



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 88601

(13) C2

(51) МПК (2009)

C07K 14/715 (2006.01)

C07K 14/54 (2009.01)

C12N 15/24 (2009.01)

A61K 38/20

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ПРОМОТОР IL-18BP, ЙОГО ОДЕРЖАННЯ ТА ЗАСТОСУВАННЯ

1

2

(21) a200504334

(22) 09.10.2003

(24) 10.11.2009

(86) PCT/IL03/00815, 09.10.2003

(31) 152232

(32) 10.10.2002

(33) IL

(46) 10.11.2009, Бюл.№ 21, 2009 р.

(72) НОВІК ДАНІЕЛА, IL, РУБІНШТЕЙН МЕНАХЕМ,
IL, ХУРГІН ВЛАДІМІР, IL

(73) ЙЕДА РІСЕРЧ ЕНД ДІВЕЛОПМЕНТ КО. ЛТД.,
IL

(56) UA C2 85531, 10.02.2009.

WO A 9909063, 25.02.1999.

HURGIN V., Transcriptional IL-18 gene expression,
Journal of interferon and cytokine research, vol. 24,
no. supplement 1, page S.73

(57) 1. ДНК-послідовність, що кодує IL-18BP-
промотор людини з послідовністю SEQ ID NO:1,
або її фрагмент, що включає послідовність SEQ ID
NO:2 або SEQ ID NO:3, здатні керувати генною
експресією, де послідовності додатково включа-
ють 50 нуклеотидів з 5'-кінця послідовності SEQ ID
NO:5.

2. ДНК-послідовність за п. 1, яка додатково вклю-
чає інтрон.

3. ДНК-послідовність за п. 2, в якій даний інтрон
складається з першого інтрону IL-18BP.

4. ДНК-послідовність за будь-яким з пп. 1-3, що
додатково містить ген, приєднаний шляхом зши-
вання до IL-18BP-промотору.

5. ДНК-послідовність за п. 4, в якій вказаний ген
кодує IL-18BP.

6. ДНК-послідовність за п. 4, в якій вказаний ген
кодує гетерологічний білок.

7. ДНК-послідовність за п. 6, в якій вказаний гете-
рологічний ген кодує люциферазний ген.

8. ДНК-послідовність за п. 6, в якій вказаний гете-
рологічний ген кодує білок, вибраний з бета-
інтерферону, TNF, еритропоєтину, тканинного ак-
тиватора плазміногена, гранулоцитарного колоніє-
стимулюючого фактора, марганець-супероксид-
дисмутази, імуноглобуліну або його фрагмента,

гормону росту, FSH, hCG, IL-18, hsLDLR і TNF-
рецептор зв'язувальних білків.

9. Вектор, що включає ДНК-послідовність за будь-
яким з пп. 1-8.

10. Клітина-хазяїн, яка включає вектор за п. 9.

11. Клітина-хазяїн за п. 10, що являє собою клітину
ссавця.

12. Клітина-хазяїн за п. 11, вибрана з клітин CHO,
WISH, HepG2, Cos, CV-1, HeLa, Haka U937.

13. Спосіб одержання рекомбінантного білка, який
включає культивування клітини-хазяїна за будь-
яким з пп. 10-12 і виділення продукowanego реком-
бінантного білка.

14. Рекомбінантний вірусний вектор, який включає
частину геному даного вірусу, ДНК-фрагмент, що
кодує ген, який представляє інтерес, і ДНК-
фрагмент, що включає ДНК-послідовність, кодую-
чу IL-18BP-промотор людини, за будь-яким з пп. 1-
3, оперативно зв'язану з представляючим інтерес
геном.

15. Рекомбінантний вірусний вектор за п. 14, в
якому ген, що представляє інтерес, вибраний з
бета-інтерферону, TNF, еритропоєтину, тканинно-
го активатора плазміногена, гранулоцитарного
колонієстимулюючого фактора, марганець-
супероксид-дисмутази, імуноглобуліну або його
фрагмента, гормону росту, FSH, hCG, IL-18,
hsLDLR і TNF-рецептор зв'язувальних білків.

16. Рекомбінантний вірусний вектор за п. 14, де
частина геному даного вірусу належить до адено-
асоційованого вірусу.

17. Рекомбінантний вірусний вектор за п. 14, де
частина геному даного вірусу належить до ретро-
вірусу.

18. Рекомбінантний вірусний вектор за п. 14, в
якому ретровірус вибраний з ВІЛ, HFV, MLV, FIV і
VSV.

19. Спосіб регуляції клітинно-специфічної експресії
гена, який представляє інтерес, що включає
трансдукування клітини-мішені ссавця вектором за
будь-яким з пп. 14-18 і, при необхідності, транс-
плантацію такої клітини індивіду.

20. Спосіб за п. 19, в якому вказана клітина-мішень
являє собою гемопоетичну стовбурову клітину.

(13) C2

(11) 88601

(19) UA

21. Спосіб за п. 19, в якому вказана клітина-мішень являє собою моноцит.
22. Спосіб за п. 19, в якому вказана клітина-мішень являє собою макрофаг.
23. Спосіб за будь-яким з пп. 19-22, де представляючий інтерес ген кодує білок, що забезпечує резистентність до ВІЛ-інфекції.
24. Застосування рекомбінантного вірусного вектора за будь-яким з пп. 14-18 для виробництва лікарського засобу для лікування ВІЛ-інфекції, гемопоетичного порушення, такого як SCID, хронічного грануломатозного захворювання та таласемії і/або захворювання у індивіда, що проявляється у підвищеному рівні гамма-ІFN у тканині тіла.
25. Застосування за п. 24, де лікарський засіб призначений для лікування захворювання у індивіда, що проявляється у підвищеному рівні гамма-ІFN у тканині тіла, і додатково включає IL-6 і/або IRF, і/або C/EBP β фактори.

26. Трансгенна миша, яка має ДНК-послідовність, що кодує ДНК-послідовність за будь-яким з пп. 1-8.
27. Застосування ДНК-послідовності, яка кодує IE-18BP-промотор людини, з послідовністю SEQ ID NO:1, або її фрагмента, що включає послідовність SEQ ID NO:2 або SEQ ID NO:3, здатні керувати генною експресією, де послідовності додатково включають 50 нуклеотидів з 5'-кінця послідовності SEQ ID NO:5, для виробництва лікарського засобу, призначеного для лікування захворювання.
28. Фармацевтична композиція, яка включає терапевтично ефективну кількість ДНК-послідовності, що кодує IL-18BP-промотор людини, з послідовністю SEQ ID NO:1, або її фрагмента, що включає послідовність SEQ ID NO:2 або SEQ ID NO:3, здатні керувати генною експресією, де послідовності додатково включають 50 нуклеотидів з 5'-кінця послідовності SEQ ID NO:5.

Даний винахід відноситься до промотору білка, який зв'язує інтерлейкін-18 (IL-18BP), до його отримання і застосування.

Цитокінзв'язувальні білки (розчинні цитокинові рецептори) являють собою, як правило, позаклітинні лігандзв'язувальні домени відповідних цитокинових рецепторів клітинної поверхні. Вони утворюються в результаті альтернативного сплайсингу або в результаті протеолітичного розщеплення рецептора клітинної поверхні. Ці розчинні рецептори були описані раніше: наприклад, розчинні рецептори для IL-6 і γ -IFN (Novick і співавт. 1989), TNF (Engelman і співавт. 1989 і Engelman і співавт. 1990), IL-1 і IL-4 (Malishewski і співавт. 1990) і α/β -IFN (Novick і співавт. 1994, Novick і співавт. 1992). Один з цитокінзв'язувальних білків, названий остеопротегерин (OPG, відомий також як чинник інгібування остеокластів - OCIF), представник сімейства TNFR/Fas, являє собою перший приклад розчинного рецептора, який існує виключно як секретований білок (Anderson і співавт. 1997, Simonet і співавт. 1997, Yasuda і співавт. 1998).

Білок, який зв'язує інтерлейкін-18 (IL-18BP), був виділений з сечі афінним очищенням на колонці з IL-18 (Novick і співавт. 1999). IL-18BP усуває IL-18-індукцію γ -IFN і IL-18-активацію NF- κ B *in vitro*. Крім того, IL-18BP інгібує γ -IFN-індукцію у мишей, яким ін'єктували LPS. Ген IL-18BP розташований на 11-й хромосомі людини, і в геномній послідовності розміром 8.3 т.п.н., що включає ген IL-18BP, немає екзону, що кодує трансмембранний домен. До теперішнього часу у людини виявлено чотири ізоформи IL-18BP, що виготовляються шляхом альтернативного сплайсингу мРНК. Їх позначили IL-18BP а, b, c, і d, причому всі вони володіють одним і тим же N-кінцем і відрізняються по C-кінцю (Novick і співавт. 1999). Дані ізоформи відрізняються по здатності зв'язувати IL-18 (Kim і співавт. 2000). Відомо, що серед цих чотирьох ізоформ IL-18BP-ізоформи а і с людини (hIL-18BP) володіють здатністю нейтралізувати IL-18. Найпоширеніша IL-18BP-ізоформа, сплайсований варіант ізоформи а, виявляє високу спорідненість до IL-18 при швидкому включенні і повільному вимкненні швид-

кості, і константи дисоціації (Kd), приблизно, 0,4 нМ (Кіт і співавт. 2000). IL-18BP конститутивно експресується в селезінці (Novick 1999), і циркулює в плазмі в концентрації 2,5 нг/мл (Novick і співавт. 2001). Залишки, що беруть участь у взаємодії IL-18 з IL-18BP, описані завдяки використанню комп'ютерного моделювання (Kish і співавт. 2000) і основані на взаємодії між аналогічним білком IL-1 β з IL-1R тип I (Vigers і співавт. 1997). Відповідно до моделі зв'язування IL-18 з IL-18BP, Glu-залишок в положенні 42 і Lys-залишок в положенні 89 у IL-18 ймовірно зв'язується, відповідно, з Lys-130 і Glu-114 в IL-18BP (Кіт і співавт. 2000).

Як відмічено, IL-18 індукуює γ -IFN, який, в свою чергу, як недавно повідомлялося, індукуює *in vitro* утворення мРНК IL-18BP (Muhl і співавт. 2000). Тому, IL-18BP міг би служити як "вимикаючий" сигнал, який термінує запальну реакцію.

IL-18BP в значній мірі гомологічний сімейству білків, що кодуються у деяких поксвірусів (Novick і співавт. 1999, Xiang and Moss 1999). Інгібування IL-18 за допомогою даного ймовірного вірусного IL-18BP може ослабляти запальну противірусну Th1-відповідь.

Рівень сироваткового IL-18BP істотно підвищується при сепсисі, що свідчить про його роль в регулюванні імунних реакцій *in vivo* (Novick і співавт. 2001). Дійсно, IL-18BP в різних клітинах індукується за допомогою γ -IFN, і це примушує вважати, що він служить як негативний інгібітор імунної реакції, опосередкованої IL-18, по типу зворотного зв'язку (Mughl і співавт. 2000).

Попередні результати свідчать про те, що мРНК IL-18BP детектується в лейкоцитах, клітинах ободової кишки, тонкого кишечника, передміхурової залози і особливо в клітинах селезінки (Novick і співавт. 1999). До складу клітин селезінки входять макрофаги, лімфоцити, а також клітини плазми, доповнені клітинами з кровотоку.

Активність елементів, які контролюють транскрипцію, промотор і енхансери, істотно варіює у різних типів клітин. Промотори і енхансери складаються з коротких ланцюжків ДНК-послідовностей, які специфічно взаємодіють з клі-

тинними білками, що беруть участь в транскрипції (огляд Dynan and Tjian 1985, McKnight and Tjian 1986, Sassone-Corsi and Borrelli 1986 і Maniatis і співавт. 1987). Певне сполучення різних послідовностей розпізнавання і певна кількість споріднених факторів транскрипції визначає ефективність, з якою даний ген транскрибується в клітині конкретного типу. Багато які еукаріотичні промотори містять два типи розпізнавальних послідовностей: TATA-бокс і розташовані лівіше елементи промотору. Ймовірно, даний TATA-бокс, розташований в положенні апстрим на 25-30 п.н. від сайту ініціації транскрипції, бере участь в управлінні РНК-полімеразою II, яка починає синтез РНК у відповідному сайті. На відміну від нього, розташовані в положенні апстрим промоторні елементи визначають швидкість, з якої починається транскрипція. Енхансерні елементи можуть стимулювати майже 1000-кратне збільшення транскрипції з приєднаними гомологічним або гетерологічним промоторами. Разом з тим, на відміну від промоторних елементів, розташованих в положенні апстрим, енхансери активні при розміщенні їх в положенні даунстрим від сайту ініціації транскрипції або ж на значній відстані від даного промотору. Багато які енхансери клітинних генів функціонують тільки в певній тканині або в клітині певного типу (огляд Voss і співавт. 1986, Maniatis і співавт. 1987). Крім того, деякі енхансери стають активними лише в специфічних умовах, які виникають в присутності індуктора, такого як гормон або іон металу (огляд Sassone-Corsi and Borrelli 1986, а також Maniatis 1987). Через цю різницю в клітинній специфічності клітинних енхансерів, вибір промоторних і енхансерних елементів, які вводять в еукаріотичний експресійний вектор, визначається типом клітин, в яких експресується даний рекомбінантний ген. З іншого боку, використання заздалегідь виготовленого вектора, що містить специфічний промотор і клітинний енхансер, може дещо обмежити типи клітин, в яких можна здійснити експресію.

Багато які енхансерні елементи, отримані з вірусів, володіють більш широким колом хазяїв і активні в різноманітних тканинах, хоча у різних клітинних типів спостерігаються істотні кількісні відмінності. Наприклад, ранній енхансер вірусу SV40 в багатьох клітинах, отриманих від різних видів ссавців, активний по-різному, і, отже, вектори, що включають даний енхансер, корисні для використання (Dijkema і співавт. 1985). Дві інші комбінації енхансер/промотор, які активні у широкого кола клітин, отримані з довгого повтору (LTR) геному вірусу саркоми Рауса (Gorman і співавт. 1982b) і з цитомегаловірусу людини (Boshart і співавт. 1985).

Даний винахід відноситься до ДНК-послідовності, що кодує IL-18BP-промотор (SEQ ID NO: 1) людини, або фрагмент, такий як SEQ ID NOS 2 або 3, або його функціональне похідне, в якому 3'-кінець вказаної ДНК-послідовності або її фрагмент включає один або декілька нуклеотидів з 5'-кінця SEQ ID NO:5.

Точніше, похідне, відповідно до даного винаходу, може являти собою ДНК даного винаходу, змінену по одному або декількох AP1-сайтах, представлених в елементі сайленсера, присут-

ньому в даній послідовності, при цьому дана ДНК-послідовність може додатково містити ген, приєднаний шляхом зшивання до промотору IL-18BP.

У першому аспекті даного винаходу даний ген може кодувати, наприклад, IL-18BP або гетерологічний білок, такий як люцифераза, бета-інтерферон, TNF, еритропоетин, тканинний активатор плазміногену, гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор, марганець-супероксиддисмутаза, імуноглобулін, або його фрагмент, гормон росту, FSH, hCG, IL-18, hsLDLR і білки, які зв'язують рецептор TNF.

У даному винаході представлені вектор, що включає ДНК-послідовність, послідовність, що кодує IL-18BP-промотор людини, хазяйська клітина, яка включає даний вектор, наприклад, CHO, WISH, HepG2, Cos, CV-1, HeLa, і клітини Nakat U937, а також спосіб отримання рекомбінантного білка, що включає культивування відповідної хазяйської клітини і виділення продукowanego рекомбінантного білка.

Крім того, в даному винаході представлений рекомбінантний вірусний вектор, який включає частину геному даного вірусу, фрагмент ДНК, що кодує відповідний ген і фрагмент ДНК, що включає ДНК-послідовність, яка кодує IL-18BP-промотор людини. Більш конкретно, частина даного вірусу може, наприклад, являти собою аденоасоційований вірус, а також ретровірус, такий як HIV, HFV, MLV, FIV і VSV.

У даному винаході розроблений також спосіб регуляції клітинноспецифічної експресії відповідного гена, що включає трансдукування клітини-мішені ссавця за допомогою вказаного вірусного вектора даного винаходу в клітині-мішені, такий як гемопоетична стовбурова клітина, а також моноциту. Відповідний ген може, наприклад, представляти білок, що додає резистентності до ВІЛ-інфекції. Регуляція клітинноспецифічної експресії гена, що представляє інтерес, може використовуватися для лікування, наприклад, ВІЛ-інфекції, порушень кровотворення, таких як SCID, хронічне гранульоматозне захворювання і таласемія.

Далі, в даному винаході розроблений спосіб генної терапії для лікування захворювання індивіда з підвищеним синтезом γ -IFN в тканинах тіла, що включає ведення ефективного кількості вірусного вектора даного винаходу, крім того, який необов'язково включає введення факторів IL-6 і/або α -TNF, або IRF і/або C/EBP β .

У іншому аспекті даний винахід відноситься до трансгенних мишей, які несуть ДНК-послідовність, яка кодує ДНК-послідовність даного винаходу.

Крім того, в даному винаході розкрито використання ДНК-послідовності, яка кодує IL-18BP-промотор людини (SEQ ID NO:1), або фрагмента або його функціонального похідного, де 3'-кінець вказаної ДНК-послідовності або її фрагмент включає один або декілька нуклеотидів з 5'-кінця SEQ ID NO:5, для виробництва лікарського засобу, що використовується при лікуванні захворювання.

У даному винаході представлена також фармацевтична композиція, що включає терапевтично ефективну кількість ДНК-послідовності, що кодує IL-18BP-промотор людини (SEQ ID NO:1), або фрагмент або його функціональне похідне, в яко-

му 3'-кінець вказаної ДНК-послідовності або її фрагмента включає один або декілька нуклеотидів з 5'-кінця SEQ ID NO:5.

На Фіг.1 представлено схематичне зображення промоторної ділянки гена IL-18BP, що включає 5 регуляторних елементів.

На Фіг.2 представлені дані по кінетиці індукції IL-18BP і спільній діяльності IL-18BP з α -TNF і IL-6. (А) γ -IFN індуктує IL-18BP в WISH-клітинах людини дозозалежним способом. Клітини інкубують з вказаними концентраціями γ -IFN протягом 24 і 48 год. (В) Синергічну дію α -TNF, IL-6 і їх сполучення на IL-18BP, що індуктується γ -IFN. НерG2-клітини інкубують з вказаними комбінаціями γ -IFN (100 Од./мл), α -TNF (20нг/мл) і IL-6 (300 Од./мл). Індукція IL-18BP за допомогою кожної комбінації виявляється істотно вищою ($p < 0,05$), ніж індукція за допомогою одного лише γ -IFN. Дані являють собою середню \pm SD ($n=3$, для А, $n=4$ для В).

На Фіг.3 представлено схематичне зображення консервативної структури екзон-інтрон генів IL-18BP людини і миші. IL-18BP-ген людини порівнюють з мишачим геном IL-18BPd. Екзони вказані. Сайт ініціації транскрипції, сайт ініціації трансляції (ATG), стоп-кодон (Stop) і сигнал поліаденілювання (PAS) вказані для IL-18BP-гена людини.

На Фіг.4 показано, що індукція IL-18BP за допомогою γ -IFN здійснюється на транскрипційному рівні і залежить від *de novo*-синтезу білка. (А) напівкількісна RT-ПЛР мРНК IL-18BP з клітин НерG2, які преінкубують з актиноміцином D (1 мкг/мл, 30хв.), промивають і інкубують з γ -IFN (100 Од./мл) протягом вказаного часу. RT-ПЛР мРНК β -актину представлена як контроль. (В) напівкількісна RT-ПЛР мРНК IL-18BP з клітин НерG2, які преінкубують з циклогексимідом (20 мкг/мл) і γ -IFN (100 Од./мл) протягом вказаного часу.

На Фіг. 5 показана базова і γ -IFN-індукована активність люциферазних репортерних векторів, що несуть IL-18BP-промотор людини. Розмір вставки, що простягається від сайту ініціації транскрипції (+1), наведений в дужках. Цифри в кружках представляють різні елементи відповіді: 1. GAS. 2. IRF-E. 3. C/EBP-E (2 ділянки). Сайленсер 5. Дистальний енхансер. Зачорнені прямокутники відображають мутацію в специфічному елементі відповіді. НерG2-клітини котрансфікують за допомогою вказаного репортерного вектора і β GAL pSV40. Всі значення люциферази стандартизують по β -галактозидазній активності. (А) активність люциферази в екстрактах неіндукованих клітин в порівнянні з клітинами, трансфікованими за допомогою pGL3 - Базовий вектор. (В) активність люциферази в клітинах, трансфікованих за допомогою вибраних векторів і індукованих за допомогою γ -IFN. Кратність індукції перевищує базову активність, яка показана в (А).

На Фіг.6 показано, що IRF-1 суттєвий для експресії IL-18BP у мишей. IL-18BP сироватки C57B1/6 IRF-^{-/-} і контрольних C57 B1/6-мишей, які ін'єктують внутрішньочеревинно з мишачим γ -IFN (53000 а.о.м./миша). Одну частину мишей незроковують до ін'єкції, а іншу - через 24 год. після ін'єкції. Сироватковий IL-18BP визначають за допомогою ІФА. Дані представлені середньою \pm SE ($n=6$ в кожній групі). Відмінності між сироватковим IL-

18BP у контрольних мишей і у дефіцитних по IRF мишей, а також індукція IL-18BP у контрольних мишей є статистично значущою ($p < 0,05$).

На Фіг. 7 показана роль IRF-1 і C/EBP β і їх асоціація на індукцію гена IL-18BP. (А) аналіз зміщення електрофоретичної рухомості (EMSA Приклад 18) ДНК-вмісних зондів, що кореспондують з основами від -33 до -75 (IRF-E, ліва панель) і від -8 до -55 (GAS, права панель). НерG2-клітини обробляють за допомогою γ -IFN у вказаний час, і ядерним екстрактам дають можливість взаємодіяти із зондами IRF-E або GAS. Зміщення смуг вказано зачорненими стрілками. GAS-комплекс також схильний до сильного зміщення вказаними антитілами. Сильно зміщена смуга вказана світлою стрілкою. (В) напівкількісна RT-ПЛР мРНК IL-18BP з НерG2-клітин, які трансфікують вказаними сполученнями експресійних векторів IRF-1 або C/EBP β . Там, де вказано, додають γ -IFN і клітини збирають через 5 год. Значення стандартизують по мРНК β -актину. (С) активність люциферази в клітинах, трансфікованих люциферазним репортерним вектором pGL3 (1272), що містить повний IL-18BP-промотор, разом з вказаною концентрацією pCDNA3-IRF-1 (кружки) і 1 мкг/10⁶ клітин з pCDNA3-C/EBP β . Як альтернатива, клітини трансфікують вказаною концентрацією pCDNA3-C/EBP β (прямокутники) і 0,1 мкг/10⁶ клітин pCDNA3-IRF-1. Активність люциферази стандартизують по β -Gal активності. (D) імуноблоти ядерного і цитоплазматичного екстрактів (дивіться Приклад 17 по отриманню екстрактів) клітин, оброблених за допомогою γ -IFN (100 Од./мл, 2 год.). Екстракти імунопреципітують (IP) і імуноблотують вказаними антитілами.

На Фіг.8 показане зв'язування даних факторів з IL-18BP-промотором після γ -IFN-індукції (А) EMSA за допомогою проксимального C/EBP β Е і цільних екстрактів після обробки за допомогою γ -IFN. Показано, що дані екстракти сильно зміщені вказаними антитілами. (В) EMSA за допомогою зонда, що кореспондує з дистальним енхансером, і екстрактів цільних клітин після обробки за допомогою γ -IFN. Показано, що клітинні екстракти сильно зміщені вказаними антитілами, з або без конкуренції за допомогою dsfHKK, що кореспондує з проксимальною половиною даного зонда. Зміщені смуги вказані зачорненими стрілками, а сильно здвинута смуга вказана світлими стрілками.

Даний винахід відноситься до IL-18BP-промотору людини. Даний промотор приводить в дію конститутивну експресію IL-18BP в конкретних клітинах, наприклад, в моноцитах, а γ -IFN опосередковує індукцію експресії IL-18BP в багатьох клітинах. IL-18BP-промотор людини здатний управляти конститутивною і γ -IFN-індукованою експресією гетерологічного білка.

Даний винахід відноситься до ДНК-послідовності, що кодує IL-18BP-промотор людини (SEQ ID NO:1), або фрагменту, або до його функціонального похідного, де 3'-кінець вказаної ДНК-послідовності або її фрагмент включає один або декілька нуклеотидів 5'-кінця SEQ ID NO:5.

мРНК IL-18BP детектується в лейкоцитах, клітинах ободової кишки, тонкого кишечника, передміхурової залози і, переважно, в клітинах селезінки

(Novick і співавт. 1999). У одному з нижченаведених прикладів показано, що IL-18-білок конститутивно експресується в моноцитах.

Встановлено, що експресія IL-18BP індукується за допомогою γ -IFN, не тільки в моноцитах, але також і в багатьох інших клітинах, і що дана індукція може посилюватися при додаванні IL-6 і α -TNF.

Встановлено, що синтез білка *de novo* суттєвий для активації IL-18BP-гена за допомогою γ -IFN.

Сайт ініціації транскрипції мРНК IL-18BP детермінується за допомогою 5'-RACE.

Виявлено, що 3'-кінець мРНК білка типу "цинкового пальця" розташовується в положенні апстрим по відношенню до IL-18BP-гена, лімітуючи, таким чином, потенціал розташованої лівіше регуляторної послідовності IL-18BP до 1601 основ, розташованих в положенні апстрим від основи 1.

У даній ділянці (транскрипції, що простяглися від проксимального місця до дистального місця транскрипції) ідентифікується шість регуляторних елементів (Фіг.1): 1-гамма-активовані послідовності (GAS) з основами від -24 до -32; 2- IRF-1, 2-елемент відповіді (IRF-E), що включає основи від -57 до -69; 3- і 4- два C/EBP β -елементи відповіді з основами від -309 до -322 і від -621 до -634; 5- сайленсер із залишками від -625 до -1106; і 6- енхансерний елемент, що охоплює основи від -1106 до -1272. Ряд люциферазних репортерних векторів з поступовим укороченням по 5'-кінцю фрагмента з 1601 п.н. тестували в HepG2-клітинах (лінія клітин епітеліоми печінки людини). Ділянка розміром 1272 п.н., представлена SEQ ID NO:1, управляє базисною експресією, що спостерігається в деяких тканинах і типах клітин, і індукцією за допомогою γ -IFN. Тестування промоторної активності при послідовному укороченні ДНК-фрагментів в даній ділянці показує, що ДНК-фрагмент з 122 п.н., проксимальний по відношенню до сайту ініціації транскрипції, представлений SEQ ID NO:3, включає мінімальний промотор. Даний мінімальний промотор також є індукованим. Однак, інші регуляторні послідовності, розташовані зліва від цього мінімального промотору, не сприяють збільшенню індукції. Встановлено, що ДНК-фрагмент розміром 635 п.н., що містить, крім елементів IRF-1 і GAS, два елементи C/EBP β , представлені SEQ ID NO:2, забезпечують максимальну індукцію експресії люциферази за допомогою γ -IFN.

In-vivo експерименти, здійснені на дефіцитних по IRF-1 мишах, підтверджують значення IRF-1 як посередника базисної, а також і γ -IFN-індукованої експресії IL 18BP.

Встановлено, що при γ -IFN-індукції, індукується експресія IRF-1-фактора і даний чинник утворює комплекс з C/EBP β , який конститутивно присутній в даних клітинах. Даний комплекс зв'язаний з проксимальним промоторним GAS-елементом і з його суміжним промоторним IRF-E-елементом.

Встановлено, що енхансер, присутній на дистальному сайті ініціації транскрипції, взаємодіє з базальним промотором через IRF-1.

Даний винахід відноситься до IL-18BP-промотору SEQ ID NO:1, або до її фрагмента, а також до способів регуляції генної експресії. Більш конкретно, даний винахід відноситься до ДНК-

послідовностей IL-18BP, що виділяються, 1272 п.н. (SEQ ID NO:1) або до її фрагмента, такого як з 635 п.н. (SEQ ID NO:2) і з 122 п.н. (SEQ ID NO:3), які здатні управляти генною експресією.

Дану ділянку IL-18BP-промотору клонують і секвенують, і кореспондують з нуклеотидами послідовності розміром 1272 п.н., в положенні апстрим від сайту ініціації транскрипції IL-18BP (SEQ ID NO: 1).

Даний винахід включає повний IL-18BP-промотор (SEQ ID NO:1), а також ДНК-послідовності, що включають його фрагмент (SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3), здатні управляти генною транскрипцією, і, отже, одночасно управляти генною експресією, і можуть використовуватися з іншими частинами IL-18BP-промоторної ділянки або, альтернативно, з гетерологічними промоторами або гетерологічними промоторними елементами, щоб контролювати генну транскрипцію. Даний промотор або його фрагмент здатний індукуватися за допомогою γ -IFN. Така індукція може бути також посилена в результаті надекспресії IRF-1 і/або C/EBP β , і/або в результаті IL-6- і/або α -TNF-обробки.

Функціональні похідні промотору, представлені SEQ ID NO:1, або його фрагмент, такий як SEQ ID NO: 2 або SEQ ID NO: 3, є мутантами, в яких 1-10, переважно 1-5, більш переважно 1 нуклеотид заміщений іншим, або делегований, і який здатний управляти генною експресією і IFN γ -індукцією.

ДНК-послідовності даного винаходу, що включають IL-18BP-промотор (SEQ ID NO:1) або його фрагмент, такий як SEQ ID NO:2 або SEQ ID NO:3, можна виділити з використанням різних способів, відомих в даній галузі техніки. Щонайменше можна використати три альтернативних основних способи:

(1) виділення ДНК-послідовності з геномної ДНК, яка містить дану послідовність; (2) хімічний синтез даної ДНК-послідовності; і (3) синтез даної ДНК-послідовності за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

У першому методі, геномну ДНК-бібліотеку людини можна скринувати для того, щоб ідентифікувати ДНК-послідовність, що включає IL-18BP-промотор або елемент IL-18BP-промотору.

У другому методі ДНК-послідовність, що включає IL-18BP-промотор або елемент IL-18BP-промотору, можна синтезувати хімічно. Наприклад, ДНК-послідовність, що включає IL-18BP-промоторну ділянку або IL-18BP-промотор, можна синтезувати у вигляді набору олігонуклеотидів по 100 основ, які потім послідовно лігують (за допомогою належних термінальних сайтів рестрикції) так, щоб утворити, правильну лінійну послідовність нуклеотидів.

У третьому методі ДНК-послідовність, що включає IL-18BP-промоторну ділянку або IL-18BP-промотор, можна синтезувати з використанням ПЛР. Коротко, пари синтетичних ДНК-олігонуклеотидів, щонайменше, довжиною 15 основ (ПЛР-праймери), які гібридизують з протилежними ланцюгами цільової ДНК-послідовності, можна використовувати для ферментативно ампліфікованої вбудованої ділянки ДНК в даній цільовій послідовності. Повторювані цикли тепло-

вої денатурації даної матриці, відпал праймерів і подовження 3'-кінців відпалених праймерів за допомогою ДНК-полімерази приводить до ампліфікації даного сегмента, що визначається 5'-кінцями даних ПЛР-праймерів. Див. патенти США №№ 4683195 і 4683202.

Було показано, що IL-18BP-промотор даного винаходу здатний забезпечувати базисну експресію, а також експресію, що індукується за допомогою γ -IFN гетерологічного гена. Таким чином, промотор IL-18BP володіє і базисною, і індукованою активністю.

Незважаючи на те, що нуклеотидна послідовність даного промотору, представлена SEQ ID NO:1 або його фрагментами, володіє промоторними активностями і в даному описі зроблене посилення на таку послідовність, вважається, що можна створити нуклеотидні похідні, які не впливають на промоторну функцію або на функцію промоторного елемента. Такі модифіковані нуклеотидні послідовності можна отримати з використанням різних способів, відомих в даній галузі техніки, наприклад, за допомогою мутуючої нуклеотидної послідовності з тим, щоб дана мутація привела до делеції, вставки, що замінюється, інверсії або до додання одного або декількох нуклеотидів. Наприклад, можна використати методи сайт-направленого мутагенезу, описані Taylor J.W. і співавт., Nucl. Acids Res. 13, 8749-8764 (1985) і Kunkel J.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 482-492 (1985). Крім того, у постачальників можна закупити набори для сайт-направленого мутагенезу. Наприклад, набір для здійснення сайт-направленого мутагенезу можна придбати у Amersham Corp. (Arlington Heights, 111.). У даному винаході розглядається ДНК, що містить послідовності, ідентичні, відповідно, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 2 і SEQ ID NO:3, при умові, що дана промоторна активність зберігається і/або посилюється, щонайменше, на 50% і переважно на 75%, і більш переважно на 90%. Одне таке похідне, наприклад у вигляді SEQ ID NO: 1, являє собою похідне, яке мутує по одному або по всім трьом API-сайтам, які присутні в сайленсерній ділянці.

Дана нуклеотидна послідовність, що включає IL-18BP-промотор, його фрагмент і/або його похідне, може бути приєднана шляхом зшивання до кодуючої ділянки будь-якого представляючого інтерес гена, щоб експресувати цей ген у відповідній хазяйській клітині. Під зшиванням мається на увазі приєднання шляхом зшивання промотору і елементів. Для експресії відповідного гена переважно, щоб до даного гена, який цікавить, приєднати шляхом зшивання повний IL-18BP-промотор у вигляді SEQ ID NO:1 або його фрагмент, такий як SEQ ID NO:2 або SEQ ID NO:3, або його похідне. Як показано нижче в розділі з прикладами, IL-18BP-промотор, або його фрагменті, такий як фрагмент у вигляді SEQ ID NO:2 або у вигляді SEQ ID NO:3, здатний управляти експресією гетерологічних генів. Розглядається також експресія гомологічних генів під промотором даного винаходу.

Даний промотор може додатково містити інтрон, наприклад, перший інтрон в IL-18BP.

"Приєднаний шляхом зшивання" IL-18BP-промотор або промоторний елемент повинен

управляти транскрипцією молекули нуклеїнової кислоти, що входить у відповідну відкриту рамку зчитування. Що стосується гетерологічних промоторів, то промотори і промоторні елементи даного винаходу приєднують шляхом зшивання в тому випадку, якщо вони контролюють функцію таких гетерологічних промоторів.

Як указано вище, IL-18BP-промотор даного винаходу, його фрагмент і його похідні послідовності можна використати для експресії будь-якого представляючого інтерес гена. Як правило, для цієї мети використовують експресійний вектор. Тому, даний винахід описує також експресійні вектори, які включають ДНК-послідовність, що виділяється, здатну управляти експресією гена, яка містить IL-18BP-промотор або її фрагмент, або її похідне. Дані експресійні вектори переважно містять IL-18BP-промотор, його фрагмент, або його похідне, що володіють нуклеотидною послідовністю, подібною, відповідно, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 або SEQ ID NO: 3, або її фрагментами і/або її похідними. Переважні також експресійні вектори, що включають гомологічний або гетерологічний ген, приєднаний шляхом зшивання до IL-18BP-промотору, або до його фрагмента і/або до його похідного, до модифікованої його нуклеотидної послідовності.

У даному винаході експресійні вектори часто ефективні у вигляді "плазмід" (векторна форма), які відносяться до кільцевих дволанцюгових ДНК і не зв'язані з певною хромосомою. Однак даний винахід передбачає включення також інших форм експресійних векторів, які володіють еквівалентними функціями і які, після цього, стануть відомі в даній галузі техніки.

Експресійні вектори, застосовані в даному винаході, як правило, містять оріджин реплікації, IL-18BP-промотор, розташований спереду (тобто в положенні апстрим) відповідного гена, послідовності термінації транскрипції, і інший вектор. Дані експресійні вектори можуть також включати інші ДНК-послідовності, відомі в даній галузі техніки, наприклад, які стабілізують лідерні послідовності, що забезпечують стабільність даного продукту експресії, секреторні лідерні послідовності, які забезпечують секрецію даного продукту експресії, послідовності, які роблять можливою експресію модульованого структурного гена (наприклад, завдяки наявності або відсутності поживних речовин або інших індукторів в даному ростовому середовищі), маркуючі послідовності, які здатні забезпечити відбір по фенотипу в трансформованих хазяйських клітинах, а також послідовності, які створюють сайти для розщеплення ендонуклеазами рестрикції. Характеристики реально діючого використовуваного експресійного вектора повинні бути сумісні з даною використовуваною клітиною-хазяїном. Експресійний вектор, що розглядається в даному винаході, щонайменше, здатний управляти транскрипцією, а переважно, і експресією відповідного гена, який визначається промоторною ділянкою IL-18BP або IL-18BP-промотором або його модифікованою нуклеотидною послідовністю. Прийнятні оріджини реплікації включають, наприклад, оріджин з вакуолізуючого мавпячого вірусу 40 (SV40). Прийнятні послідовності термінації

включають, наприклад, послідовність з вакуолізуючого мавпячого вірусу (SV40). Промотор даного винаходу можна використати для експресії фактично будь-якого представляючого інтерес гена, наприклад, генів, що кодують терапевтичні продукти, такі як бета-інтерферон, TNF, еритропоєтин, тканинний активатор плазміногену, гранулоцитарний колонієстимулюючий чинник, марганець-супероксид-дисмутаза, імуноглобулін, або його фрагмент, гормон росту, hLDLR, FSH, hCG, IL-18, білки, які зв'язують рецептор TNF і білки, які зв'язують IL-18. Всі ці речовини відомі в даній галузі техніки і багато які комерційно доступні.

Прийнятні експресійні вектори, що містять необхідні кодуєчу і контрольну послідовності, можна сконструювати з використанням відомих в даній галузі техніки стандартних методів рекомбінантних ДНК, багато які описані Sambrook, і співавт., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989).

Крім того, в даному винаході розглядаються хазяйські клітини, які містять експресійний вектор, що включає ДНК-послідовність, що виділяється, здатний управляти експресією гена, який включає IL-18BP-промоторну ділянку, або IL-18BP-промотор, або його модифіковану нуклеотидну послідовність. Переважно, IL-18BP-промоторна ділянка володіє нуклеотидною послідовністю, відповідною з 1272 п.н. послідовності в положенні апстрим (тобто зліва) від сайту ініціації транскрипції IL-18BP, представленої SEQ ID NO:1, або її фрагментом, таким як нуклеотидна послідовність з 635 п.н. послідовності зліва від сайту ініціації транскрипції, представленої SEQ ID NO:2, або її фрагментом, таким як нуклеотидна послідовність з 122 п.н. зліва від сайту ініціації транскрипції, представленої SEQ ID NO:3. Переважні також хазяйські клітини, що містять експресійний вектор, який додатково включає гомологічний або гетерологічний ген, приєднаний шляхом зшивання до IL-18BP-промоторної ділянки або до IL-18BP, представленими SEQ ID NO:1 або її фрагментом. Прийнятні хазяйські клітини включають, наприклад, HeLa-клітини людини або клітини CV-1 і COS-1 африканської зеленої мавпи, клітини CHO, HepG2, WISH-клітин, Nakat U937 і так далі.

Переважні хазяйські клітини, що містять рецептори для γ -IFN, що робить можливою індукцію IL-18BP-промотору і тим самим посилюючи експресію представляючого інтерес гена.

Експресійні вектори можна вводити в хазяйські клітини різнноманітними способами, відовими в даній галузі техніки. Наприклад, трансфекцію хазяйських клітин експресійними векторами можна здійснити за допомогою методу кальцій-фосфатного осадження. Проте, можна також використати і інші способи введення експресійних векторів в хазяйські клітини, наприклад, електропорацію, злиття в результаті балістичної трансфекції, ліпосомне злиття, ядерну ін'єкцію, і можна також використати інфікування вірусом або фагом.

Після того, як експресійний вектор введений у відповідну хазяйську клітину, дану хазяйську клітину можна культивувати і потім виділити представляючий інтерес поліпептид, що кодується да-

ним геном. Як альтернатива, після того, як експресійний вектор був введений у прийнятну хазяйську клітину, дану клітину можна культивувати, і після досягнення необхідної щільності клітин останні можна стимулювати за допомогою γ -IFN, а потім виділити поліпептид, що кодується відповідним геном.

Хазяйські клітини, що містять експресійний вектор, який містить ДНК-послідовність, що кодує відповідний ген, можна ідентифікувати з використанням різнноманітних способів, відомих в даній галузі техніки. Наприклад, можна використати ДНК-ДНК-гібридизацію, визначаючи наявність або відсутність функцій маркерного гена, визначаючи рівень транскрипції, який вимірюють за утворенням мРНК-транскриптів відповідного гена в даній хазяйській клітині, і імунологічне детектування генного продукту.

ДНК-послідовності експресійних векторів, плазмід або ДНК-молекул даного винаходу можна визначити різнноманітними методами, відовими в даній галузі техніки. Наприклад, можна використати дидезоксиланцюгово-термінуючий метод, який описаний Sanger і співавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467 (1977), або метод Максама-Гілберта, який описаний в *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 560-564 (1977).

Потрібно мати на увазі, що можна ідентифікувати специфічні нуклеотиди або ділянки в IL-18BP-промоторі, які необхідні для регуляції. Дані ділянки або нуклеотиди можуть бути локалізовані в результаті тонкого структурного аналізу даних елементів і можуть бути вивчені в експериментах, в яких аналізують функціональну здатність промоторних мутантів. Наприклад, точкові мутації в промоторних елементах або послідовні делеції, як такі використовували в нижчеприведеному розділі з прикладами, можна створити з використанням ПЛР. Цим способом ампліфікують ряд мутантних промоторних ділянок або делеційних конструкцій, після чого клонують зворотно в репортерні конструкції і оцінюють за допомогою методів трансфекції і люциферазного аналізу (представлено нижче в розділі з прикладами). Дані ампліфіковані фрагменти можна клонувати зворотно у випадку IL-18BP-промотору, а також в гетерологічні промоторні конструкції. Цим способом точно ідентифікують нуклеотидні послідовності, які істотні для управління генною транскрипцією.

Даним аналізом ідентифікують також нуклеотидні зміни, які не впливають на промоторну функцію, або ж які можуть підвищити промоторну функцію. Тому, можна також сконструювати функціональні промоторні похідні і промоторні елементи.

Функціональний аналіз даної промоторної ділянки або промотору можна полегшити завдяки дослідженням по футпринту і зміщенню в гелі. Знання точних пар основ, суттєве для опосередкованого зв'язування білків, надає експериментальні дані, які важливі для опосередкування транскрипційної відповіді.

Тому даний винахід включає також пари основ, суттєві для взаємодії ДНК-білків. Такі пари основ можна з'ясувати. Геномні фрагменти, що містять представляючі інтерес ділянки, можна ви-

користувати в *in vitro*-експериментах по футпринтингу [Galas і співавт., *Nucleic Acids Res.* 9, 6505-6525 (1981)]. Фрагмент рестрикції, що виділяється, мітять радіоактивною міткою і потім інкубують з ядерними екстрактами, отриманими за допомогою традиційних методів з клітин, що ймовірно містять ДНК-зв'язувальні білки, які і повинні зв'язатися з даним фрагментом [наприклад, Dingman і співавт., *Nucleic Acids Res.* 11, 1475-1489 (1983)]. Мічені ДНК-фрагменти інкубують з ядерними екстрактами, обробленими ДНКазою I, і піддають електрофорезу в денатуруючому поліакриламідному гелі. ДНК-зв'язувальні білки в даному клітинному екстракті зв'язуються з упізнаючою їх послідовністю, яка міститься в даному радіоактивно міченому рестрикційному фрагменті, і захищають ДНК від розщеплення ДНКазою. Ділянки захисту обмежують даний сайт зв'язування. Тести по встановленню первинної структури ДНК даного фрагмента по Максаму і Гілберту можна застосовувати як індикатор для виявлення нуклеотидів, захищених від дії ДНКаз.

Далі в даному винаході також ідентифікуються і характеризуються транс-діючі фактори, які взаємодіють з даним промотором або промоторними елементами. Цис-діючі регуляторні послідовності служать як сайти зв'язування білків, які називають транс-діючими факторами (TAF) [Dyran W.S., Tjian T. *Nature* 316, 774-778 (1985); Maniatis T. і співавт., *Science* 236, 1237-1245 (1987)]. Передбачається, що кожний ген зв'язує один або декілька білків по кожній своїй регуляторній послідовності, і ці білки взаємодіють один з одним і з РНК-полімеразою II таким чином, щоб контролювати транскрипцію.

TAFs були ідентифіковані в ядерних екстрактах по їх здатності зв'язувати і сповільнювати електрофоретичну рухомість ДНК-фрагментів цис-діючою послідовністю [Dingman J.D. і співавт., *Nucleic Acids Res.* 11, 1475-1489 (1983); Dyran W., *Cell* 58, 1-4 (1989); Fletcher C і співавт., *Cell* 773-781 (1987); Scheidereit C. і співавт., *Cell* 51, 783-793 (1987)]. Цис-діючі послідовності придатні для методу затримки в гелі, щоб визначити зв'язуючу активність ядерних екстрактів. Спосіб здійснення аналізів по зміщенню в гелі описаний в літературі і включає багато які з тих же реагентів, які використовують в експериментах по футпринту [Fried M. і співавт., *Nucleic Acids Res.* 9, 6505-6525 (1981); Revzin A., *Biotechniques* 7, 346-355 (1989); Strauss F.A. і співавт., *Cell* 37, 889-901 (1984)]. Фрагменти рестрикції, мічені P^{32} , або відпалені пари комплементарних олігонуклеотидів інкубують з ядерними екстрактами і полі-d (I-C) в буфері для зв'язування, і продукти даної реакції піддають електрофорезу в неденатуруючому поліакриламідному гелі. Положення даного ДНК-фрагмента в гелі, що визначається за допомогою радіоавтографії, сповільнюється у випадках, коли білок зв'язався з даною ДНК. Ступінь сповільнення є функцією, яка відповідає розміру даного білка.

Ідентифіковані таким чином білки, що зв'язуються, можна згодом виділити очищенням і одночасно клонувати з використанням відомих методів.

IL-18BP-промотор знаходить також застосування в трансгенних дослідженнях. Трансгенні миші є дійовою генетичною моделлю для вивчен-

ня ряду захворювань людини, в тому числі і злоякісних пухлин. Вони також надають дуже цінний *in vivo*-спосіб вивчення генної регуляції, що підтверджується і численними спостереженнями, зробленими в експериментах по трансфекції репортерного гена (наприклад, люциферазного) [Palmiter F.L. і співавт., *Ann. Rev. Genet.* 20, 465-499 (1986)]. Дослідження, направлені на аналіз сигналів, що враховують залежність в ході розвитку генної експресії, можна іноді здійснювати в моделях клітинної культури, але, мабуть, краще вивчати в трансгенній моделі. Даний вид експерименту можливий внаслідок різного консерватизму у видів регуляторних послідовностей, так що за допомогою мишачого транскрипційного механізму безпомилково інтерпретуються регуляторні сигнали людини.

Тому конструкції, які експресують у трансгенних мишей, могли б давати більше інформації про регуляцію IL-18BP-гена.

Трансгенних мишей можна створювати способами, відомими в даній галузі техніки. Спосіб, що найбільш широко використовується, за допомогою якого створюють трансгенних тварин, включає ін'єкцію ДНК-молекули в чоловічий пронуклеус заплідненої яйцеклітини [Brinster і співавт., *Cell* 27, 223 (1981); Costantini і співавт., *Nature* 294, 982 (1981); Harpers і співавт., *Nature* 293, 540 (1981); Wagner і співавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 5016 (1981); Gordon і співавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 1260 (1976)].

Після ін'єкції ДНК-молекули в запліднену яйцеклітину, дану клітину імплантують в матку реципієнтної самиці і дають можливість розвиватися в організмі тварини. Тому, всі клітини організму такої тварини містять введену генну послідовність.

Отриманих трансгенних мишей або засновників можна схрестити, а їх потомство проаналізувати для отримання ліній, створених від цих засновників, які експресують даний трансген. У трансгенних тварин можна обстежити безліч тканин і спостерігати генну експресію. Дослідження РНК в різних мишачих лініях дозволяють оцінити незалежність сайту інтеграції для рівнів експресії даного трансгену. Див., Hogan B. і співавт., *Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).

IL-18BP-промотор і промоторні елементи допоможуть також забезпечити корисні засоби для здійснення генної терапії.

"Генна терапія" являє собою введення генетичного матеріалу для модифікації або управління експресією генного продукту, який змінює біологічні властивості живих клітин при терапевтичному використанні.

Дані клітини можуть бути алогенними або аутологічними. Клітини можна модифікувати *ex-vivo* для подальшого введення пацієнту або змінити *in vivo* генотерапевтичними продуктами, що безпосередньо вводяться даному пацієнту.

Більшою частиною, конструкції, що включають IL-18BP-промотор або його фрагмент і/або його похідне, потрібно використати для експресії гена-мішені в тих клітинах, де IL-18BP-ген експресується нормально, наприклад, в моноядерних клітинах. Можна застосовувати будь-які способи, доступні в

даній галузі техніки, для перенесення конструкцій в організм тварин, в тому числі і в організм людини.

Вони включають вірусні вектори, зокрема, ретровірусні вектори (див., наприклад, Zweibel і співавт., *Science* 243, 220 (1989)), і наведені там посилення), а також інші способи.

Було показано, що рекомбінантні AAV-вектори досить перспективні для терапевтичної генної доставки в печінку і в скелетний м'яз (Snyder і співавт. 1997, Murphy і співавт. 1997, Song і співавт. 1998, Snyder і співавт. 1999, Herzog і співавт. 1997). Миші, виведені після руйнування гена фактора IX згортання, демонструють сильну кровотечу, чим дуже нагадують фенотип пацієнтів з гемофілією В. Повідомляється (Wang і співавт. 1999), що одинична ін'єкція у ворітну вену рекомбінантного адено-асоційованого вірусного (AAV) вектора, що кодує кДНК фактора IX собак під контролем специфічного для печінки енхансер/промотору, приводить до пролонгованої і повної корекції хворобливої кровотечі.

Ретровірусні вектори, що отримуються з онкоретровірусу, такого як вірус лейкозу мишей (MVL), являють собою вектори, що найбільш широко використовуються для генного перенесення, оскільки геном даного вектора інтегрується в хромосоми клітин-мішеней, приводячи до стабільної експресії трансгенів (I.M.Verma and N.Somia, *Nature* 389, 239 (1997)), проте дані вектори довели свою придатність для клітин, що діляться. Лентивірусні вектори, такі як ВІЛ-вектори, постійно використовуються для клітин, які не діляться (Mioshi і співавт. *Science* 1999, 283:682-686). Здатність лентивірусів заражати клітини, які не діляться, такі як макрофаги, роблять їх перспективними кандидатами для використання як інструментів генного перенесення. ВІЛ-вектори полегшують трансдукцію спочиваючих гемопоетичних стовбурових клітин людини (HSCs).

Гемопоетичні стовбурові клітини людини (HSC) є привабливою мішенню для генної терапії спадкових гемопоетичних порушень, а також інших набутих захворювань, оскільки дані клітини володіють здатністю повністю регенерувати гемопоетичну систему. Наприклад, гемопоетичні стовбурові клітини можуть регенерувати моноцитарні клітини, які, як відомо, залучені в патогенез імунodefіциту, пов'язаного з вірусом-1 (ВІЛ-1).

Незважаючи на більш ніж 15-річні дослідження в галузі генної терапії з використанням гемопоетичних стовбурових клітин, зберігається головна перешкода, пов'язана з нездатністю ефективно і стабільно вбудовувати гени в ці клітини. Ретровірусні вектори на основі вірусу лейкозу мишей Молоні (MLV) використовують найбільш широко, але частота генного перенесення в плюрипотентні HSC людини порівняно низька, а генна експресія часто незадовільна.

Останнім часом зроблені спроби по генетичній модифікації гемопоетичних стовбурових клітин за допомогою генів, які інгібують реплікацію ВІЛ-1, для створення моноцитів, резистентних до зараження ВІЛ-1 (Kohn і співавт. 1999).

Теоретично, вбудування гена, здатного додати резистентності до ВІЛ-1, в гемопоетично стовбурові клітини повинно було б привести до того, що

шуканий ген виявився б представленим в потомстві зрілих моноцитів і інших клітин, сприйнятливих до ВІЛ-1.

Таким чином, використання промотору, який активний в моноцитарних клітинах, такого як IL-18-промотор, або його фрагмента, є перевагою для генної терапії ВІЛ-1.

Генна терапія більшості генетичних захворювань крові (наприклад, SCID, хронічний гранульоматоз, таласемія і так далі) потребують генного перенесення *ex vivo* в трансплантовані самопоновлювані HSC і в регуляції трансгенної експресії в одній або в декількох клітинних лініях. Корекція порушень, що впливають на специфічне потомство HSC (наприклад, гемоглобінопатії або таласемії, ВІЛ-1-інфекція), вимагає специфічним чином обмежити експресію терапевтичного гена в клітинній лінії (Lotti і співавт. 2002). У цих випадках транскрипційне позиціонування гена, який переноситься, є обов'язковим. Генна експресія в різних типах клітин залежить від відносної довжини промотору, що використовується. Незважаючи на це, більшість здійснюваних доклінічних досліджень досі спиралася на використання вірусних, конститутивних промоторів, які приводять в дію трансгенну експресію. Наприклад, в ВІЛ-1-векторі використовують внутрішній CMV-промотор і мишачий CMV-промотор мишачого ретровірусного векторного LTR. Прийнятна трансгенна регуляція в структурі ретровірусного вектора є важкою задачею, через транскрипційний взаємовплив між довгим кінцевим повтором вірусу (LTR) і внутрішнім енхансер-промотором, і генетичною нестабільністю комплексних регуляторних послідовностей. У даному винаході IL-18BP-промотор, який, як відомо, запускає транскрипцію в моноядерних клітинах, використовується для запуску трансгенної експресії в HSCs, попереднику таких моноядерних клітин.

Генетична модифікація гемопоетичних стовбурових клітин за допомогою "анти-ВІЛ-генів" могла б привести до отримання лімфоцитів і моноцитів, резистентних до ВІЛ-інфекції після трансплантації. У пацієнтів, інфікованих ВІЛ-1, можна витягнути HSC, виділити CD34⁺-клітини, трансдукувати *in vitro* за допомогою ретровірусного вектора, який несе інгібуючий ВІЛ-1 білок під контролем IL-18BP-промотору (замість ретровірусного промотору), і дані клітини знову ввести цим же пацієнтам (Kohn і співавт. 1999).

Найбільш звичайним джерелом HSC є гемопоетичні стовбурові клітини периферичної крові (PBSC), які в значній мірі замінюють кістковий мозок в умовах аутологічної трансплантації (Gale і співавт. 1992 і Kessinger і співавт. 1991). PBSC мобілізують з кісткового мозку в периферичний кровообіг шляхом введення факторів, таких як G-CSF або GM-CSF протягом 3-5 днів, і потім збирають за допомогою лейкоферезу. У декількох дослідженнях було показано, що приживлення трансплантата відбувається швидше при трансплантації стовбурових клітин периферичної крові, а не кісткового мозку (Henon і співавт. 1992 і Chao і співавт. 1993). Клоногенні клітини-попередники, що містяться в G-CSF-мобілізованих PBSC, досить сприйнятливі до ретровірус-опосередкованого генного перенесення, незважаючи на те, що швид-

кість трансдукції стовбурових клітин, що тривало відтворюються, в PBSC не краща, ніж в кістковому мозку (Breni і співавт. 1992, Cassel і співавт. 1993, Dunbar і співавт. 1995). Було показано, що ВІЛ-1-інфіковані пацієнти можуть успішно мобілізувати і нагромаджувати G-CSF-мобілізовані PBSC без якого-небудь збільшення рівня ендogenous ВІЛ-1, щонайменше, протягом ранніх стадій захворювання (Junker і співавт. 1997 і Slobod і співавт. 1996).

Іншим джерелом гемопоетичних стовбурових клітин є пуповинна кров (UCB), яка, як встановлено, сприйнятлива до ретровірусної трансдукції набагато сильніше, ніж клітини кісткового мозку (Moritz і співавт. 1993 і Hao і співавт. 1995). Використання HSC з USB могло б бути особливо сприятливим для ВІЛ-1-інфікованих новонароджених. Оскільки трансмісія є здебільшого перинатальною, пуповинна кров повинна містити нормальну кількість і функцію гемопоетичних стовбурових клітин, яких може бути менше в кістковому мозку ВІЛ-1-інфікованої дитини і дорослих (Kearns і співавт. 1997).

Створене велике число синтетичних генів, які можуть супресувати ВІЛ-1-реплікацію ("анти-ВІЛ-1-гени"), що включають: антисмислові, рибозимні, домінують-негативні мутанти (наприклад, RevM10), РНК-пастки, позаклітинні антитіла для запобігання експресії вірусних білків або клітинним корецепторам, і так далі (Veres і співавт. 1996, Zhou і співавт. 1994, Couture і співавт. 1996, Malim і співавт. 1989, Banner і співавт. 1993 і Sullenger і співавт. 1990, Lee і співавт. 1994, Marasco і співавт. 1997 і Chen і співавт. 1997). У багатьох випадках було показано, що анти-ВІЛ-1-гени в модельних системах здатні істотно супресувати реплікацію ВІЛ-1, а в деяких випадках навіть обмежувати входження вірусу в клітини (36, 39-44). Якби виявилось, що у 100% пацієнтів HSC і моноцитарні клітини, що виходять в результаті, нездатні істотним чином підтримувати реплікацію ВІЛ-1, то це, мабуть, привело б до зменшення вірусного навантаження. Теоретично, було потрібно б активне інгібування реплікації ВІЛ-1 у 99,9% сприйнятливих клітин, щоб отримати 3-кратне log-зниження вірусного навантаження, тобто результату, що часто досягається за допомогою високоефективної противірусної терапії. Проте, при обмежених можливостях ефективного перетворення великого процента гемопоетичних стовбурових клітин людини в цей час неможливо захистити більшість сприйнятливих клітин. Альтернативний механізм ефективності ґрунтується на можливості, при якій створені клітини, нездатні підтримувати активну реплікацію ВІЛ-1, можуть бути захищені від індукованої вірусом цитопатичності і, таким чином, в порівнянні з незахищеними клітинами володіти селективною життєздатністю, перевагою. У цьому випадку обмежена кількість захищених клітин може включати збільшену частку всіх моноцитів, що приводить до деякого збереження імунної функції.

Даний винахід відноситься також до фармацевтичних композицій, що включають фармацевтично прийнятний носій, а також що включають вірусну послідовність даного винаходу, відповідну IL-18BP-промоторній ділянці або з промотором, оперативно зв'язаними з відповідним геном, що кодує

відповідний лікарський засіб. Дані композиції можуть використовуватися переважно для зв'язування лікарського засобу з тканинами, в яких підвищений рівень γ -IFN.

Тепер, маючи в своєму розпорядженні описаний даний винахід його легше зрозуміти шляхом посилання на нижченаведені приклади, які представлені як ілюстрація і не призначаються для обмеження даного винаходу.

Приклади

Приклад 1:

Базисний рівень експресії IL-18BP в моноцитах мРНК IL-18BP детектують в лейкоцитах, клітинах ободової кишки, тонкого кишечника, передміхурової залози і особливо в клітинах селезінки (Novick і співавт. 1999). Клітини селезінки складаються з макрофагів, лімфоцитів, і плазматичних клітин, доповнених клітинами, отриманими з кровотоку.

Для того щоб визначити експресію IL-18BP-білка в клітинах, застосовують спеціальний метод ІФА (Приклад 12). Встановлено, що моноядерні клітини периферичної крові людини конститутивно продукують IL-18BP (0,7-1,5 нг/мл). Клітини U937, клітинна лінія, що походить з клітин злоякісної пухлини, отримують з плеврального випоту від пацієнта з ретикулоклітинною саркомою, яка не експресує який-небудь IL-18BP. Клітини U937 можна індукувати до термінальної моноцитарної диференціації шляхом обробки за допомогою форболових ефірів. Базисний рівень експресії IL-18BP в $0,7 \pm 0,01$ нг/мл детектують тільки після диференціації даних клітин в макрофагоподібні клітини шляхом стимуляції за допомогою TPA (10 нг/мл). Дані результати свідчать про те, що IL-18BP конститутивно продукується в моноцитах і макрофагах.

Приклад 2:

Індукція експресії IL-18BP в різних клітинах

Раніше повідомляли, що γ -IFN індукує мРНК і білок IL-18BP в різних клітинних лініях, таких як кератиноцитна клітинна лінія, клітинна лінія карциноми ободової кишки і первинні ниркові мезангіальні клітини (Muhl і співавт. 2000). Індукцію IL-18BP вивчають в різних клітинних лініях людини, а також в моноядерних клітинах (PBMC) периферичної крові за допомогою γ -IFN і інших цитокінів. γ -IFN індукує експресію IL-18BP (дивіться Приклад 11 по моніторингу мРНК і Приклад 12 по ІФА) дозозалежним чином, виявляючи EC_{50} в 50 Од./мл для WISH- і HepC2-клітин (Фіг.2А і В). IL-18BP явно нагромаджується в культуральних супернатантах WISH-клітин, оскільки його концентрація виявилася більш високою до 48 годин культивування в порівнянні з 24 годинним періодом (Фіг.2А).

Моноядерні клітини периферичної крові (PBMC) людини конститутивно продукують IL-18BP (0,7-1,5 нг/мл), а оброблені за допомогою γ -IFN підвищують рівень IL-18BP в $1,7 \pm 0,1$ і $2 \pm 0,3$ рази, відповідно, через 24 і 48 год. ($p < 0,05$, $n = 4$). На утворення IL-18BP не впливає передобробка PBMC за допомогою TPA.

Індукцію IL-18BP за допомогою γ -IFN випробовують на лінії клітин U937. γ -IFN не індукує IL-18BP в недиференційованих клітинах U937, але після диференціації за допомогою форболового ефіру (TPA, 10 нг/мл) макрофагоподібних клітин,

отримують базисний рівень IL-18BP (0,0710,01 нг/мл) і підвищений рівень в $4,6 \pm 0,05$ разу після індукції за допомогою γ -IFN (100 Од./мл, 24 год.), що додатково збільшується через 96 год. (не показано).

Дія інших цитокінів, таких як α 2-IFN, β -IFN, IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 і α -TNF, на експресію IL-18BP випробовують в клітинах НерG2 (Фіг. 2B). Результати, отримані після інкубації вказаних клітин з різними цитокінами в присутності або за відсутності γ -IFN (Фіг.1, web-каталог PNAS) свідчать, що α 2-IFN, β -IFN, IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 і α -TNF поодиночки не індукують IL-18BP. Але на НерG2-клітини IL-6 і α -TNF діють синергічно з γ -IFN, забезпечуючи статистично значуще збільшення IL-18BP.

Дані результати свідчать, що IL-18BP можна індукувати в моноцитах і в багатьох інших клітинах за допомогою γ -IFN. Індукція IL-18BP за допомогою γ -IFN додатково посилюється при додаванні IL-6 і α -TNF.

Приклад 3:

IL-18BP-ген транскрипційно регулюється за допомогою γ -IFN з обов'язковим синтезом білка de novo

Для того щоб перевірити, чи відбувається індукція мРНК IL-18BP за допомогою γ -IFN на транскрипційному рівні, дію інтерферону на НерG2- і WISH-клітини вимірюють в присутності актиноміцину D, інгібітору трансляції (Фіг. 3A). Збільшення рівня мРНК IL-18BP виявляють в НерG2-клітинах за допомогою напівкількісної ЗТ-ПЛР після 3 год. обробки їх за допомогою γ -IFN і тільки після 5 год. обробки Nakat- і WISH-клітин. Попередня обробка НерG2- і WISH-клітин актиноміцином D перед γ -IFN-стимуляцією порушує експресію мРНК IL-18BP в різних часових точках, що свідчить про те, що γ -IFN стимулює синтез мРНК de novo.

Накопичення IL-18BP відмічене через 24 год. і пізніше, після γ -IFN-обробки, підтримуючи залежність IL-18BP-експресії від попередньої індукції білків, наприклад факторів транскрипції. Тому, щоб підтвердити таке припущення в подальшому використовують білковий інгібітор, циклогексимід, щоб перевірити чи вимагає γ -IFN-індукція мРНК IL-18BP синтезу білків de novo. Результати, підсумовувані на Фіг. 3B, свідчать, що попередня обробка вказаних клітин циклогексимідом порушує індукцію мРНК IL-18BP. Даний результат вказує, що синтез білка de novo суттєвий для активації IL-18BP-гена за допомогою γ -IFN.

Приклад 4:

Визначення сайту ініціації транскрипції IL-18BP та його промоторної ділянки для картування IL-18BP-промотору

Для вивчення IL-18BP-промоторної ділянки передусім необхідно специфічно визначити місце розташування сайту ініціації транскрипції.

Сайт ініціації транскрипції мРНК IL-18BP людини визначають за допомогою 5' -RACE (RACE, Приклад 14). Лише один ПЛР-продукт, відповідний IL-18BP, варіант сплайсингу, що найчастіше зустрічається, отримують за допомогою 5'-RACE. Аналіз ДНК-послідовності даного продукту виявляє сайт ініціації транскрипції і додатковий екзон розміром 50 п.н. після сайту ініціації транскрипції на 5'-кінці мРНК IL-18BP людини, що відповідає пози-

ціям нуклеотидів 785-835 геномної ДНК IL-18BP (можна знайти в нуклеотидній базі даних Entrez pubmed, посилання № AF110798). Відповідно до цього створюють нову екзон-інтрон-карту шляхом порівняння геномної ДНК і мРНК, в яку доданий новий 5'-екзон. (Дивіться Фіг.4).

Володіючи даним сайтом ініціації транскрипції IL-18BP (основа 1), можна було б далі аналізувати геномну ДНК людини зліва від основи 1 (хромосома 11q клон:RP11-757C15, посилання № AP000719.4, нуклеотиди лівіше основи 152178), яка відповідає IL-18BP-промоторній ділянці. Порівняння даної ДНК з експресованою маркерною послідовністю (EST) бази даних в NCBI за допомогою програми BLAST виявляє зліва ген на [+]ланцюгу, кодуєчий білок типу «цинкового пальця» (посилання № AK001961). Потім депоновану мРНК даного білка типу «цинковий палець» подовжують за допомогою програми "Instant RACE" (www.LabOnWeb.com), яка переглядає численну колекцію по EST людини. Дана програма вміщує 3'-кінець мРНК білка типу «цинковий палець» по нуклеотиду 150517 геномного клону RP11-757C15, обмежуючи, таким чином, передбачувану ліву регуляторну послідовність з IL-18BP по 1661 основі зліва від основи 1. Приклад 5:

Дослідження мінімального промотору зліва від IL-18BP-гена, здатного стимулювати конститутивну експресію гетерологічного гена

Щоб виявляти мінімальний ДНК-фрагмент, в положенні апстрим від IL-18BP-гена, здатного управляти експресією шестичленного гена, такого як люциферазний репортерний ген, з даним люциферазним геном (Приклад 15) зливають вектор, що містить до 1601 п.н., який відповідає ДНК-послідовності зліва від основи 1 і включає 50 п.н. праворуч від сайту ініціації транскрипції (SEQ ID NO:5), і вектори, що володіють укороченими формами даної ДНК (Фіг. 5A). Люциферазна активність в НерG2-клітинах людини (лінія клітин епітелію печінки людини), трансфікованих вектором (pGL3(1601)), що включає вказані 1601 п.н. "лівої" ДНК, виявляється в $10,3 \pm 0,9$ разів вища, ніж активність, отримана за допомогою пустого pGL3-вектора. Така активність не спостерігається при вбудуванні цієї ж ДНК в протилежній орієнтації (pGL3(-1601)). Даний результат свідчить про те, що ця ДНК з 1601 п.н. зліва від основи 1 володіє базисною промоторною активністю. Аналіз послідовності даного ДНК-фрагмента з 1601 п.н. виявляє, що вона не містить елемент ТАТА-бокс, але володіє декількома GC-багатими доменами поблизу сайту ініціації транскрипції по основах від -3 до -9, від -39 до -48 і від -122 до -132. Аналіз цієї ДНК-послідовності з 1601 п.н. за допомогою програми TFSEARCH ідентифікує гамма-активовану послідовність (GAS) по основах від -24 до -32 (Фіг. 1). Подальший аналіз виявляє елемент відповіді IRF1,2 (IRF-E), що охоплює основи від -57 до -69, і два елементи відповіді C/EBP β по основах від -309 до -322 і від -621 до -634. Були тестовані групи люциферазних репортерних векторів з послідовним укороченням по 5'-кінцю вказаного фрагмента з 1601 п.н. Отримані результати підсумовування на Фіг. 5A, свідчать, що всі конструкції, в тому числі і pGL3 (122), що містять тільки елементи IRF і

GAS, виявляються, щонайменше, ефективними у вигляді pGL3(1601) для підтримки базисної промоторної активності.

Дані результати показують, що даний фрагмент з 122 п.н. (SEQ ID NO:3), що включає елементи IRF і GAS, є достатнім для стимуляції базисної активності гетерологічного гена (Фіг.5A).

Приклад 6:

Дослідження мінімального промотору, зліва від IL-18BP-гена, здатного стимулювати індуковану експресію гетерологічного гена

Для того щоб ідентифікувати мінімальний ДНК-фрагмент, "ліву" ділянку IL-18BP-промотору, здатного посилювати γ -IFN-індуковану люциферазну експресію, укорочені ДНК-вектори з попереднього прикладу перевіряють в трансфікованих HerG2-клітинах в присутності γ -IFN (Фіг.5B по трансфекціях, дивіться приклад 16).

Отримані результати, підсумовувані на фіг. 5B, свідчать, що через 24 год. γ -IFN в 33 рази збільшує люциферазну активність понад базисний рівень експресії у векторі, що включає лише елементи IRF-E і GAS (pGL3(122) - вектор). Даний результат свідчить, що пара IRF-E-GAS без додаткової допомоги може опосередковувати індукцію гетерологічного гена за допомогою γ -IFN. Включення елементів C/EBP-E1 і 2 (pGL3(656)) суттєве, в 88 раз понад базисну активність, збільшує індукцію люциферазної активності, демонструючи значущість даних елементів для індукції синтезу за допомогою γ -IFN. Протилежно до цього, включення додаткової "лівої" ДНК в таку вставку (pGL3(1106)) анулює індукцію люциферазної активності понад її базисну активність. Даний результат дає підставу вважати, що залишки сайленсерного елемента знаходяться в межах основ від -656 до -1106 (зліва від другого C/EBP-E1-елемента). Показано, що три AP1-елементи відповіді представлені в сайленсерній ділянці і що c-Jun зв'язується з IL-18BP-геном і бере участь в його сайленсингу за допомогою всіх трьох таких AP-1 елементів відповіді.

Подальше подовження даного промотору за допомогою 88 основ "лівого" сайленсеру (pGL3(1272)) відновлює вказану відповідь до γ -IFN, і це примушує вважати, що залишки енхансерного елемента, по основах від -1106 до -1272, і його активація за допомогою γ -IFN придушує дію сусіднього сайленсера. Додаткове подовження даної послідовності не впливає на базисну або γ -IFN-індуковану активність, і це дає підставу вважати, що всі "ліві" регуляторні послідовності локалізуються в межах основ від -1 до -1272 (SEQ ID NO:1).

З всіх випробуваних конструкцій індуктивність pGL3(656) є найбільшою, і це свідчить про те, що даний ДНК-фрагмент містить оптимальний індукований IL-18BP-промотор.

Отримані результати свідчать, що мінімальний індукований промотор, який містить елементи IRF-E і GAS, розташований на 122 п.н. лівіше від старту ініціації транскрипції (SEQ ID NO:3), а максимальний і оптимальний індукований промотор, що містить крім елементів IRF-E і GAS два C/EBP β -елементи, розташований на 656 п.н. лівіше від старту ініціації транскрипції.

Приклад 7:

Участь IRF-1 в IL-18BP-експресії in-vivo

Щоб дослідити участь IRF-1 в IL-18BP-експресії, зв'язуючий сайт якого, як встановлено, знаходиться в IL-18BP-промоторі, у дефіцитних по IRF-1 мишей вивчають експресію IL-18BP.

У дефіцитних по IRF-1 мишей вимірюють рівні IL-18BP (Jackson laboratories, Bar Harbor ME) до і після введення мишачого γ -IRF і порівнюють з рівнями IL-18BP у контрольних C57B1/6-мишей (Фіг. 6). Базисний рівень сироваткового IL-18BP у контрольних C57B1/6-мишей становить $9,1 \pm 1,9$ нг/мл і істотно збільшується, завдяки γ -IFN, до $22,4 \pm 2,2$ нг/мл. Протилежно до цього, сироватковий IL-18BP у дефіцитних по IRF-1 мишей виявляється нижчим за межу детектування і зростає за допомогою γ -IFN тільки до $0,7 \pm 1,15$ нг/мл. Даний результат підтверджує значущість IRF-1 як посередника базисної, а також γ -IFN-індукованої експресії IL-18BP.

Приклад 8:

Детекція факторів транскрипції, що зв'язуються з IL-18BP-промотором в умовах індукції

Для ідентифікації взаємодії білків-ДНК серед різних елементів відповіді в IL-18BP-промоторі аналізують зміщення електрофоретичної рухомості (EMSA, Приклад 18). Міченим (кДНК-зондам, що відповідають основам від -33 до -75 (що містять елемент IRF-E) і від -8 до -55 (що містять елемент GAS), дають можливість зв'язуватися з ядерними екстрактами контрольних і γ -IFN-оброблених клітин. Комплекс, що містить IRF-E зонд і ядерний білок (ядерні білки), стає видимим після інкубації клітин протягом 1 год. з γ -IFN, а максимальну відповідь спостерігають через 3 год. (Фіг. 7A, доріжки 1-5). Як і потрібно було чекати, додання антитіл до IRF-E викликає "суперзміщення", тоді як антитіла передавача сигналу і активатора транскрипції 1 (STAT1) не надають впливу (дані не представлені). У протилежність до IRF-E, GAS-вмісний зонд конститутивно асоціюється з білком (Фіг.7A, доріжка 6) і даний комплекс посилюється при індукції клітин за допомогою γ -IFN протягом 3-6 год. (доріжки 7, 8). Як і очікувалося, GAS зв'язує γ -IFN-індукований STAT1-димер. Проте, даний комплекс не зазнає впливу антитіл до STAT1 (доріжка 10), що примушує передбачити, що цей γ -IFN-індукований STAT1-димер не зв'язується з елементом GAS. Такий же негативний результат був отриманий з ядерними екстрактами клітин, обробленими за допомогою γ -IFN протягом лише 15 або 30 хв. (дані не представлені). Разюче, але даний комплекс руйнується антитілами до C/EBP β (доріжка 9) і зміщується антитілами до IRF-1 (доріжка 10). Отже, GAS-вмісний ДНК-зонд, мабуть, зв'язується з C/EBP β , незважаючи на відсутність загального типового елемента структури C/EBP β E.

Результати, отримані за допомогою EMSA, свідчать про те, що при γ -IFN-індукції, IRF-1 зв'язується з IRF-E-елементом в даному IL-18BP-промоторі. Крім того, утворюється комплекс, що включає IRF-1 і C/EBP β , який зв'язується з вказаним GAS-елементом.

Приклад 9:

Вивчення ролі комплексу IRF-1-C/EBP β в індукції IL-18BP

При подальшому вивченні ролі IRF-1 і C/EBP β в індукції IL-18BP-гена услід за понадекспресією IRF-1 і C/EBP β вимірюють рівень мРНК IL-18BP за допомогою напівкількісної ЗТ-ПЛР, застосовуючи трансфекцію експресійних векторів (Приклад 14, Фіг.7В). Надекспресія транскрипційного фактора або сполучення обох факторів в HerG2-клітинах не індукують мРНК IL-18BP. Даний результат дозволяє передбачити, що для активації IL-18BP-гена необхідні додаткові γ -IFN-індуковані фактори. Трансфекція даних клітин будь-яким одним з вказаних експресійних векторів услід за їх індукцією за допомогою γ -IFN, в порівнянні з однією лише γ -IFN-індукцією, насправді знижують рівень мРНК IL-18BP. Протилежно до цього, коекспресія двох транскрипційних факторів збільшує індукцію мРНК IL-18BP завдяки γ -IFN. Даний результат дозволяє передбачити, що IRF-1 і C/EBP β повинні бути представлені в певному співвідношенні, ймовірно утворюючи комплекс з вказаним комплексом ініціації транскрипції. При подальшому вивченні здійснюють можливу взаємодію між IRF-1 і C/EBP β титруванням люциферазної активності після котрансфекції клітин за допомогою pGJ3 (1272), фіксованою кількістю експресійного вектора IRF-1 і кількостями експресійного вектора C/EBP β , що змінюються. Подібним чином, люциферазну активність вимірюють при незмінній кількості C/EBP β -вектора і з різними кількостями IRF-1 -вектора. У обох випадках отримують дзвоноподібну дозозалежну криву, і це примушує вважати, що для оптимальної IL-18BP-індукції потрібне незмінне мольне співвідношення цих двох транскрипційних факторів (Фіг.7С).

Дослідження по імунопреципітації здійснюють для того, щоб підтвердити фізичний зв'язок між IRF-1 і C/EBP β (Приклад 19, Фіг. 7 D). Імунопреципітація (ip) з подальшим імуноблотингом (ib) ядерних і цитоплазматичних білків (Приклад 15) з γ -IFN-оброблених клітин антитілами до C/EBP β виявляє, що C/EBP β конститутивно експресується в HerG2-клітинах і переміщується в їх ядра у відповідь на γ -IFN (верхня панель). Протилежно до C/EBP β , який не індукується за допомогою γ -IFN, ip і ib клітинних екстрактів антитілами до IRF-1, виявляють, що γ -IFN індукує експресію IRF-1. Але подібно C/EBP β при γ -IFN-індукції IRF-1 переміщується в клітинні ядра (середня панель). Ip антитілами до C/EBP β і подальшим ib антитілами до IRF-1 виявляють присутність стабільного комплексу IRF-1-C/EBP β в даній ядерній фракції (нижня панель). Ці результати підтверджують утворення вказаного комплексу IRF-1 -C/EBP β після γ -IFN-індукції, що уперше демонструє існування такого комплексу між цими двома транскрипційними факторами. Таким чином, при γ -IFN-індукції найближча GAS-вмісна послідовність і примикаючий до неї елемент IRF-E зв'язують вказаний комплекс, що складається з C/EBP β і IRF-1.

Приклад 10:

З'ясування ролі C/EBP-E-елементів для IL-18BP-промоторної активності

Два C/EBP β -сайти в положеннях від -309 до -322 і від -621 до -634 не межують із суміжним IRF-E-елементом. Дійсно, EMSA (Приклад 18) зонда, що кореспондує з C/EBP β -сайтами в положеннях

від -309 до -322, показує уповільнену смугу (зачорнена стрілка), яку сильно зміщують антитіла до C/EBP β (світла стрілка), але не антитіла до IRF-1 (Фіг.8А). Тому був зроблений висновок про те, що даний сайт зв'язує C/EBP β , а не його комплекс з IRF-1. Крім того, дана смуга породжується ядерним екстрактом неіндукованих HerG2-клітин, які конститутивно експресують C/EBP β , але не містять IRF-1. Дійсно, γ -IFN не збільшує експресію C/EBP β в цих клітинах (Фіг.8D) і, отже, не збільшує інтенсивність вищезгаданої уповільненої смуги (Фіг. 8А). Аналогічні результати отримані і з більш дистальним C/EBP β -сайтом (дані не представлені).

Ці результати показують, що, на відміну від транскрипційного фактора IRF-1, транскрипційний чинник C/EBP експресується конститутивно і не індукується за допомогою γ -IFN, і що крім зв'язування з IRF-1 і з GAS, він зв'язується з обома C/EBP-елементами, присутніми в IL-18BP-промоторі.

Приклад 11:

Вивчення ролі енхансера в експресії IL-18BP

Регуляторну роль дистального енхансера вивчають по EMSA (Приклад 28) за допомогою 192 п.н. ДНК-зонда, який відповідає нуклеотидам від -1081 до -1272. Ядерний екстракт контрольних HerG2-клітин з даним зондом утворює комплекс (Фіг.8В, зачорнена стрілка). Після обробки вказаних клітин за допомогою γ -IFN комплекс, що утворився, виявляється більш інтенсивним і частково більш уповільненим. Потім здійснюють надсильне зміщення даного комплексу антитілами до IRF-1, C/EBP β і cFos. З них тільки анти-IRF-1 спричиняє надсильне зміщення (Фіг.8В, світла стрілка). Немічена dsДНК, відповідна нуклеотидам від -1083 до -1174, не конкурує з радіоактивно міченим зондом, свідчаючи про те, що дані ядерні білки пов'язані із залишками від -1175 до -1272. Оскільки IRF-E ідентифікують тільки в проксимальній ділянці, даний результат дозволяє передбачити, що даний дистальний енхансер, ймовірно, асоційований з проксимальним IRF-E.

Дані результати свідчать про те, що даний дистальний енхансер взаємодіє з базисним промотором через IRF-1.

Приклад 12:

ІФА IL-18BP

Рівень IL-18BP людини вимірюють за допомогою ІФА-методу подвійних антитіл, як описано (Novick і співавт. 2001). Мишачий IL-18BP вимірюють ІФА-методом подвійних антитіл з використанням поліклонального антитіла до мишачого IL-18BP, виділеного очищенням по спорідненості до кролячого антигену, і біотинільованого антитіла, який був отриманий від Cytolab, Ізраїль.

Приклад 13:

Виділення РНК і зворотнотранскриптазна (ЗТ)-ПЛР

Після обробки в безсироватковому середовищі у вказаний час збирають HerG2- і WISH-клітини (10^6) і екстрагують тотальну РНК з використанням TRI-реагенту. кДНК отримують з використанням випадкових гексамерів і SuperscriptII (Invitrogen™, Leek, Голландія), відповідно до інструкцій виробника. ПЛР здійснюють за допомогою наступних

праймерів: IL-18BP людини, 5' CACGTCGCTCACTCTCCTGG i 5'CGACGTGACGCTGGACAAC; IRF-1 людини 5' GACCTGGCTAGAGATGCGAG i 5'GACCTGCTGAGTCCATCAG; β -актину людини 5'GTGGGGCGCCCCAGGCACCA i 5'CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC. Ампліфікацію здійснюють за допомогою початкової денатурації (92°C, 2 хв.), 28 циклів денатурації (92°C, 45 сек.), відпалу (62°C, 1 хв.) і подовження (72°C, 1,5 хв.), і завершального подовження (72°C, 10 хв.). Отримані ПЛР-продукти розділяють електрофорезом в агарозному (1%) гелі.

Приклад 14:

Швидка ампліфікація 5'-кінців кДНК (5'-RACE)

5'-RACE здійснюють за допомогою 5'RACE-System (GIBCO BRL) відповідно до інструкцій виробника. Коротку, тотальну РНК з γ -IFN-оброблених WISH-клітин зворотню транскрибують за допомогою праймера, комплементарного нуклеотидам 89-70 з мРНК IL-18BP (GenBank, каталожний №AF 110799) з подальшим нарощуванням кінців, що знову синтезуються за допомогою якірної ДНК. Потім ПЛР здійснюють за допомогою прямого праймера, комплементарного якірній ДНК, і гніздового зворотного праймера, комплементарного нуклеотидам 31-11 з мРНК IL-18BP. Потім отримані ПЛР-продукти субклонують і піддають ДНК-секвенуванню.

Приклад 15:

Плазмиди і клонування

Повну передбачувану IL-18BP-промоторну ділянку розміром 1601 п.н. отримують за допомогою ПЛР з геномної ДНК з використанням смислового праймера (S_{4753.Pgl}), що містить Kpn I-сайт (5'CTATATGGTACCCACCTTCCTTTTACTTTTCC) і зворотного праймера (RlexA), що містить Nhe I-сайт (5'TATCGCTAGCCAGTCACACAGGGAGGCAGT). Отриманий ПЛР-продукт клонують у вектор pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI) і верифікують за допомогою ДНК-секвенування. Kpn I-Nhe I-фрагмент виділяють з клону pGEM-T Easy і лігують в pGL3 -Basic-вектор (Promega) з використанням набору Rapid DMA Ligation Kit (Roche), що дає pGL3 (1601). Групу 5'-укорочених репортерів pGL3 (1454), pGL3 (1274), pGL3 (1106), pGL3 (656), pGL3 (280) і pGL3 (122) отримують аналогічним чином, відповідно, за допомогою того ж зворотного праймера і з нижченаведеними смисловими праймерами:

S_{334.pgl} 5':
STATATGGTACCCATGAACCTAGACACCTAGAG;
S_{415.pgl} 5':
STATATGGTACCCTACAAGAAGTTTGAGATCA;
1exD pgl
5'CTATATGGTACCGTCTTGGAGCTCCTAGAGG;
S_{504.pgl}
5'CTATATGGTACCCACCAAAGTCCTGACACTTG i
S_{139.pgl}
5'TTGGTACCCACTGAACCTTTGGCTAAAGC.

Всі ПЛР-продукти також клонують в pG-Basic-Вектор в протилежній орієнтації, який служить як контроль.

Приклад 16:

Тестування часової трансфекції

HepG2- або WISH-клітини в 6-ямкових планшетах (0,5x10⁶/ямка) трансфікують з використанням FuGENE 6 і вказаного люциферазного репортерного вектора (0,5 мкг/ямка), а також β -GAL pSV40 (0,2 мкг/ямка, Promega) відповідно до інструкцій виробника. У деяких випадках котрансфекцію здійснюють за допомогою нижченаведених експресійних векторів: pcDNA3-IRF-I (0,07-1,5 мкг/мл, люб'язно наданим д-ромом B.Levy, Yechnion, Israel); pcDNA3-C/EBP β (0,5-2,5 мкг/ямка, люб'язно наданим д-ромом D.Zipori, Weizmann Institute of Science). Через 16 год. клітини обробляють в безсироватковому середовищі протягом 24 год. за допомогою γ -IFN (100 Од./мл), або IL-6 (150 Од./мл), або α -TNF (10 нг/мл) або їх вказаними сполученнями. Потім клітини збирають, лізують і вимірюють активність люциферази. Всі результати коректують по β -галактозидазній активності.

Приклад 17:

Отримання ядерних і цитоплазматичних екстрактів

Клітини промивають 3х за допомогою крижаного фосфатно-сольового буферного розчину (PBS) і відразу заморожують в рідкому азоті. Осідання клітин ресуспендують в чотирьох об'ємах, по відношенню до осаждених клітин, цитоплазматичного буфера (10 mM Hepes, pH 7,9, 10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 5% (по об.) гліцерину, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM дитіотреїтолу (DTT), 0,5 mM PMSF, 50 mM NaF, 0,1 mM Na₃VO₄, 2 mM EGTA, 10 mM EDTA, 10 mM Na₂MoO₄, 2 мкг/мл кожного, лейпептину, пепстатину і апротиніну). Отриманий лізат центрифугують (3000хg, 10 хв.) і збирають отриманого супернатанту, що містить цитоплазматичні білки. Отриманий осад ресуспендують в 2,5 об'ємах, по відношенню до осаждених клітин, ядерного буфера (ідентичного цитоплазматичному буферу за тим винятком, що концентрацію NaCl збільшують до 0,42 M). Ядерний дебрис видаляють центрифугуванням (15000хg, 20 хв., 4°C), аліквоти отриманого супернатанту заморожують в рідкому азоті і зберігають при -80 °C. Концентрацію білка визначають за допомогою BCA-набору реагентів для аналізу білка (Pierce, Rockford США) з використанням бичачого сироваткового альбуміну як стандарту.

Приклад 18:

Аналіз зміщення електрофоретичної рухомості Ds-олігонуклеотиди, відповідні вибраним елементам відповіді (10 пкмоль), мітять [³²P]3 АТФ за допомогою полінуклеотидкінази (New England Biolabs). Ядерні екстракти (5 мкг білка) преінкубують (15 хв., 0°C) разом з полі(dI-dC) (Amersham Pharmacia biotechnology) в 20 мл EMSA-буфера (20 mM Hepes pH 7,5; 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 5 mM DTT і 5% (по об.) гліцерину). Потім додають мічений зонд (3x10 cpm) і інкубацію продовжують при кімнатній температурі протягом додаткових 30 хв. Для аналізу надсильного зміщення зразки, перед доданням зонда, інкубують з вказаними антитілами (4 мкг, 1 год. при 0°C). 200-кратний надлишок конкурента дикого і зміненого типу додають разом з даним прийнятним зондом. Потім реакційні суміші піддають електрофорезу в 5%-х неденатуруючих поліакриламідних гелях. Гелі сушать у

вакуумі і радіоавтографують протягом ночі при -80°C.

Приклад 19:

Імунопреципітаційний аналіз (ip) і імуноблот-аналіз (ib)

Ядерні або цитоплазматичні білкові екстракти (80 мкг) інкубують з 6 мкг вказаних поліклональних антитіл протягом ночі при 4°C і імунопреципітують на білок-G-сефарозних кульках (Pharmacia) протягом 1 год. при кімнатній температурі. Потім дані кульки кип'яють в SDS-ПААГ-буфері для зразків, що містить 10% DTT і отриманий супернатант розділяють в SDS-ПААГ (10% акриламід) в відновлюючих умовах. Потім електрофорезований гель блотують на нітроцелюлозну мембрану і білки детектують за допомогою вказаних антитіл. Імунні комплекси ідентифікують, використовуючи набір Super Signal™ (Pierce).

Приклад 20:

Отримання CHO-r-hsLDLR з використанням IL-18-промотору

Стабільні рекомбінантні CHO-клітини, які експресують розчинний LDLR людини, створюють шляхом котрансфекції CHO-DUKX-клітин, що не мають дигідрофолатредуктазного (DHFR) гена (Urlaub G. і співавт., 1980), за допомогою двох експресійних векторів: одного, що містить N-кінцевий лігандзв'язувальний домен з LDLR, що починається від амінокислотного залишку Asp (+4) і до Glu 291 (+291), і rDHFR, що містить мишачий ген для DHFR, DHFR, що контролюється раннім SV40-промотором, і sLDLR-гена під IL-18BP-промотором (SEQ ID NO:2), а також термінуючими транскрипційними елементами з ранньої ділянки SV40. Трансфекцію здійснюють за допомогою катіонних ліпосом з використанням LipofectAmine (Gibco BRL), відповідно до протоколу, описаного виробником. Через сімдесят дві години трансфекції клітини переносять в селективне середовище, що не містить дезокси- і рибонуклеозидів, з доданням 10%-ї діалізованої FCS. Клітини, які експресують DHFR-активність, здатні утворювати колонії, які відділяють шляхом відшарування даних клітин за допомогою насичених трипсином паперових дисків. Витягнуті клітини вирощують і перевіряють на r-hsLDLR-активність. Потім трансфіковані клітини піддають генній ампліфікації за допомогою MTX, з подальшим субклонуванням стабільних клонів-продуцентів.

Список літератури

- Bahner 1993 J Virol 67:3199.
Breni et al. 1992 Blood 80:1418.
Boshart et al. 1985 Cell 41:521.
Brinster et al. (1981) Cell 27:233.
Cassel 1993 Exp Hematol. 21: 585.
Chao 1993 Blood 81:2031.
Chen 1997 Nat Med 3:1110.
Costantini et al. (1981) Nature 294: 982.
Couture 1996 Trends Genet 12: 510.
Dignam et al. 1983 Nucleic Acid Res. 11: 1475
Dijkema et al. 1985 EMBO J 4:761.
Dunbar 1995 Blood 85: 3048.
Dyan and Tjian 1985 Nature 316:774.
Dyan W 1989 Cell 58:1-4.
Fletcher et al. 1987 Cell 51:773-781.
Fried et al. 1981 Nucleic Acids Res. 9, 6505.

- Gale et al. 1992 Transplant 9:151.
Gordon et al. (1976) PNAS 73: 1260.
German et al 1982b PNAS 79:6777.
Henon et al. 1992 Transplant 9: 285.
Herzog, R.W., Hagstrom, J.N., Kung, S.H., Tai, S.J., Wilson, J.M., Fisher, K.J. & High, K.A. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 5804-5809
Harpers et al. (1981) Nature 293:540.
Hao et al. 1995 Blood 86:3745.
Junker 1997 Blood 89:4299.
Kearns 1997 Human Gene Ther 8: 310.
Kohn et al. (1999) Blood 94:368.
Lee 1994 J.Virol 68:8254
Lili Wang*, Kazuaki Takabe*, Scott M. Bidlingmaier†, Charles R. III†, and Inder M. Verma* Vol. 96, Issue 7, 3906-3910, March 30, 1999 Sustained correction of bleeding disorder in hemophilia B mice by gene therapy
Lotti et al. 2002 J of Virol. 76:3996.
Malim 1989 Cell 58:205.
Maniatis et al 1987 Science 236:1237.
Marasco 1997 Gene Ther 4:11.
Muhl, H., Kampfer, H., Bosmann, M., Frank, S., Radeke, H. & Pfeilschifter, J. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 267, 960-963.
Murphy, J. E., Zhou, S., Giese, K., Williams, L. T., Escobedo, J. A. & Dwarki, V. J. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94,13921-13926.
Neighbors, M., Xu, X., Barrat, F.J., Ruuls, S.R., Churakova, T., Debets, R., Bazan, J.F., Kastelein, R.A., Abrams, (2001) J. Exp. Med. 194, 343-354.
Novick, D., Schwartzburd, B., Pinkus, R., Suissa, D., Belzer, I., Sthoeger, Z., Keane, W.F., Chvatchko, Y., Kirn, S.H., Fantuzzi, G., Dinarello, C.A. & Rubinstein, M. (2001) Cytokine 14, 334-342.
Novick D, Kim SH, Fantuzzi G, Reznikov LL, Dinarello CA, Rubinstein M. Immunity 1999 Jan; 10(1): 127-36.
Novick D, Schwartzburd B, Pinkus R, Suissa D, Belzer I, Sthoeger Z, Keane WF, Chvatchko Y, Kim SH, Fantuzzi G, Dinarello CA, Rubinstein M. Cytokine 2001 Jun 21; 14(6):334-4.2
McKnight and Tjian 1986 Cell 46:795.
Mioshi et al. 1999 Science 283: 682.
Moritz 1993 J Exp Med 178:529.
Palmiter et al. 1986 Ann Rev. Genet. 20:465.
Revzin 1989 Biotechniques 7:346
Sassone-Corsi and Borrelli 1986 Trends Genet 2:215
Scheidereit et al. 1987 Cell 51: 783-793.
Slobod 1996 Blood 88, 3329
Snyder, R. O., Miao, C H., Patijn, G. A., Spratt, S. K., Danos, O., Nagy, D., Gown, A. M., Winther, B., Meuse, L., Cohen, L. K., et al. (1997) Nat. Genet. 16, 270-276.
Snyder, R.O., Miao, C, Meuse, L., Tubb, J., Donahue, B.A., Lin, H.F., Stafford, D.W., Patel, S., Thompson, A.R., Nichols, T., et al. (1999) Nat. Med. 5, 64-70.
Song, S., Morgan, M., Ellis, T., Poirier, A., Chesnut, K., Wang, J., Brantly, M., Muzyczka, N., Byrne, B.J., Atkinson, M., et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 38 14384-14388.
Sullenger 1990 Cell 63:601.
Veres et al. 1996 J Virol 70: 8792
Verma et al. 1997 Nature 389:239.

31

88601

32

Voss et al. 1986 Trends Biochem Sci. 11:287.
 Wagner et al. (1981) PNAS 78:5016
 Xiao, W., Berta, S. C., Lu, M. M., Mosconi, A. D.,
 Tazelaar, J. & Wilson, J. M. (1998) J. Virol. 72,
 10222-10226.

Zecchina G, Novick D, Rubinstein M, Barak V,
 Dinarello C, Nagler A. J Hematother Stem Cell Res.
 2001 Dec; 10(6):769-76.
 Zhou 1994 Gene 149:33.
 Zweibel et al. 1989 Science 243: 220.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Yeda Research and Development Co. Ltd
 Rubinstein, Menachem
 Novick, Daniela
 Nurgin, Vladimir

<120> Промотор для IL-18BP, його отримання і використання

<130> 596PCT

<150> 152232

<151> 2002-10-10

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1272

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

```

<400> 1
catgaactag acacctagag aagaaggatg tgacttgtag tatcctatgt ctaaattagg    60
aatatgaatc tggtttttct acaagaagtt tgagatcaca gctgactgtg ttcttgatgc    120
atccacaaa cccagttcca tctgtgggcc tccctggctc tgtcaccagc cgttgacccc    180
tcccaatcac aggagtcaca aacctcagac atgcagctcc tgtccacact taatatatgc    240
atgcattgga tcaccagcc ctggtctttc tgcctccatg gataactgca tgaccctgag    300
agaaaacctc cttagattta gcatcctagg ttcttcacac gcctcaccct gaatcctggc    360
cctcccgag ccccgagcgc atttgtccca tcagtgaaca gattcatatt ctgatgtaga    420
ctctgttgcc agagccagtg ttgagccagt ccgcctcttc cccgggaagt gcctgccctt    480
ccctcctgtt agggttggct ctcgagcttg tgtgccagtt cctgggttgg ccgtgagagt    540
tctacagaca aggaggaagt gctctcgggt tatttcctgt ggtgggttca cagcagcta    600
gacacagcta acttgagtct tggagctcct agagggaagc ttctggaaag gaaggctctt    660

```


33

88601

34

caggacctct taggagccag gtaggagtct gggactacta gtgaacctag acctgtggct	720
ctggccagag gggctaggat gagagacaga ggggtgtgat gtgggtgctg ggagatgtag	780
ccgaccttgg ggctggtggc tgggggagtg ggtagcctgg gaaaggccag gatgtggacg	840
gactggtatg gcattgagcc tgaagtggc caacttgggg tccccagtg cctaggaaag	900
ttgtcccctt gaatgtcagt gtgaaggta aggaggaagc agatgcctgt tcatatggaa	960
acaaagacct ggctgtgaag agggggggcg gacaccaaag tcctgacact tgggcgggac	1020
agaattgatc tgtgagagac tcatctagtt cataccctag gtgaccctgg gggtgggcatg	1080
ggggtagatt agagatccca gtctggtatc ctctggagag taggagtccc aggagtctaa	1140
ggtttctggc cactgaactt tggctaaagc agaggtgtca cagctgctca agattccctg	1200
gttaaaaagt gaaagtgaag tagagggctg gggcagtgct tccccagaag gattgctcgg	1260
catcctgccc tt	1272

<210> 2

<211> 634

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 2

gcttctggaa aggaaggctc ttcaggacct cttaggagcc aggtaggagt ctgggactac	60
tagtgaacct agacctgtgg ctctggccag aggggctagg atgagagaca gagggtgtga	120
tgggtgggtg tgggagatgt agccgacctt ggggctgggt gctgggggag tgggtagcct	180
gggaaaggcc aggatgtgga cggactggta tggcattgag cctgaagtgg tccaacttgg	240
ggttccccag tgcctaggaa agttgtcccc ttgaatgtca gtgtgaaggt gaaggaggaa	300
gcagatgcct gttcatatgg aaacaagac ctggctgtga agaggggagg cggacaccaa	360
agtcctgaca cttgggcggg acagaattga tctgtgagag actcatctag ttcataccct	420
aggtgaccct ggggggtgca tgggggtaga ttagagatcc cagtctggta tcctctggag	480
agtaggagtc ccaggagctg aaggttctg gccactgaac ttgggctaaa gcagagggtg	540
cacagctgct caagattccc tggtaaaaa gtgaaagtga aatagagggt cggggcagtg	600
ctttcccaga aggattgctc ggcatcctgc cctt	634

<210> 3

<211> 122

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 3
 cactgaactt tggctaaagc agaggtgtca cagctgctca agattccctg gttaaaaagt 60
 gaaagtgaag tagagggctg gggcagtgct tccccagaag gattgctcgg catcctgccc 120
 tt 122

<210> 4
 <211> 1061
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 tgcagctcct gtccacactt aatatatgca tgcattggat cccccagccc tggctcttct 60
 gcctccatgg ataactgcat gacctgaga gaaaacctcc ttagatttag catcctagggt 120
 tcctcacaag cctcaccctg aatcctggcc ctcccgcagc cccagcgcca tttgtcccat 180
 cagtgacaag attcatattc tgatgtagac tctgttgcca gagccagtgt tgagccagtc 240
 cgctctctcc cggggaagtg cctgcccttc cctcctgtta ggggtggctc tcgagcttgt 300
 gtgccagttc ctgggttggc cgtgagagtt ctacagacaa ggagggaagt ctctcgggtg 360
 atttctctgt gtgggttcac acgcagctag acacagctaa cttgagctct ggagctccta 420
 gaggggaagt tctggaaagg aaggctcttc aggcacctct agggagccagg taggagctctg 480
 ggactactag tgaacctaga cctgtggctc tggccagagg ggctaggatg agagacagag 540
 ggtgtgatgg tgggtgctgg gagatgtagc cgaccttggg gctgtgtgct gggggagtg 600
 gtagcctggg aaaggccagg atgtggacgg actggtatgg cattgagcct gaagtgggtcc 660
 aacttggggt tccccagtcg ctaggaaagt tgtccccttg aatgtcagtg tgaagggtgaa 720
 ggaggaagca gatgcctgtt catatggaaa caaagacctg gctgtgaaga ggggagggcg 780
 acaccaagt cctgacactt gggcgggaca gaattgatct gtgagagact catctagttc 840
 ataccctagg tgaccttggg ggtggcatgg gggtagatta gagatccag tctggtatcc 900
 tctggagagt aggagtccca ggagctgaag gtttctggcc actgaacttt ggctaaagca 960
 gaggtgtcac agctgtcaa gattccctgg ttaaaaagtg aaagtgaat agaggggtcgg 1020
 ggcagtgtt tcccagaagg attgctcggc atcctgccct t 1061

<210> 5
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 cccagaagca gctctggtgc tgaagagagc actgcctccc tgtgtgactg g 51

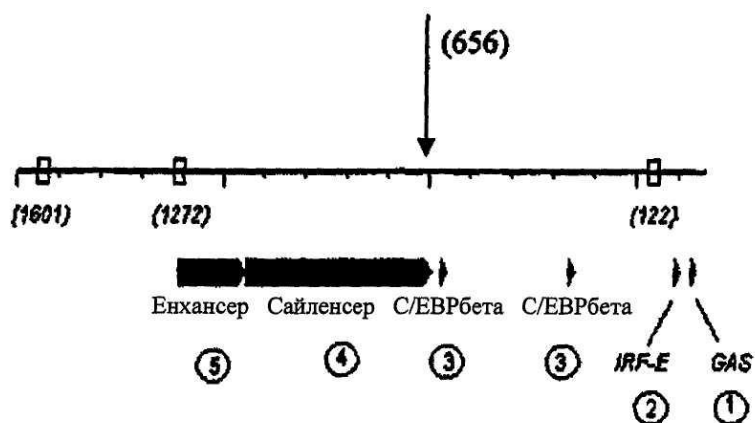
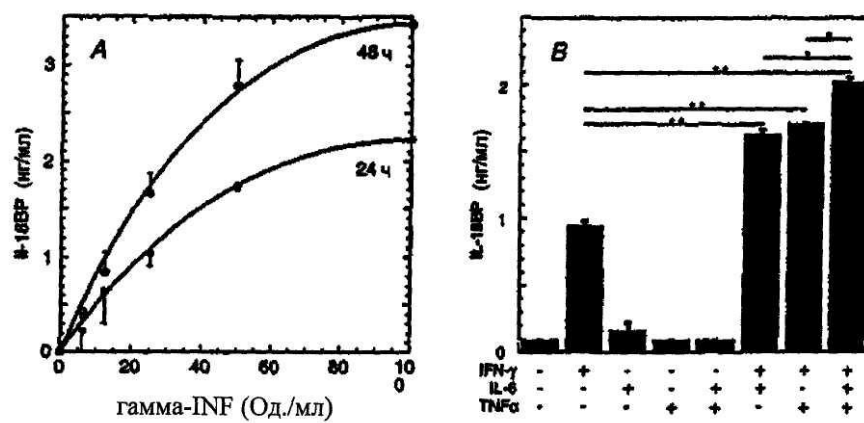
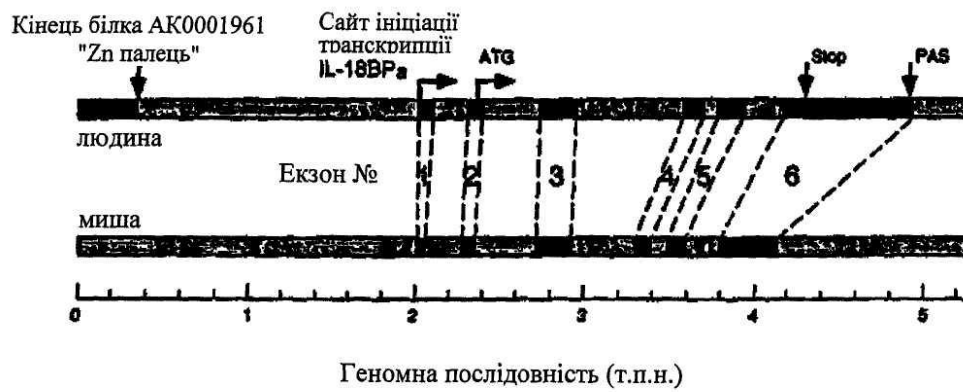


Fig. 1



Фиг. 2



Фіг. 3

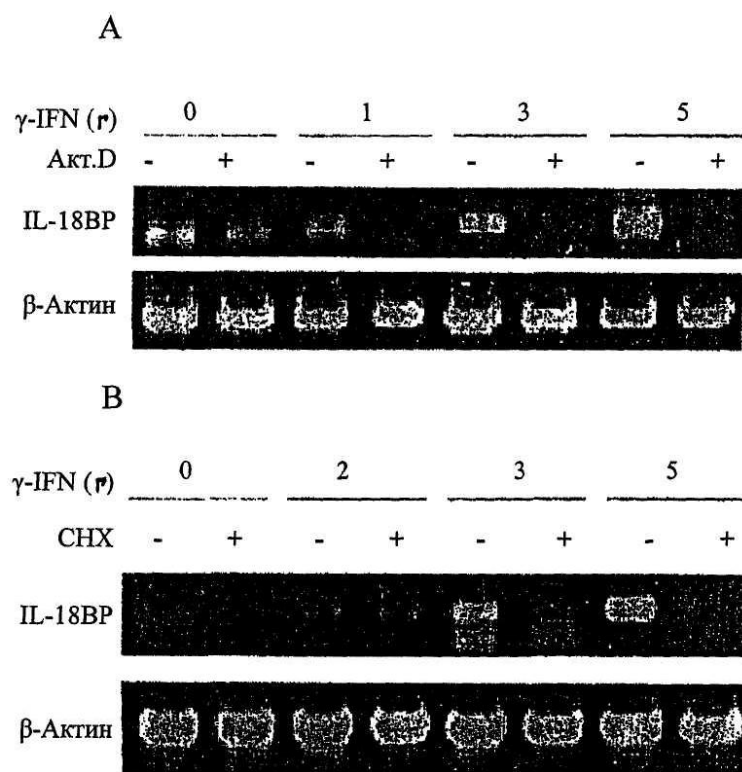
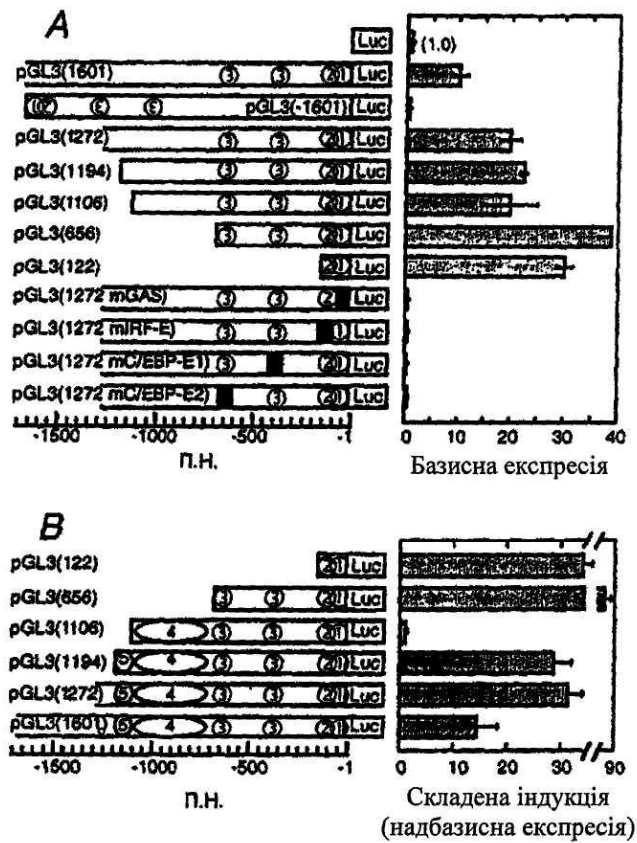


Fig. 4



Фіг. 5

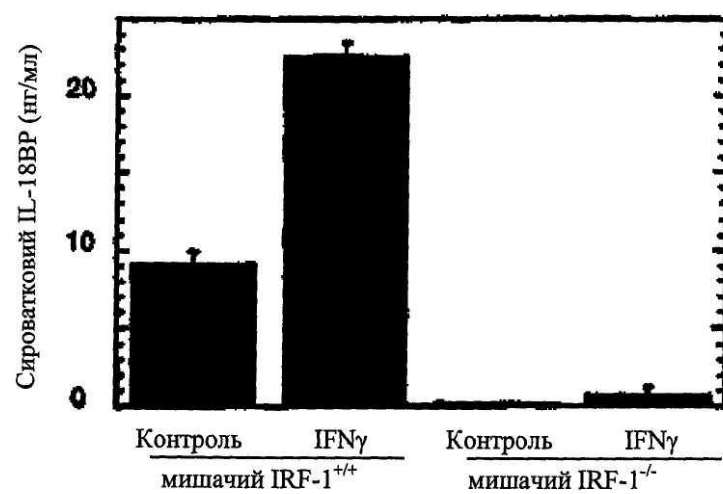
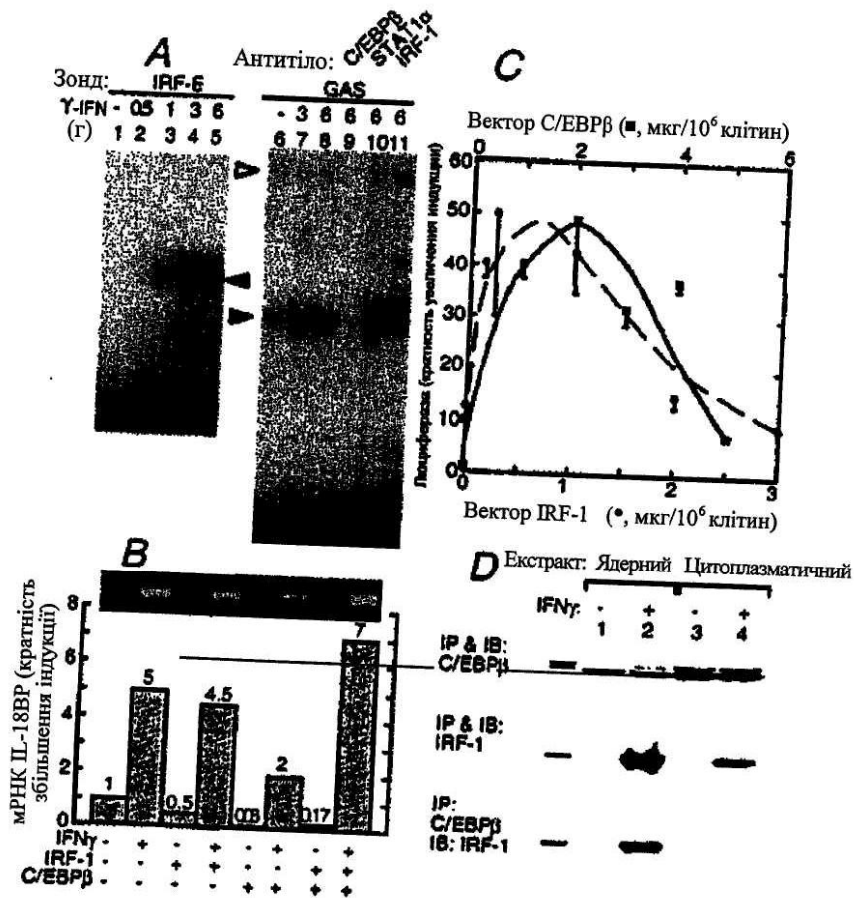
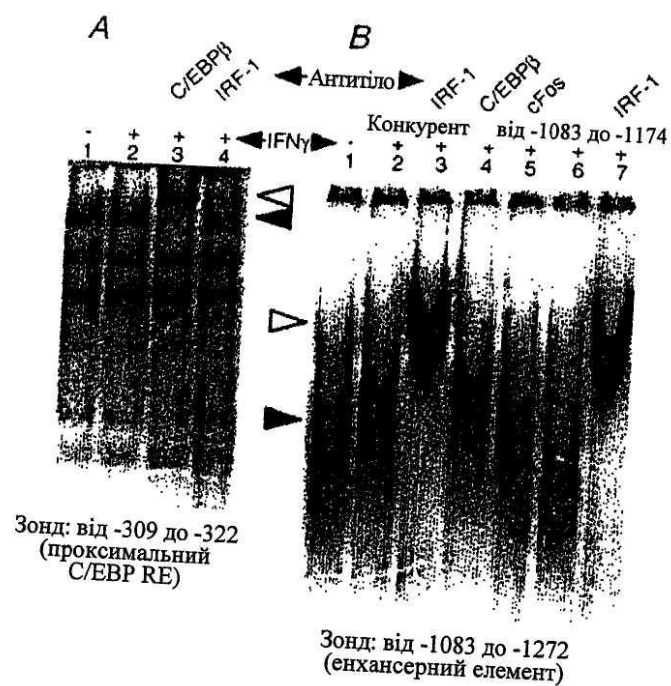


Fig. 6



Фіг. 7



Фіг. 8