

Даний винахід відноситься до 5'-розташованої ділянки ДНК, яка включає промотор гена, що кодує білок морфогенезу кісток (тут і надалі позначається як BMP-7). Крім того, даний винахід відноситься до способу аналізу низькомолекулярної сполуки, яка позитивно або негативно регулює експресію гена BMP-7 людини, з використанням масиву клітин тварини або дріжджів, у які вносять рекомбінантний експресуючий вектор, який включає 5'-розташовану ділянку ДНК, у складі якої є промотор BMP-7 людини, з'єднаний з відповідним геном-репортером з використанням активності гена-репортера як індикаторної ознаки.

Дотепер було встановлено, що активність, пов'язана з морфогенезом кісткової тканини, властива фактору морфогенезу кісток - BMP, що відноситься до суперсімейства TGF- $\beta$  (трансформуючі фактори росту) (Science, 1965, 150, 893-897; Science, 1988, 242, 1528-1534). Відомими типами BMP є білки від BMP-1 до BMP-14. Серед них для факторів від BMP-2 до BMP-14 була підтверджена наявність активності по контролю морфогенезу (формування) кісток. Білки BMP від BMP-2 до BMP-14 вважаються ефективними з точки зору лікування і профілактики різних патологій кісток та захворювань кісток, однак в природі вони існують у надзвичайно малих кількостях. Отже, доступність великої кількості білків від BMP-2 до BMP-14, необхідних для зазначеного лікування, вимагає отримання рекомбінантного білка. Вироблення рекомбінантного білка звичайно є вельми високовитратним процесом у порівнянні з отриманням низькомолекулярних сполук. До того ж, існує цілий ряд обмежень для лікарського засобу з точки зору його фізичних властивостей та способів його введення, пов'язаних з характеристиками білка. З урахуванням цих зауважень низькомолекулярна органічна сполука, яка реально має активність, рівну такій активності білка BMP, може бути дуже перспективним лікарським засобом. Сполука, яка одержується при аналізі із застосуванням способу, що заявляється даним винаходом, має активність по індукції експресії BMP-7 людини, що є фактором остеогенезу, а також характеризується ефективністю, такою ж як у BMP-7 людини, що вказує на його ефективну застосовність. З іншого боку, якщо BMP-7 людини пов'язаний з гіперплазією кісткової і хрящової тканин, то приглушення його експресії може запобігати остеогіперплазії. Відповідно до даного винаходу можна ідентифікувати приглушення експресії BMP-7, і даний винахід представляє спосіб аналізу речовини з точки зору приглушення гіперплазії. Крім того, відомо, що BMP-7 людини має активність по посиленню диференціровки ниркових клітин (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 9021-9026). Таким чином, представлену даним винаходом експериментальну систему можна включити до способу аналізу агента, призначеного для лікування захворювання нирок.

З точки зору такого аналізу єдиним раніше опублікованим прикладом є використання промотору гена BMP-2 (міжнародна патентна заявка WO 97/15308), причому прикладів застосування промотору гена BMP-7 не було. Крім того, оскільки матеріали, які представляються даним винаходом для способу, що заявляється, походять від організму людини, то можна чекати, що виявлені сполуки проявлять ефект при їх практичному застосуванні.

Даний винахід представляє 5'-розташовану ДНК, яка включає промотор гена BMP-7 людини. З використанням промотору, розташованого у 5'-частині гена BMP-7 людини, з'єднаного з відповідним геном-репортером, і клітини тварини, до якої внесено рекомбінантний експресуючий вектор, низькомолекулярні сполуки, які позитивно або негативно регулюють експресію гена BMP-7 людини, можуть бути проаналізовані по активності репортера. Низькомолекулярні сполуки та їх похідні мають морфогенетичну активність та інгібіторну активність по відношенню до кісткової і хрящової тканин за типами активності BMP-7 людини, і вони є ефективними як профілактичними або терапевтичними засоби проти захворювань хрящової і кісткової тканин, засоби проти розвитку кісткових метастазів або терапевтичні та профілактичні засоби проти надмірного остеогенезу. До того ж, ці низькомолекулярні сполуки та їх похідні можна застосовувати як профілактичні або терапевтичні агенти по відношенню до хвороб нирок.

На Фігурі 1 показана екзон-інтронна структура 5'-розташованої ділянки гена BMP-7 людини довжиною 10,8 тисяч пар нуклеотидів та його рестрикційна карта. Зафарбована ділянка відповідає екзону і незафарбована після нього ділянка - інтрону.

На Фігурі 2 зображений рекомбінантний експресуючий вектор (плазмідна рMSS115), який включає 5'-сегмент гена BMP-7 людини. Промоторний сегмент довжиною 4400 пар нуклеотидів (нуклеотиди 3813-8222, показані у SEQ ID NO:1 списку послідовностей, наведені від другого XbaI-сайта до третього XbaI-сайта 5'-кінцевої структури на Фіг.1) був вбудований по рестрикційному NheI-сайту вихідної плазмідної рGL3.

На Фігурі 3 показані результати вимірювань активності промотору гена BMP-7 людини (при експресії непостійного типу).

Даний винахід відноситься до ДНК, нуклеотидна послідовність якої показана у вигляді переліку нуклеотидів від 1 до 10877 у SEQ ID NO:1 списку послідовностей, яка кодує промоторну ділянку гена білка-7 морфогенезу кісток людини або його фрагмент. У послідовності SEQ ID NO:1 списку послідовностей показана 5'-розташована ділянка гена BMP-7 людини.

Даний винахід відноситься до способу одержання ДНК, показаної у SEQ ID NO:1 списку послідовностей, шляхом здійснення таких стадій:

- (1) розщеплення геномної ДНК клітин плаценти людини рестриктазою HindIII;
- (2) виділення із застосуванням електрофорезу у агарозному гелі;
- (3) клонування виділеного, розщепленого рестриктазою HindIII фрагмента ДНК у фаговий вектор  $\lambda$ DASH-1, попередньо розщеплений тією ж рестриктазою;
- (4) упаковка згаданого вектора у зрілу фагову частинку;
- (5) одержання геномної клонотеки шляхом інфікування клітин *Escherichia coli* одержаним фагом;
- (6) скринінг за допомогою ПЛР; і
- (7) субклонування у плазмідний вектор.

Тип плазмідного вектора, який використовується тут, ні чим не обмежений і може бути вибраний з тих, що доступні на комерційній основі. Найкращим прикладом такого вектора може бути плазмідна pUC18.

Даний винахід відноситься до рекомбінантного експресуючого вектора, який характеризується вбудованою до гена-репортера повною або частковою послідовністю ДНК по SEQ ID NO:1 списку послідовностей. Зокрема, рекомбінантний експресуючий вектор конструюють таким чином, щоб розмістити 5'-

ділянку гена BMP-7 людини, подану у SEQ ID NO:1 списку послідовностей, перед геном-репортером. Ген-репортер, такий як ген люциферази або ген  $\beta$ -галактозидази, буде свідчити про експресію вихідного продукту даного гена. Тип вектора, який використовується для одержання рекомбінантного експресуючого вектора, нічим спеціально не обмежується, і може бути використаний комерційно доступний вектор. Як найкращий приклад даним винаходом використовується вектор на основі плазмиди pGL3. На основі pGL3 був сформований вектор pMSS115 (довжиною 9200 пар нуклеотидів), який є рекомбінантним експресуючим вектором, що включає промотор гена BMP-7 людини та люциферазний ген-репортер. У даному винаході він визначається як рекомбінантний експресуючий вектор. Необхідним є внесення цього вектора до клітини ссавця, переважно до клітин остеобластного типу людини, таких як клітини SaOS-2, з використанням ліпосом. Клітини тварини, трансфіковані рекомбінантним експресуючим вектором, відбирають з використанням маркерного гена резистентності.

Даний винахід відноситься до способу аналізу пов'язаної з кістковою тканиною речовини, який відрізняється використанням рекомбінантного експресуючого вектора, що відрізняється поєднанням повної або часткової ДНК, показаної у SEQ ID NO:1 списку послідовностей, з геном-репортером. Він відноситься до способу аналізу пов'язаної з кістковою тканиною речовини, причому такою пов'язаною з кістковою тканиною речовиною є речовина, що індукуює остеогенез, або такою пов'язаною з кістковою тканиною речовиною є речовина, яка приглушує остеогенез. Низькомолекулярна сполука, яка індукуює або приглушує експресію BMP-7 людини, може бути одержана шляхом виділення промотору, який контролює експресію гена, з'єднуючи його з відповідним репортерським геном і вносячи одержану генну структуру у відповідну клітину ссавця з метою формування аналізаторної системи. Речовина, яка регулює експресію гена BMP-7 людини у такій аналізаторній системі, впливає на даний промотор так, що це стає причиною підвищення або зниження рівня експресії гена-репортера. Таким чином, просте та нескладне визначення рівня активності репортера уможливорює тестування аналізованої речовини.

Клітина тварини, яка трансфікована згаданим вектором, може бути використана у способі тестування бібліотеки хімічних сполук шляхом вископродуктивного скринінгу (Nature, 1996, 384, suppl., 14-16) та аналізу активного компонента речовини природного походження. Та речовина, яка спричиняє зниження або посилення активності, виявляється під час дії її на клітину протягом відповідного періоду часу з подальшим визначенням рівня активності репортера. Одержана таким чином речовина може регулювати експресію шляхом прямого впливу на транскрипційний фактор або непрямо на промотор гена BMP-7 людини через вплив на елементи сигнальних шляхів. Отже, ці сполуки будуть ефективними як терапевтичні засоби проти захворювань кісткової і хрящової тканин, метастазів кісткових пухлин або гіперплазії кісток.

Крім того, ці сполуки можуть бути застосовані як терапевтичні засоби по відношенню до хвороб нирок.

Речовина, одержана відповідно до даного винаходу, має морфогенетичну активність по відношенню до кісткової і хрящової тканини та ефективна як агент для терапії і профілактики у області ортопедичної хірургії (переломи, остеоартрит, такий як остеоартроз суглобів і остеоартроз тазостегнового суглоба, епіфізарний остеомієліт, пошкодження хрящів, такі як пошкодження меніска, регенерація кісткової і хрящової тканини після пошкоджень і видалення пухлини, кісткова пластика, така як створення міжхребцевий анкілозів і розширення хребетного каналу, а також спадкові патології кісток і хряща, такі як дизостеогенез і ахондроплазія) або стоматології (кісткова пластика, така як закладення піднебінної щілини, реконструкція щелепних кісток та наротування залишкових альвеолярних виступів), а також при остеопорозі. До того ж, таку речовину за даним винаходом можна використовувати при пересаджуванні кісткової тканини у пластичній хірургії. Аналогічні шляхи застосування будуть ефективні і у разі ветеринарної хірургії. З іншого боку, даний винахід може представляти речовину, яка приглушує розвиток кісткової або хрящової тканини. У цьому випадку ця речовина застосовується як профілактичний або терапевтичний засіб при гіперплазії кістки і хряща.

Крім того, даний винахід може представляти речовину, що характеризується здатністю посилювати диференціацію ниркових клітин, завдяки чому вона може бути застосована як засіб лікування та профілактики захворювань нирок.

#### ПРИКЛАДИ

Даний винахід буде більш детально пояснено за допомогою прикладів, що наводяться далі. При цьому нижченаведені приклади є ілюстративними, а не обмежувальними.

##### Приклад 1

Виділення 5'-ділянки гена BMP-7 людини

Геномну ДНК клітин плаценти людини (Clontech) обробляли рестриктазами різного типу (BamHI, BglII, EcoRI, HindIII, PstI, Sad, Sail, SmaI, SphI і XbaI), розділяли методом електрофорезу у агарозному гелі, переносили на нейлонову мембрану та піддавали Саузерн-гібридизації з використанням кДНК гена BMP-7 (EMBO J., 1990, 9, 2085-2093) як зонду. У результаті було встановлено, що розщеплення рестриктазою HindIII посеред інших рестриктаз, які використовувалися, дозволило одержати ДНК-фрагмент довжиною приблизно 11 тисяч пар нуклеотидів, який включає найбільшу ділянку гена BMP-7 людини. Потім геномну ДНК клітин плаценти людини обробляли рестриктазою HindIII та розділяли методом електрофорезу у агарозному гелі з подальшим виділенням з гелю фрагмента ДНК довжиною приблизно 11 тисяч пар нуклеотидів. Одержаний фрагмент ДНК був клонований у  $\lambda$ -фаговий вектор  $\lambda$ DASH-II (Stratagene Ltd.), попередньо оброблений рестриктазою HindIII. Одержаний вектор *in vitro* упаковували з використанням Gigapack III XL Extract (Stratagene Ltd.), інфікували їм клітини *Escherichia coli* штаму XL-1 Blue MRA (Stratagene Ltd.) з формуванням у результаті геномної клонотеки. Цю клонотеку розділяли на пули. Кожний з пулів ампліфікували з допомогою ПЛР (Nucl. Acids Res., 1993, 21, 2627-2631), а саме застосовували метод ПЛР з затравками (SEQ ID NO:2 та SEQ ID NO:3 списку послідовностей), відповідними до сегменту, що транскрибується, з метою виділення пулу, з якого може бути виділена шукана 5'-послідовність гена BMP-7 людини. Крім того, 5'-розташований фрагмент довжиною 10,8 тисяч пар нуклеотидів субклонували до складу вектора pUC18 (надалий Amersham Pharmacia Biotech). Цей вектор позначили як *E.coli* pKOT314. Вектор *E.coli* pKOT314 внесли до колекції Національного інституту біології та технології людини Міністерства міжнародної торгівлі та промисловості Японії (1-3 Higashi

1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566) 30 березня 1998 року з отриманням депозитарного номера FERM P-16737 з подальшим внесенням 17 лютого 1999 року до міжнародного депозитарію під юрисдикцією Будапештської угоди (депозитарний №PERM BP-6651).

#### Приклад 2

Визначення нуклеотидної послідовності 5'-ділянки гена BMP-7 людини Нуклеотидна послідовність виділеної 5'-розташованої ділянки гена BMP-7 людини була встановлена за допомогою ДНК-секвенатора ALF (Amersham Pharmacia Biotech), дія якого заснована на методі Сейнджера (Sanger et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467). Визначена під час цього аналізу нуклеотидна послідовність показана у SEQ ID NO:1 списку послідовностей. Нуклеотиди 5557-10780 у послідовності SEQ ID NO:1 раніше вже були опубліковані (EMBO 1, 1990, 9, 2085-2093). Однак, існує-значне число - відмінностей від послідовності, яка наводиться даним винаходом.

#### Приклад 3

Конструювання рекомбінантного експресуючого вектора, який включає промотор гена BMP-7 людини та люциферазний ген-репортер

Як показано на Фіг.1, промотор гена BMP-7 людини розташований вище 1-го екзону. З урахуванням цього фрагмент довжиною 4400 пар нуклеотидів, який включає промотор від другого XbaI-сайта до третього XbaI-сайта, рахуючи від 5'-кінця відповідно до показаного на Фіг. 1, вносили по рестрикційному NheI-сайту вихідного вектора pGL (Promega Ltd.) так, щоб цей фрагмент розташовувався вище гена-репортера люциферази, з метою конструювання рекомбінантного експресуючого вектора pMSS115 (9200 пар нуклеотидів). Він показаний на Фіг.2.

#### Приклад 4

Вимірювання активності промотору гена BMP-7 людини (внесення рекомбінантного експресуючого вектора до клітини людини та експресія за непостійним типом) з метою експресії за непостійним типом рекомбінантного експресуючого вектора з промотором BMP-7 людини згаданий рекомбінантний експресуючий вектор (pMSS115) у рівних кількостях змішували з вектором pRL-SV40 (Promega Ltd.), який включає ген люциферази організму sea pansy, узятий як внутрішній контроль для визначення ефективності внесення гена. Потім до суміші, призначеної для додавання до остеосаркомних клітин людини ліній HOS, MG63 та SaOS-2, додавали катіонні ліпосоми - ліпоектамін (Lipotech Oriental Co.). Активність люциферази вогненної мурашки Solenopsis invicta та люциферази sea pansy вимірювали з використанням набору реактивів Pikka Gene Dual kit (Toyo Ink Co.). Одержані результати показані на Фіг.3. Рівень промоторної активності визначали відношенням активності люциферази вогненної мурашки та активності люциферази sea pansy. Виходячи з цих результатів зрозуміло, що ДНК по SEQ ID NO:1 списку послідовностей має промоторну активність.

#### Приклад 5

Внесення рекомбінантного експресуючого вектора до клітини людини та стабільна експресія

З метою стабільної експресії рекомбінантного експресуючого вектора, який включає BMP-7 людини, згаданий вектор змішували з вектором, який включає ген резистентності до пуроміцину, у співвідношенні 10:1, а також змішували з катіонними ліпосомами - ліпоектаміном (Lifetech Oriental Co.), які потім додавали до остеосаркомних клітин людини HOS з метою їх трансфікування. Клітини, до яких попав аналізований ген, відбирали з культурального середовища, яке містить пуроміцин (Sigma Ltd.).

#### Приклад 6

Скрінінг активної низькомолекулярної сполуки

Відібрані клітини вносили до лунки 96-луночного планшета, обробляли протягом 1-3 днів речовинами, які представляють різні бібліотеки хімічних сполук, обробляли цитолітичним агентом (Promega Ltd.) та вимірювали каталітичну активність з використанням набору реактивів для визначення люциферазної активності (Promega Ltd.). За допомогою даного підходу був виділений ряд речовин, які індукують або приглушають експресію BMP-7 людини.

Опис списку послідовностей

<210>1

<223> Нуклеотидна послідовність ділянок, розташованих у 5'-частині гена BMP-7 людини, які включають 1-й екзон.

<210>2

<223> Прямая ПЛР-затравка для клонування 5'-послідовності гена BMP-7 людини, яка відповідає до ділянки 1-го екзону.

<210>3

<223> Зворотна ПЛР-затравка для клонування 5'-послідовності гена BMP-7 людини, яка відповідає до ділянки 1-го екзону.

#### СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Hoechst Marion Roussel Ltd.

<120> Промотор гена BMP-7 людини і спосіб аналізу з його використанням речовини, пов'язаної з кістковою тканиною

<130> JN98K004 PCT SEQUENCES IN ENGLISH

<140>

<141>

<150> 10-120174

<151> 30 квітня 1998р.

<160>3

<170> Patentin, vers. 2.1

<210> 1

<211> 10877

<212> ДНК

<223> Нуклеотидна послідовність ділянок, розташованих у 5'-частині гена BMP-7 людини, які включають 1-

agccttggaac	atcagctagc	tgtgtctatc	atgcataact	ttattagtgt	ttgcatcata	60
tgtaaagatga	gtcacaactc	gttaatactc	ccatagatgc	ttttcacatg	agttggggact	120
aacctgttaa	atttagagta	atggttttaac	aatggggagg	gaataaagat	aaaactcgaa	180
gtaaaaggat	atacaataat	tttataatga	ggagaacaac	agtgagaagg	agcgagaga	240
gaagaaaaaca	acagatgagtg	aggaagaacg	gacgtggggg	gtggaggagt	tccagacagtg	300
ctgggagcga	ggagccacgt	ctaactccgt	attcactgtg	agactttggg	cccagcagtt	360
tctcttttgg	tgtcaatttt	tctactctca	agatgaagg	attgaaccac	gctttctcag	420
gacttttgtt	gttaactgact	ggaaactctg	tacacaaatg	cttaaaactg	acagctctgc	480
tgtgggtgtg	ctacagggat	actgtggctg	agggctctac	tgaatcgctg	agcttctctg	540
cttttcttgt	tttactgtct	tgtggtctct	ctcacagggc	aggctctccc	tgaaggagg	600
gaagatgaca	gccagcagca	gccctcgacc	tagcaacccc	agtgggagg	gagaccctt	660
tacgcgtagt	cttagcaaaa	gttctaaaa	tgaattctca	ctggcctcga	ttagtgaca	720
tgactgtcac	tgaaccatc	gcattggcat	ctctggttga	ccaggctggg	tcactgtccc	780
agcttgaatt	ttagagaaga	ggatagttca	acctgaacca	caggagactg	tgttagaaga	840
gggtcatttc	tactgagaaa	acagagagaa	acttgaaaa	ggcagcactg	cttctgctg	900
taatcccagc	actttgagag	gccaaagtat	atggtattgt	tgaggccggg	agttcaagac	960
gactctggcc	agcgtgggtg	aacctgtgtc	ctactaaaa	atacaaaaat	tagccagcca	1020
tggtggttga	cacctgtaat	tccagctact	cgggggctct	gaggaggagg	aattgtgtga	1080
aacccggggg	cagaggttat	agtgagtgca	gattgtggca	ctgcatctca	gaactgggtg	1140
cgaggggaga	ctcgtcttaa	aaaaaataag	aaaaaagaa	aaacacagag	aaattattgc	1200
agaagaagga	gaaaaggcag	gggtctcaaa	taggttgagc	ttccaaagt	ttttctctgg	1260
aacctctggg	cgagagaaaa	tgttagtgaa	agaaaacag	ccctggggac	ctgggccctc	1320
gctgggatca	ctgtataaca	ggcagggtgt	ccagctccgt	tgaactctg	gataaacaac	1380
gactaaattt	cacttagagt	atatataata	catatactcc	aatataatga	gatatagctg	1440
tactaaaatt	cattcatgtt	tattctgaaa	tctaagaatt	actggcaccc	tatttttttt	1500
tttgaaaaat	gtggtaaacc	tagtccctcc	ctcgtcttat	gtaaacaaa	agactctgtt	1560
ctgtttttct	tgctcgagca	tgtgtgaaaa	actccttgac	caaaagtatt	agcgtctcac	1620
aaaagagagg	gcctgtatct	tttatactga	catgatacga	atccgctctc	cagctcccca	1680
gtgcctgtac	cagcagggct	cttggctgca	ggcaacagaa	accagcttgg	cgagctgtgt	1740
gcggaaaagg	agaccactag	aggactctgg	gggtccacag	aacccctggg	aaggccagag	1800
aaaccaggctt	gggggctctc	tagttgggac	acggccccag	atcaactctc	agaatagtct	1860
gggcctgcac	tgatagtctt	tggggtgggt	gcctctgaat	ggctgaaact	tggctacctg	1920
tcaggctctg	gggctcaaa	cagctcagac	agtgctctc	tgatattat	ccagatgggg	1980
gactctccac	cataagagac	ggctcagcat	tagctgggag	ggggagactg	ctgaaaaaga	2040
ggagcaatga	acacactcat	ctgctcttgc	agatgaaatt	ctggtttttg	attttctctg	2100
ggagaggggg	agtttatcag	atcagtcacc	agggccaac	agcagagtgt	tgctgggaag	2160
ggactctggg	gaaggttagt	gtcagatbtt	gcctaaaggg	gcagacagtt	ccagctcttt	2220
caaccactgg	ctcagtagcc	ctcgaaatcat	gaattcaagt	gagctgtctt	gaaatgcacc	2280
atccttttgt	gtccttttgt	tbgggtagtg	ggtttggggg	ggctggggac	atcctccaga	2340
cacacagaga	ctctctttag	ggccaggggc	aaaccagatt	ctacgaattc	ctgaggtaga	2400
tgtgtctctt	tgtgtcta	aaacaaaacg	agttgaatta	gttgccaaca	gataaacatt	2460
gagagatgtc	acattcaaac	tcaagtttct	agcttctttg	gaaaatcaga	actttcttgt	2520
gatgttgaaa	tcaattattt	gatgggcata	accatggg	atgtgtttt	cagttcaacc	2580
cagctctcag	ctctcttatt	tatccaggcc	agtgctctct	gccactctgc	accatgtctg	2640
ctctctagat	gtctctcat	taattaaaga	gaaagagaaa	tattctctga	gtctctat	2700

ccagaagaca ggcgctatca gtcccccat ttacagatg ggggaactga ggtgtagaga 5040  
ggttaagtcc cttgcccatg gtgcacagct ggaagagaca gagctggagt gtgaatgcgg 5100  
ctgggcaggc tccagtgcc aggcctacctc ctccacacaa gacttgccct cggcaatctc 5160  
aaagcctttt ctggtggtgg gctcagctcc caaactggca tcggatgcac tcccagccag 5220  
atatttcttg ctggccggtt ttcatctatt cattcattca ttcatctatt cattcattcg 5280  
gcattcactg agggccctgt gcagtccttg gtagtcctct cggggaggaa acagggaaaa 5340  
gaaagacccc cccaccaagc atggatcaca gaaaagataa ggctaaatgg gggtttgttg 5400  
gacttcagag gaaaccttat ctcttgaggt ctggatatg aagagcatgt tgtctctcc 5460  
tcttcgatga gaaaagatgg cgtctcagag gaagggttgc tgggttgagg gatctggag 5520  
atgccttagc ttggccgctg cacagtcagc ctcagtcac ccggtctctt taggttttgg 5580  
ctgtgcttat tactattcat tcaacaggta ctaattgagc acctgctgtg tggcaggctc 5640  
agaataggct caggtgagat gcacaaagaa gggtaaacta gaatccttgc ttagacactg 5700  
acggatcagt tgtttcatat gtaaatgtga gcaccaagac ctgctgcccc tgcgccagc 5760  
ctcacctgct tgtgaagatc cctccaaaag atttgagagt agataaaaag cagagactac 5820  
tactgaagaa cagggtgctt ttggtcctt attatttcag actttggaag aaaatgacct 5880  
cctttttctc tactggcact ggagggtggca tagctgtccc tagcaagcca gcgctggagg 5940  
gcgtgtgcag ggctggggag cagacctgtt ttctgttccc tgcctctcag gctcaagcac 6000  
ttgctgttcc tccacctggg atgcctttcc ctggaaaagc ctgtctcttt ctgtctttc 6060  
aggactcagg tcagtggaat ctcctccaaa aactcccttt cccacctctc atcacctcac 6120  
cctgtttatc tgcgccccc ccccaactgc ctgtcactta ttgcaggctg aagtgaacca 6180  
ggctctccag ttgtacactc tcagatggag cctggagcac tgtggcactc ctgcaatttc 6240  
cccagtcctc ctggggtagg attcctgctt gccaggatgc ccacctttcc ttctccctcc 6300  
tgcatgtctt cctctgcctg gcttctgaat tgttcccaga gagagtata gacaagatct 6360  
gcctctcctt cagtcctga atcttattta aggcctcttc tttgcttccc tggcctggag 6420  
gcggtctctt gatggagtct gccatgtggg ttctctcatg gccatgtctt cctgccagc 6480  
atggtgcttg gccctgggac tggccacata atatctgggc cagggtgcaaa attagtacgg 6540  
ggcagggggg actttgttca taggtgattc agaaccacat atggtgacct cagagttaga 6600  
aaccagtggt ggggccctta agagctgggg ggccctgtac gactgtccag gttgcaggcc 6660  
ccacagctcg cctcctgata tctgtgtctc catgtctgtc tgttgaagga aggagtgaat 6720  
ggatgaagag cagggtgttg ggtgtgtttg agggccttgc tgggtgggtg gtagaggccc 6780  
ctccctggca tggggctcaa gacctgttcc atccacagc ctggggcctg tgtgtaaatg 6840  
gccaggacct gcaggctggc atttttctgc tcttgcctg cctctggcct cccctttctc 6900  
caccatgtg gccctcagg ttccatcta gtccaaaagt ccccaaggga gaccagagg 6960  
gccacttgcc caaactactt ctgctccaga aaactgtaga agaccataat tctcttcccc 7020  
agctctctg ctccaggag gacagcccca aagtgaggct tagccagagc cctctccaga 7080  
caagcgcccc cgcttcccca acctcagccc ttccagttc atcccaagg cctctctggg 7140  
acccactctc taccacagcc ccaggagggg aaggagacag gatgaacttt taccctgctg 7200  
cctctactgc cactctgggt gcagtaattc ccttgagatc ccacccggc agaggggaccg 7260

gtgggttctg agtggctctg ggactccctg tgacagcgtg catggctcgg tattgattga 732(  
 gggatgaatg gatgaggaga gacaggagag gaggccgatg gggaggtctc aggcacagac 738(  
 ccttggaggg gaagaggatg tgaagaccag cggctggctc cccaggcact gccacagaga 744(  
 gggctgatgg gaagccctag tggtagggct ggggtgtctg gtctcaggct gaggggtggc 750(  
 tggaaagata caggggcccg aagaggagga ggtgggaaag acccccacag ctcaacagca 756(  
 gttoacttat tcaactcaaca aatcgtgact gcgcacgtac agtggctacc aggcgctggg 762(  
 ttcaaggcac tgcgggtacc agaggtgcgg agaagatcgc tgatccgggc cccagtgcct 768(  
 tgggtgtcta gcgggggtaa gaaggcaata aagaaggcac ggagtaactc aaacagcaat 774(  
 tccagacagc aagaâaact acaggaaaga aaacaaactg gcgagggggc aggcgaggaa 780(  
 acaacctcag cttggcaggt cttggaggtc tctgggagga gaaagcagcg tctgatgggg 786(  
 gcgggaggtg gtgagtgggg agaggtccag gcgaggggaa tggcgagcgc agagacagcg 792(  
 tggcaacggc ttcaggaggg cgcgaggggg tcagcgtggc tggcttaaaa ggatacatgg 798(  
 gactgagggg caagaccggc tcaagggtca cgccttcacg gaagccttct atttcgcgc 804(  
 caacctcggc gctcccccaa cttttccac cgggttcgcg agccaccccg tctgtctcgg 810(  
 gccgccttcc tggtcgggac cgcgagtgcg gagaggcgag ggcgggtccc gattcctcca 816(  
 gcgcgactcc cgcgactccc gcgcaggctc taggcacccc gtgggcactc agtaaacatt 822(  
 tgtcgagcgc tctagaggga atgaatgaac cactgggca cagctggggg gagggcgggg 828(  
 cgaaggcgag gtgggagggc gccggcgcgg gagggggccc tcgaagcccg tctcctcctc 834(  
 cctcctcctc cgcacaggcc ccagcgcgta ccaactctgg gctcccgagg cggcctcttg 840(  
 tgcgatccag ggcgcacaag gctgggagag cgcgccgggg cccctgctat ccgcgccgga 846(  
 gttggaagag ggtgggttgc gcgcggccga gggcgagagc gccagaggag cgggaagaag 852(  
 gagcgtctgc ccgcgccgct gcctcctcgc tgcctccccc gcttggctc tctggaatcc 858(  
 taggcttgct ggctgtctct cccaaccggc cccgctcctc cactcgccct ttcgttcgcc 864(  
 ggggtgcttt tccaagccct gcggtgcgcc cggcgagagt cggggcgagg ggcggggggc 870(  
 cagcaccgag cagggggcgg gggtcggggc agagcgcggc cgcggcgagg ggggcatgt 876(  
 ctggcgcggg cgacaggggg cccgtctgca gcaagtgaac gacggccggg acggcgccct 882(  
 gccccctctg ccaacctggg cggtagcggg ccggagccgc gagcccggtt agcgcgtaga 888(  
 gcggggcgga tgcacgtgcg ctoactgcga gctgcggcgc cgacacagctt cgtggcgctc 894(  
 tgggcacccc tgttctgct gcgctccgccc ctggccgact tcagcctgga caacgaggtg 900(  
 cactcgagct tcatccaccg gcgcctccgc agccaggagc ggcgggagat gcagcgcgag 906(  
 atcctctcca ttttgggtt gccccaaccg ccgcgcccgcc acctccaggg caagcacaac 912(  
 tcggcaccca tgttatgct ggaacctgtac aacgccatgg cgttgaggga gggcgggcgg 918(  
 ccggggcgcc agggcttctc ctacccctac aaggccgtct tcagtacca gggcccccct 924(  
 ctggcgcgcc tgaagatag ccatctctc accgacgcgc acatggtcat gagcttctgc 930(  
 aacctcgggt agtaagggca ggcgagggta gcgctctcct ttcgggggca ctttgagact 936(  
 gggagggagg gagccgctt tctatgcaag ccgcgccagc tttccgctcc tggctgaat 942(  
 cgcagtgcct gcccgagggt ctcaccacca cagccctatg actcccaagc tgtgtgcgcc 948(  
 ccaggtcgg gcgcgctggg ttccgtgagc ctgtaggggg tactgggaag gagggatcct 954(  
 cgaagatccc ctccatgtta cgcgcggggc cgcatctctg gggctggagg caaggggcgt 960(  
 tcaaaagcgc gggctcggtc atgtgagctg tccggggccc gcgcggctcg cgtaacctgg 966(  
 atgtaaagg cccttcccg cgaggctgccc ttgcgcctt tctggggccc ctctcagccc 972(  
 tgcctggccc tggcatcgcg gcgctgcac ccccttacc cctctgtcaa gccctacctg 978(  
 tccctcgtg gtgcgcccgc cttagcgta cgcgcgctcc gagcgttgg ggcctctctc 984(  
 cggggcgccg gatgcccct tctctcttgg ctggagctgg ggaagaaacg gtgcattgc 990(  
 taatttctct tgttttcttt ctttgttat ttttttctt ttttctttt ttttctttt 996(  
 ttttctttt ttttttttt ttttttgaga cggagttcac tctgtcgc cagtctggag 1002(  
 tgcaatggcg cgaatctctg tcacgcacac ctctgcctcc cgggttcaag cgaattctgt 1008(  
 gctcagcct cccgagtgcg tgggattaca gcatgcgcca ccatgctgg ctaattttgt 1014(  
 atttttagta gagacagggt ttctccatgt taggcaggct ggtctcgaac tcccgatctc 1020(  
 aggtgatcct ccgcctccag cctcccaag tgggtgctgg attacaggcg tgagccactg 1026(  
 tgccctgcgc ctagtctctc attttaagta tttagtggtg ggtccggggc cggcagaatc 1032(  
 taatttcagc atttaccagc tgtggcgccg aaaccacagg ttttgccgat tgggttcgcg 1038(  
 gggatctcag actgacgcgc gggggcggtc ggggttccc gtttccgact ggagcccgga 1044(  
 cgaccccgcc gacgcagacc tggggctgca gcgagggccc gggagctccc cctccatagt 1050(  
 tgcgggcata ttctccagac ttgctcaaac taacccccgc cggcgccagc gcgctgcggg 1056(  
 actgatgac aaatatgttg ttcccgagat aacacacccc gatagcgctg tttctgagc 1062(  
 cgttttcatt ctacttgtgt aacttgctgc gaaaacccga accaagtcaa gacagcaaac 1068(  
 tcaacccacg ggcgctgtgt caacatggaa ataagtatac tgaagcccca cgtggggcac 1074(  
 ctggggcgct gactgggggc gcggggggaag cgcagatccg cttcatgtct tccccctcc 1080(  
 tgataaggtc cctggagttc ccggggaggc attgtctgta ctttaataata actaaatcca 1086(  
 actagtgaac caagctt 10877

<210> 2

<211> 30

<212> ДНК

<213> людина

<220>

<221> властивість

<222> (1)...(30)

<223> Пряма ПЛР-затравка для клонування 5'-послідовності гена ВМР-7 людини, яка відповідає ділянці 1-го екзону

<400> 2

gggcgagcgg gggcccgctc gcagcaagtg

30

<210> 3

<211> 30  
<212> ДНК  
<213> людина  
<220>  
<221> властивість  
<222> комплемент (1).....(30)  
<223> Зворотна ПЛР-затравка для клонування 5'-послідовності гена BMP-7 людини, яка відповідає ділянці  
1-го екзону  
<400> 3  
agaggatctc gcgctgcac cccgcgcgt