccacccgtt acgttcaaga aaccatattt atcatgacat 4440  
 taaacctataa aataaggctt atcagcgaccc ccttttgcgtt cggcggttcc ggtgtatgt 4500  
 gtgaaaaactt ctgacacatgtt cagctcccg agacgggtac agcttgcgtt tttttttttt 4560  
 cccggagcag acaaggccgtt caggccgtt cagccgggtt tggcggttcc gggggctggc 4620  
 ttaactatgc ggcacatcagag cagattgtac tttaggtca cccatgcggg tttttttttt 4680  
 cggcacatgtt cgtaaaggaga aaataccgc tccaggccca ttcggccattt cggctgcgtt 4740  
 actgttgggaa agggcgatcg gtggccgttcc cttccgttattt acggccgttcc cggaaagggg 4800  
 gatgttgcgttcc aaggcgattt aagttggtaa cccagggtt ttccaggatca cggccgttcc 4860  
 aaaaacgacggc cagttgttcc ggttttttttcc ctttttttttcc ctttttttttcc 4920  
 atggcccccggcc tgggttgcgttcc cccaaacgacc cccggccattt gacgttataa atgacgtatgt 4980  
 ttccatagt aacgcataa gggacttttcc atttgcgttca atgggtggat ttttttttttcc 5040  
 aaaaatggccca ctttggccgttcc catcaatgtt atccatgttcc aagttggcc ctttttttttcc 5100  
 tcaatgttccgttcc taaatggccca ggttttttttcc atgggtggat ttttttttttcc 5160  
 ctacttggca gtatcatcttcc ttttttttttcc atgggtggat ttttttttttcc 5220  
 agtacatcaa tgggggttcc ttttttttttcc atgggtggat ttttttttttcc 5280  
 ttgttttttttcc ttttttttttcc ttttttttttcc ttttttttttcc ttttttttttcc 5340  
 acaactccgc cccatgttccgttcc ctttttttttcc ttttttttttcc ttttttttttcc 5400  
 gcaatgttccgttcc ttttttttttcc ttttttttttcc ttttttttttcc ttttttttttcc 5460  
 tccatagaag acacccggaccc ctttttttttcc ttttttttttcc ttttttttttcc ttttttttttcc 5520  
 aactgttccgttcc ttttttttttcc ttttttttttcc ttttttttttcc ttttttttttcc 5580  
 cggatccgggttcc ttttttttttcc ttttttttttcc ttttttttttcc ttttttttttcc 5640  
 aggcctgttac ggaatgttta ctttttttttcc ttttttttttcc ttttttttttcc ttttttttttcc 5693

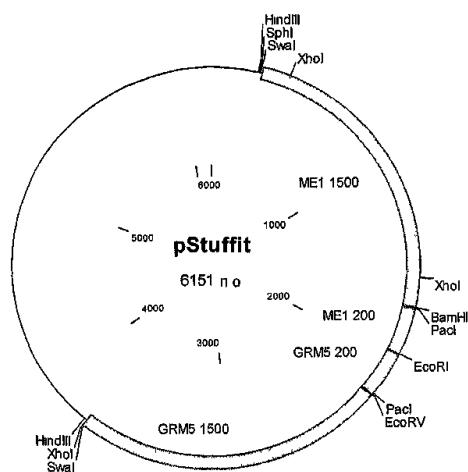
### PCR для кассет экспрессии shPHK



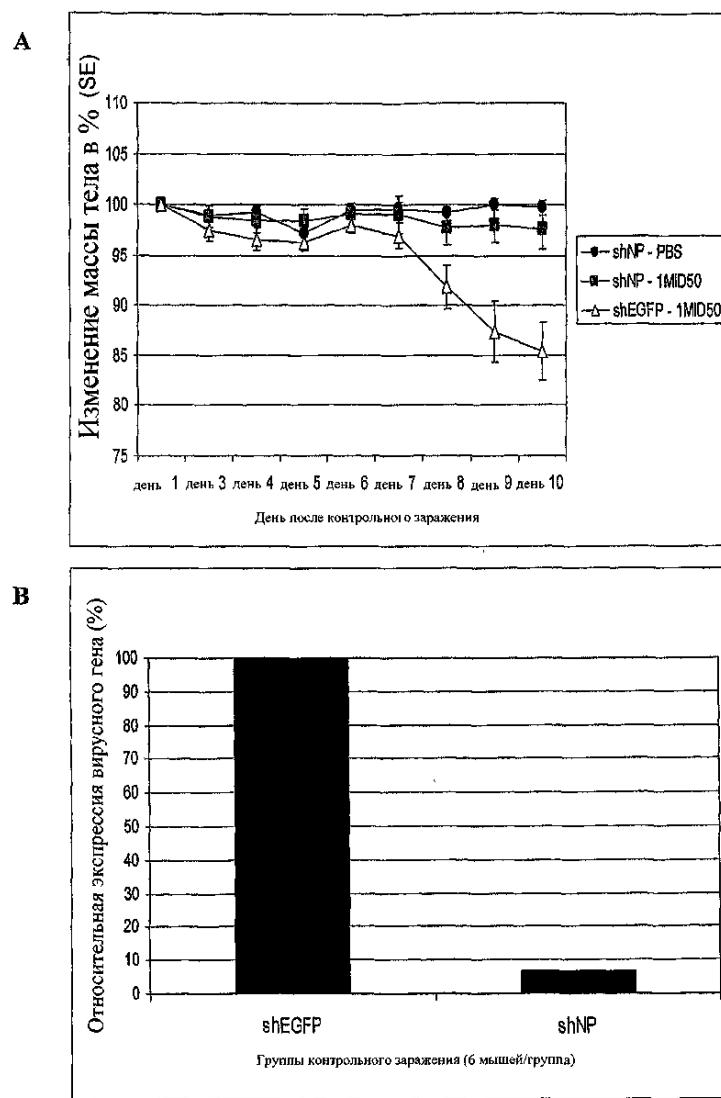
ФИГ. 1



ФИГ. 2



ФИГ. 3



ФИГ. 4



Евразийская патентная организация, ЕАПО

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