

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043850**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.06.29

(51) Int. Cl. *C12N 15/86* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
201892006

(22) Дата подачи заявки
2017.03.07

**(54) ААV-ОПОСРЕДОВАННАЯ ЭКСПРЕССИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
СИНТЕТИЧЕСКОГО ПРОМОТОРА И ЭНХАНСЕРА**

(31) 62/304,656

(32) 2016.03.07

(33) US

(43) 2019.04.30

(86) PCT/US2017/021124

(87) WO 2017/155973 2017.09.14

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЮНИВЕРСИТИ ОФ АЙОВА
РИСЕРЧ ФАУНДЕЙШН (US)**

(72) Изобретатель:
Энгельхард Джон Ф., Янь Цзыин (US)

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

(56) WO-A1-2014168953

ZIYING YAN ET AL.: "Optimization of Recombinant Adeno-Associated Virus-Mediated Expression for Large Transgenes, Using a Synthetic Promoter and Tandem Array Enhancers", HUMAN GENE THERAPY, vol. 26, no. 6, 1 June 2015 (2015-06-01), pages 334-346, XP55308423, US ISSN: 1043-0342, DOI: 10.1089/hum.2015.001, the whole document

M. R. SCHLABACH ET AL.: "Synthetic design of strong promoters", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 107, no. 6, 9 February 2010 (2010-02-09), pages 2538-2543, XP55064057, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.0914803107 figure 3

(57) Изобретение относится к выделенному рекомбинантному парвовирусному вектору, который содержит синтетический энхансер, содержащий множество энхансерных последовательностей, функционально связанный с промотором, и к способам применения этого вектора.

B1

043850

**043850
B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По изобретению испрашивается приоритет по дате подачи заявки США с серийным № 62/304,656, поданной 7 марта 2016 года, раскрытие которой включено в настоящее описание посредством ссылки

Положение о правах правительства

Изобретение осуществлено с правительственной поддержкой по гранту HL108902, выделенному в National Institutes of Health. Правительство имеет определенные права на изобретение.

Предпосылки

Кистозный фиброз (CF) представляет собой летальное аутосомно-рецессивное нарушение, которое поражает по меньшей мере 30000 человек только в США (O'Sullivan et al., 2009). Генетической основой CF является мутация одного гена, который кодирует регулятор трансмембранной проводимости при кистозном фиброзе (CFTR) (Riordan et al., 1989; Rommens et al., 1989). Она ведет к дефектному белку CFTR и вытекающим аномалиям в транспорт электролитов и текучих веществ во многих органах (Welsh, 1990; Rowe et al., 2005). Наиболее опасным для жизни исходом является CF заболевание легких, которое отличается вязким слизистым секретом и хроническими бактериальными инфекциями (Welsh, 1990). Вместе с усовершенствованием ухода за пациентом и успехами в фармакологической терапии для CF, продолжительность жизни пациентов с CF постоянно увеличивается в течение последних десятилетий; однако качество жизни пациентов с CF остается низким, а лекарственные средства, которые облегчают легочные осложнения, являются дорогостоящими и эффективны только у отдельных пациентов. Поскольку заболевание легких является основной причиной смертности у пациентов с CF, а генетической основой является моногенный дефект, генная терапия для CF заболевания легких имеет потенциал к излечению всех пациентов с CF, независимо от их мутации в CFTR. Таким образом, клинические исследования по CF легочной генной терапии начаты в середине 1990-х. Однако все исследования до настоящего времени были безуспешными (Sumner-Jones et al., 2010). Причина, лежащая в основе этого, состоит в том, что векторы, доступные для переноса генов в эпителий дыхательных путей человека (HAE), не эффективны (Mueller & Flute, 2008; Griesenbach & Alton, 2009; Griesenbach et al., 2010).

Аденоассоциированный вирус (AAV), член семейства парвовирусов человека, является непатогенным вирусом, репликация которого зависит от вирусов-помощников. По этой причине, гAAV векторы относятся к наиболее часто используемым в доклинических исследованиях и клинических исследованиях генной терапии (Carter, 2005; Wu et al., 2006; Daya & Berns, 2008). В действительности, клинические исследования CF заболевания легких с использованием гAAV2 продемонстрировали хороший профиль безопасности и длительную персистенцию вирусного генома в ткани дыхательных путей (как оценивали с помощью биопсии) относительно других средств переноса генов (таких как рекомбинантный аденовирус). Тем не менее, перенос генов не позволял усовершенствовать функцию легких у пациентов с CF, поскольку не обнаруживали транскрипцию мРНК CFTR, извлекаемой из гAAV вектора (Flotte, 2001; Aitken et al., 2001; Wagner et al., 2002; Moss et al., 2007; Duan et al., 2000). Эти наблюдения соответствуют последним исследованиям гAAV трансдукции с использованием модели поляризованного HAE in vitro, в которой клетки выращивают на границе раздела воздух-жидкость (ALI) (Flotte, 2001; Duan et al., 1998). Низкая эффективность гAAV2 в качестве вектора для экспрессии CFTR в HAE главным образом обусловлена двумя основными препятствиями: 1) неэффективный процессинг вируса после проникновения и 2) ограниченная упаковывающая способность гAAV.

Начальные доклинические исследования с использованием гAAV2-CFTR, которые подкрепляли первые клинические исследования у пациентов с CF, осуществляли у макаков-резусов. Эти исследования демонстрировали, что вирусная ДНК и происходящая из трансгена мРНК CFTR персистировали в легких в течение длительных периодов после гAAV2-опосредованного переноса генов CFTR (Conrad et al., 1996). Однако более поздние исследования по сравнению эффективности гAAV2 трансдукции между ALI-культурами эпителия дыхательных путей человека и макака-резуса показывали, что тропизм гAAV2 к апикальной трансдукции значительно выше в культурах макаков-резусов, чем в их человеческих аналогах (Liu et al., 2007), вероятно, из-за видоспецифических различий в рецепторах и корецепторах AAV2, которые существуют на апикальной поверхности. В исследованиях поляризованного HAE, большинство вирионов AAV2 проходили интернализацию после апикальной инфекции, но накапливались в цитоплазме вместо того, чтобы проходить в ядро (Duan et al., 2000; Ding et al., 2005). Одной помехой для внутриклеточной направленной миграции, необходимой для плодотворной вирусной трансдукции, является убиквитин-протеасомный путь (Duan et al., 2000; Yan et al., 2002); временное ингибирование активности протеасом значительно усиливает трансдукцию (в 700 раз) гAAV2-люциферазных векторов с апикальной поверхности за счет содействия транслокации вектора в ядро (Yan et al., 2006). Однако применение ингибиторов протеасом для увеличения эффективности трансдукции гAAV-CFTR векторов только немного усовершенствует экспрессию CFTR, наиболее вероятно из-за низкой активности короткого промотора, используемого в гAAV-CFTR векторах (Zhang et al., 2004). Открытая рамка считывания (ORF) гена CFTR составляет 4,443 т. о., и таким образом приближается к размеру генома AAV в 4,679 т. о. Несмотря на то, что капсид AAV может вмещать содержимое, превышающее его нативный ДНК геном, его максимальная упаковывающая способность составляет приблизительно 5,0 т. о. (Dong et al., 1996), и экспрессия трансгена из векторов, превышающих этот предел, ведет к значительно сниженной функции (Wu et al., 1993).

С учетом необходимости цис-элементов в 300 п. о. из генома AAV (две последовательности ITR на концах) и кодирующей последовательности CFTR в 4443 п. о., в векторном геноме остается немного места (257 п. о.) для сильного промотора и сигнала полиаденилирования. Таким образом, гAAV-CFTR вектор первого поколения (AV2.tgCF), который тестировали в клинических исследованиях, основан на активности криптического промотора из AAV2 ITR для управления транскрипцией кДНК полноразмерного CFTR с синтетическим сигналом полиаденилирования (Flotte et al., 1993; Aitken et al., 2003).

Не так давно разработан гAAV вектор AV2.tg83-CFTR, в котором используется синтетический промотор в 83 п. о. (tg83) (Zhang et al., 2004) для усовершенствования экспрессии кДНК полноразмерного CFTR человека. Размер генома этого вектора составляет 4,95 т. о. Несмотря на то, что этого вектор давал 3-кратное увеличение цАМФ-опосредованных Cl⁻ токов в CF НАЕ ALI-культурах относительно AV2.tgCF, этот уровень экспрессии оставался субоптимальным для применения в генной терапии CF. Другие группы пытались использовать миниген CFTR для того, чтобы создавать пространство для встраивания более хорошего промотора в гAAV векторы; это выглядело обоснованным, исходя из более ранних исследований функции и структуры гена CFTR, которые показывают, что делеция коротких не-существенных последовательностей с C-конца и регуляторного домена (R-домена) оказывала только минимальные эффекты на функцию хлорных каналов в CFTR (Zhang et al., 1998). Один широко используемый миниген CFTR представляет собой CFTRΔR, который утратил 156 п. о., кодирующих 52 аминокислотных остатка (708-759) на N-конце R-домена. Перенос генов с использованием рекомбинантного аденовирусного вектора, кодирующего CFTRΔR, в CF НАЕ ALI-культуры показывал, что этот трансген сохраняет по меньшей мере 80% трансэпителиального транспорта Cl⁻, обеспечиваемого полноразмерным CFTR (Ostedgaard et al., 2002). Кроме того, экспрессия CFTRΔR у мышей с нокаутом CFTR^{-/-}, спасала летальный кишечный фенотип (Ostedgaard et al., 2011). Эта делеция 156 п. о. позволяла упаковывать гAAV CFTR экспрессирующий вектор длиной 4,94 т. о., с экспрессией, управляемой минимальным промотором CMV (173 п. о.), в капсид AAV5 (Ostedgaard et al., 2005). Дополнительные усилия были направлены на разработку вариантов AAV векторов с более высоким апикальным тропизмом через направленную эволюцию капсида AAV в поляризованных НАЕ ALI-культурах (Li et al., 2009). Однако эти гAAV векторы не обеспечивали эффективной экспрессии CFTR, поскольку минимальный промотор CMV не функционировал хорошо в полностью дифференцированном эпителии дыхательных путей.

Сущность изобретения

Чтобы обойти ограничение размера промотора в рекомбинантном аденоассоциированном вирусном (гAAV) векторе, который можно использовать для того, чтобы экспрессировать определенные трансгены, осуществляли скрининг набора из 100-членных синтетических энхансерных элементов, состоящих из десяти повторов по 10 п. о., на способность увеличивать экспрессию трансгена CFTR с короткого синтетического промотора в 83 п. о. в контексте гAAV вектора для применения в генной терапии кистозного фиброза (CF). Скрининг эффективности синтетических энхансеров для усиления экспрессии трансгена проводили ступенчато в плазидах без AAV последовательностей, провирусных векторах в форме плазмид с последовательностями AAV и гAAV векторах. Оценивали плазмидную трансфекцию и трансдукцию вирусным вектором в культивируемых клеточных линиях и у целых животных *in vivo*. Начальные исследования по оценке транскрипционной активности в монослойных (не поляризованных) культурах клеточных линий дыхательных путей человека и первичных клетках дыхательных путей хорька обнаруживали, что три из этих синтетических энхансеров (F1, F5 и F10) значительно содействовали транскрипции трансгена люциферазы в контексте плазмидной трансфекции. Дополнительный анализ в поляризованных культурах эпителия дыхательных путей человека и хорька на границе раздела воздух-жидкость (ALI), а также в дыхательных путях хорька *in vivo*, демонстрировал, что энхансер F5 давал наивысший уровень экспрессии трансгена в контексте AAV вектора. Кроме того, демонстрировали, что увеличение размера вирусного генома от 4,94 до 5,04 т. о. не оказывает значительного влияния на выход частиц векторов, но значительно снижает функциональность гAAV-CFTR векторов из-за небольших концевых делеций, которые простирались в экспрессирующую CFTR кассету слишком большого генома в 5,04 т. о. Поскольку гAAV-CFTR векторы размером больше 5 т. о. имеют значительно ослабленный векторный эффект, укороченный миниген CFTR хорька с делецией 159 п. о. в R-домене использовали для конструирования гAAV вектора (AV2/2.F5tg83-fCFTRΔR). Этот вектор давал приблизительно 17-кратное увеличение экспрессии CFTR и значительно усовершенствовал Cl⁻ токи в CF ALI-культурах. Эта комбинация небольшого энхансера/промотора может иметь обширную полезность для гAAV-опосредованной генной терапии, например, генной терапии CF, в дыхательных путях.

Раскрытие относится к рекомбинантному вектору, такому как парвовирусный вектор, например, рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (гAAV) вектор или бокавирусный (BoV) вектор, такой как BoV человека, который содержит синтетический энхансер, имеющий множество синтетических энхансерных последовательностей, функционально связанных с промотором, например, синтетическим промотором. В одном из вариантов осуществления каждый из множества энхансеров имеет одну и ту же последовательность. В одном из вариантов осуществления по меньшей мере 2 из множества энхансеров имеют отличающуюся последовательность. В одном из вариантов осуществления синтетический энхан-

сер формируют из различных энхансерных последовательностей, где каждая уникальная последовательность может быть представлена один раз или больше чем один раз, и если больше чем один раз, может быть в тандеме или чередоваться с другими (отличающимися) энхансерными последовательностями. Например, синтетический энхансер может иметь пять различных энхансерных последовательностей, каждая представлена два раза в синтетическом энхансере, и повторные последовательности могут быть в тандеме (или нет). В одном из вариантов осуществления по меньшей мере одна из энхансерных последовательностей имеет сайт связывания TP53. В одном из вариантов осуществления по меньшей мере одна из энхансерных последовательностей имеет сайт связывания CREB. В одном из вариантов осуществления по меньшей мере одна из энхансерных последовательностей имеет сайт связывания NRF-1 (CATGCGCAG). В одном из вариантов осуществления множество имеет комбинацию из одного или нескольких сайтов связывания TP53, одного или нескольких сайтов связывания NRF-1 и/или одного или нескольких сайтов связывания CREB, например, CREB7. В одном из вариантов осуществления энхансерная последовательность имеет сайт связывания, представленный на одной из фиг. 8А-8С. В одном из вариантов осуществления множество имеет от 2 вплоть до 20 различных синтетических энхансерных последовательностей. В одном из вариантов осуществления по меньшей мере одна из энхансерных последовательностей имеет не больше чем 15 п. о. В одном из вариантов осуществления множество составляет приблизительно до 150 нуклеотидов в длину, например, приблизительно 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130 или 140 нуклеотидов в длину. В одном из вариантов осуществления синтетический энхансер содержит F1, F5 или F10. В одном из вариантов осуществления энхансер имеет по меньшей мере 80, 85, 90, 92, 95, 98 или 99% идентичности нуклеотидных последовательностей с F1, F5 или F10. В одном из вариантов осуществления связанный промотор представляет собой синтетический промотор. В одном из вариантов осуществления промотор представляет собой tg83. В одном из вариантов осуществления промотор представляет собой промотор AAV. В одном из вариантов осуществления промотор представляет собой гетерологичный промотор, например, из генома другого вируса или млекопитающего. В одном из вариантов осуществления промотор функционально связан с открытой рамкой считывания, например, гетерологичной открытой рамкой считывания. В одном из вариантов осуществления открытая рамка считывания кодирует продукт профилактического или терапевтического гена, например, регулятор трансмембранной проводимости при кистозном фиброзе, α -антитрипсин, β -глобин, γ -глобин, тирозингидроксилазу, глюкоцеребозидазу, арилсульфатазу А, фактор VIII, дистрофии или эритропоэтин. В одном из вариантов осуществления комбинация множества энхансерных последовательностей и промотора составляет не больше чем 300 нуклеотидов в длину, например, не больше чем 125, 150, 175, 200, 250 или 275 нуклеотидов в длину. В одном из вариантов осуществления комбинация множества энхансерных последовательностей и промотора составляет меньше чем 500 нуклеотидов в длину. В одном из вариантов осуществления вектор представляет собой парвовирусный вектор, такой как gAAV вектор, например, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 или AAV9 вектор, или бокавирусный вектор человека, например, HBoV1, HBoV2, HBoV3 или HBoV4, или эволюционировавший вектор AAV или HBoV, который адаптирует уникальный тропизм, например, необязательно с использованием слегка измененных капсидных последовательностей от известных серотипов.

Настоящее описание также относится к подходу к ступенчатому скринингу комбинаций тканеспецифических, а также повсеместных синтетических промоторов/энхансеров, в плазидах, провирусных векторах и gAAV векторах, которые можно использовать при применении gAAV генной терапии к доставке кассеты большого трансгена. Примеры использования включают, но не ограничиваясь этим, экспрессию фактора VIII 4,3 т. о. с удаленным В-доменом в мышцах и/или печени при гемофилии А или доставку инструмента редактирования генов 4,2 т. о. из *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) и химерной sgRNA вместе в любую желаемую ткань и орган *in vivo*.

Кроме того, изобретение относится к способам применения рекомбинантного парвовирусного вектора для того, чтобы инфицировать клетки, например, клетки млекопитающих, такие как клетки хорька, собаки, кошки, коровы, лошади, козы или свиньи или клетки примата, например, клетки человека, например, вводя композицию, содержащую рекомбинантный парвовирусный вектор, млекопитающему. Например, геном рекомбинантного парвовируса может содержать экспрессирующую кассету, кодирующую гетерологичный продукт гена, например, который представляет собой терапевтический белок, такой как регулятор трансмембранной проводимости при кистозном фиброзе, α -антитрипсин, β -глобин, γ -глобин, тирозингидроксилаза, глюкоцеребозидазу, арилсульфатазу А, фактор VIII, дистрофии, эритропоэтин, α 1-антитрипсин, поверхностно-активный белок SP-D, SP-A или SP-C, эритропоэтин или цитокин, например, IFN- α , IFN γ , TNF, IL-1, IL-17 или IL-6, или профилактический белок, который является антигеном, таким как вирусный, бактериальный, опухолевый или грибковый антиген, или нейтрализующее антитело или его фрагмент, которые направлены на эпитоп антигена, такой как тот, что из респираторного вируса человека, например, вируса гриппа или RSV, включая в качестве неограничивающих примеров белок HBoV, белок вируса гриппа, белок RSV или белок SARS.

Краткое описание фигур

Фиг. 1А-1D. Эффективность синтетических олигонуклеотидных энхансеров в увеличении активно-

сти tg83-управляемых люциферазных репортерных плазмид в монослойных культурах. А) Схематическая структура репортерных векторов, используемых для скрининга библиотеки энхансеров. Показаны транскрипционные мотивы синтетического промотора tg83. (B-D) Репортерная активность в монослойных культурах клеточных линий дыхательных путей человека: (B) A549 и (C) IB3 и (D) первичные клетки дыхательных путей хорька после трансфекции указанными плазмидами. Люциферазный анализ проводили через 24 ч после трансфекции. Данные представляют среднюю (\pm SEM, N=3) относительную люциферазную активность для каждой трансфекции, нормализованную по таковой у безэнхансерного вектора pGL3-tg83luc, значение для которого в клетках каждого тестируемого типа принимали равным 1.

Фиг. 2А-2F. Эффективность энхансеров F1, F5 и F10 в увеличении активности промотора tg83 в контексте провирусных плазмид и gAAV. А) Эффект AAV2 ITR, оказываемый на транскрипцию с промотора tg83, как оценивали после трансфекции A549 и первичных клеток дыхательных путей хорька с использованием pGL3-tg83 или pAV2-tg83luc. Данные представляют среднюю (\pm SEM, N=3) относительную люциферазную активность (RLU) через 24 ч после трансфекции. В) Эффективность энхансеров при транскрипции после трансфекции A549 и первичных клеток дыхательных путей хорька указанными AAV2 провирусными плазмидами. Данные представляют среднюю (\pm SEM, N=3) относительную люциферазную активность для каждой трансфекции, нормализованную по безэнхансерному вектору pAV2-tg83luc (взятому за 1 для каждого типа клеток), через 24 ч после трансфекции. С) Эффективность энхансеров при транскрипции после инфекции клеток A549 указанными gAAV2 векторами через 24 ч после инфекции. Данные представляют среднюю (\pm SEM, N=3) относительную люциферазную активность для каждой инфекции, нормализованную по безэнхансерному вектору pAV2-tg83luc (взятому за 1). (D и E) Эффективность энхансеров при транскрипции после базолатеральной инфекции поляризованного эпителия дыхательных путей (D) человека и (E) хорька, который инфицировали с использованием 2×10^{10} DRP указанных gAAV2 векторов. Данные представляют среднюю (\pm SEM, N=4) относительную люциферазную активность (RLU) для каждого условия через 2 суток после инфекции. (F) Эффективность энхансеров при транскрипции в ткани легких и трахеи после инфекции детенышей хорька в возрасте 5 суток с использованием 2×10^{11} DRP AV2/1.F5tg83luc или AV2/1.F10tg83luc, в присутствии ингибиторов протеасом. Люциферазную активность измеряли на 8 сутки после инфекции. Данные представляют среднюю (\pm SEM, N=4) относительную люциферазную активность (RLU/мкг белка).

Фиг. 3А-3С. Влияние размера конструкции gAAV-CFTR на восстановление хлорных токов CFTR в поляризованном CF эпителии дыхательных путей. А) Схематическая иллюстрация структур gAAV2 векторов различных размеров, которые кодируют открытую рамку считывания (ORF) полноразмерного CFTR хорька и варианты с удаленным R-доменом, под управлением одних и тех же транскрипционных элементов: синтетический промотор 83 п. о. (tg83), синтетический сигнал полиаденилирования 62 п. о. (pA), 5'-нетранслируемая область 17 п. о. (UTR) и 3' UTR 9 п. о. ORF полноразмерного CFTR хорька (fCFTR) составляет 4455 п. о. Метку 3×HA 99 п. о. вставляли между аминокислотными остатками S900 и I901, доводя fCFTR(HA) до 4554 п. о. fCFTR Δ R имеет укороченную ORF (4296 п. о.); из R-домена удаляли 53 аминокислотных остатка (I708-I760, 159 п. о.). fCFTR Δ R(HA) имеет длину 4395 п. о., при наличии инсерции HA-метки 99 п. о. и делеции 159 п. о. в R-домене. Функциональности этих векторов в отношении восстановления CFTR-специфичного транспорта Cl⁻ (отражаемого в трансэпителиальных токах короткого замыкания (Isc)) сравнивали в дифференцированных CF HAE ALI-культурах, после инфекции с использованием 10^{11} DRP на вставку Millicell (MOI приблизительно 10^5 DRP/клетка) в присутствии ингибиторов протеасом LLnL (10 мкМ) и доксорубина (2 мкМ). CF HAE ALI-культуры создавали из условно трансформированной клеточной линии дыхательных путей человека с CF (CuFi8; генотип Δ F508/ Δ F508). В) Типичные кривые изменений Isc в CF ALI-культурах, инфицированных указанными AAV-CFTR векторами, после последовательного добавления различных ингибиторов и агонистов. Амилорид и DIDS использовали для блокирования ENaC-опосредованных натриевых токов и не CFTR хлорных каналов перед добавлением агониста цАМФ (форсколин и IBMX), а GlyH101 использовали для блокирования CFTR-специфичных токов. Δ Isc (IBMX & Forsk) отражает активацию CFTR-опосредованных хлорных токов после введения агониста цАМФ, а Δ Isc (GlyH101) отражает ингибирование CFTR-опосредованных хлорных токов после добавления GlyH101. С) Эффекты размера вектора, оказываемые на восстановление хлорных Isc токов. gAAV-CFTR векторы увеличивали с приращением приблизительно 100 п. о. Представлены ответы Δ Isc (IBMX & Forsk) и Δ Isc (GlyH101), показывающие величину CFTR-опосредованного хлорного транспорта после базолатеральной инфекции CF HAE ALI, как описано в (B). CFTR токи, которые возникали в первичных не CF HAE (N=14), приведены для сравнения. Данные представляют среднее (\pm SEM) для N=3 независимых вставок Millicell.

Фиг. 4А, 4В. Анализ целостности вирусного генома посредством денатурирующего электрофореза в геле и анализа слот-блоттинга. А) Вирусную ДНК экстрагировали из 10^9 DRP указанных AAV-CFTR векторов, разрешенных на 0,9% щелочном агарозном геле, и переносили на нейлоновую мембрану. Саузерн-блоттинг осуществляли с использованием ³²P-меченного CFTR зонда для визуализации вирусной ДНК. В) Для того чтобы оценивать возможную делецию, которая может возникать на концах плюс- и минус-цепей вирусных геномов, $3,33 \times 10^8$ DRP каждого вируса (титр определяли посредством ПЦР Taq-

Man с использованием зонда/праймера для кДНК fCFTR) загружали в трех повторениях в Slot-Dot® SF Module (Bio-Rad, Hercules, CA), оснащенный нейлоновой мембраной. 3-кратное серийное разведение провирусной плазмиды (от 3×10^9 до $3,7 \times 10^7$ копий) также загружали для создания калибровочных кривых для количественного определения. Блоттинг зондировали с использованием ^{32}P -меченных олигонуклеотидов к промотору tg83, кДНК CFTR или полиА. (-) и (+) представляют зонды, образующие гибриды с минус- и плюс-цепью одноцепочечного генома gAAV. Сначала гибридизацию проводили с использованием набора зондов, которые образуют гибриды с минус-цепью, и затем повторно зондировали с использованием набора олигонуклеотидов, которые образуют гибриды с плюс-цепью. Число копий вирусных геномов, которые обнаруживали с помощью каждого зонда, определяли (среднее \pm SEM, N=3) на основе измерения плотности сигнала с использованием NIH ImageJ и сравнения с калибровочными кривыми.

Фиг. 5. Эффекты энхансера F5, оказываемые CFTR токи, возникающие в CF HAE после инфекции gAAV векторами. CF HAE ALI инфицировали с использованием AV2/2.tg83-fCFTR Δ R или AV2/2.F5tg83-fCFTR Δ R, при указанных MOI, с апикальной или базолатеральной поверхности. Ингибиторы протеасом вводили совместно во время 16-часового периода инфекции. Измерения Isc в инфицированных ALI-культурах проводили через 2 недели после инфекции. Средние (\pm SEM) Δ Isc (IBMX & Forsk) и Δ Isc (GlyH101) представлены вместе с N для указанного независимого анализа Transwell. CF и не CF HAE культуры с имитацией инфицирования представлены для сравнения.

Фиг. 6A, 6B. Эффекты энхансера F5, оказываемые на CFTR токи и tg83-управляемую транскрипцию CFTR после инфекции gAAV векторами. CF HAE ALI инфицировали с использованием AV2/2.tg83-fCFTR Δ R или AV2/2.F5tg83-fCFTR Δ R при MOI 2×10^4 DRP/клетка с базолатеральной поверхности, в присутствии ингибиторов протеасом. А) Isc измеряли в инфицированных ALI-культурах на 3 и 10 сутки после инфекции. Представлены значения Δ Isc (IBMX & Forsk) и Δ Isc (GlyH101). В) Относительное содержание мРНК CFTR векторного происхождения в культурах, которые оценивали на диаграмме а, как определяли с использованием RS-PCR и нормализовали по транскриптам GAPDH в каждом образце. Данные представляют среднее (\pm SEM) для N=3 независимых Transwell на каждой диаграмме.

Фиг. 7A, 7B. Хорьков в возрасте 5 суток системно инфицировали с использованием 2×10^{11} DRP AAV2/9F5tg83luc или AAV2/9F10tg83luc через инъекцию в яремную вену. Животных умерщвляли на 8 сутки после инфекции, моментальные ткани из различных органов собирали и гомогенизировали в репортерном лизирующем буфере (Promega) для люциферазного анализа. А) Данные сравнения экспрессии люциферазы после инфекций AAV2/9F5tg83luc или AAV2/9F10tg83luc, где экспрессию люциферазы с промотора F5tg83 произвольно принимали за 100 в каждой ткани. В) Значения представляют (среднюю \pm SEM, n=3) относительную люциферазную активность (RLU/мкг белка).

Фиг. 8A-8W. А-Е) Сайты связывания в F5, которые можно использовать для того, чтобы получать синтетические энхансеры, как раскрыто в настоящем описании. F-P) Сайты связывания в F10, которые можно использовать для того, чтобы получать синтетические энхансеры, как раскрыто в настоящем описании. Q-W) Сайты связывания в F5tg83, которые можно использовать для того, чтобы получать синтетические энхансеры или промотор, как раскрыто в настоящем описании. SEQ ID NO: 31-68.

Фиг. 9A-D. Эффективность переноса генов AV.F5Tg83-hCFTR Δ R в трахею и легкие хорька. Хорьков в возрасте 3 суток инфицировали объемом 100 мкл с 6×10^{11} DRP AV.F5Tg83-hCFTR Δ R в 500 мкМ доксорубина. Не инфицированные животные получали равный объем носителя с доксорубином. На 10 сутки после инфекции легкие и трахею собирали целиком и моментально замораживали в жидком азоте. Ткань превращали в порошок и получали мРНК и кДНК для количественной ПЦП CFTR человека и хорька. (А и В) Копии мРНК hCFTR и fCFTR в (А) трахеи и (В) легких. Число копий определяли с использованием калибровочной кривой, созданной по серийным разведениям плазмидной кДНК CFTR для каждого вида. (С и D) Соотношение мРНК hCFTR трансгенного происхождения и эндогенного fCFTR. C1-C3 представляют животных в группе с имитацией инфицирования и A1-A3 представляют животных в AAV-инфицированной группе. Также приведено усредненное для трех AAV-инфицированных животных. Штриховая линия представляет эндогенные уровни CFTR (соотношение=1). Данные описывают среднее \pm SEM для N=3 животных в каждой группе.

Фиг. 10A-D. AV.F5Tg83-hCFTR Δ R эффективно трансдуцирует дыхательные пути взрослых хорьков. Легкие хорьков в возрасте 1 месяца (N=3) трансдуцировали с использованием $7,5 \times 10^{12}$ DRP AV.F5Tg83-hCFTR Δ R, несущих кДНК hCFTR Δ R, в 500 мкл объеме PBS в присутствии 250 мкМ доксорубина. Контрольное животное с имитацией инфицирования (N=1) получало 500 мкл PBS без вектора в присутствии 250 мкМ доксорубина. Вектор доставляли в легкие с использованием микрораспылителя PennCentury через интубацию трахеи. Тем же животным также осуществляли назальную доставку с использованием 100 мкл, содержащих $1,5 \times 10^{12}$ DRP, с 250 мкМ доксорубина посредством инстилляции текучего вещества. При назальной доставке с имитацией инфицирования давали PBS с 250 мкМ доксорубина. На 12 сутки после инфекции отдельно собирали доли легких, наряду с трахеей, килем и носовыми раковинами с прилежащей адвентицией. Ткани моментально замораживали, и порошкообразные образцы обрабатывали отдельно для мРНК и ДНК. А) ПНК-специфичная ПЦП (RS-PCR) TaqMan с мРНК

CFTR человека и эндогенной мРНК GAPDH хорька для животных, которых лечили вектором и имитацией. В результатах представлено соотношение мРНК hCFTR/fGAPDH. В) RS-PCR TaqMan с эндогенной мРНК CFTR хорька и эндогенной мРНК GAPDH хорька для животных, которых лечили вектором и имитацией. В результатах представлено соотношение мРНК fCFTR/fGAPDH. С) Количественная ПЦР TaqMan для числа векторных геномов в каждом образце на 100 нг ДНК. D) Соотношение копий мРНК для hCFTR/fCFTR в каждом образце. За 1 принимали эндогенные уровни CFTR (красная штриховая линия). Образцы легких содержали усредненно $3,0 \pm 0,5$ копий мРНК hCFTR трансгенного происхождения на копию мРНК fCFTR. Трансдукция тканей трахеи и носа была более вариабельной, но усредненно одна копия мРНК hCFTR трансгенного происхождения/fCFTR. В результатах представлено среднее \pm SEM для животных, которых лечили вектором.

Подробное описание

Генную терапию широко используют в клинических исследованиях с 1990-х годов, сообщалось о многих успешных случаях использования вирусных или не вирусных векторов для того, чтобы доставлять терапевтические гены. gAAV является наиболее широко используемым, для него доказан профиль высокой безопасности, широкий тропизм к тканям/органам и персистирующая экспрессия трансгена. AAV представляет собой небольшой одноцепочечный ДНК вирус с по существу небольшим геномом в 4,679 т. о., таким образом, применение gAAV для генной терапии ограничено доставкой относительно небольших трансгенов. Несмотря на то, что капсид AAV может вмещать геном gAAV слегка больший, чем его исходный размер, 4,95 т. о. по-видимому составляет максимальный размер для эффективной экспрессии трансгена. Поскольку последовательность обязательного цис-элемента AAV в 300 п. о. (концевые повторы на обоих концах) включают в gAAV вектор, фактическая вставка с кассетой экзогенной экспрессии гена не может превышать 4,6 т. о. Это является проблемой для доставки эффективной экспрессии большого гена, размер которого приближается к этому пределу.

Один типичный пример состоит в том, чтобы доставлять ген CFTR (регулятор трансмембранной проводимости при кистозном фиброзе) для генной терапии кистозного фиброза (CF) с использованием gAAV вектора. Кодированная последовательность гена CFTR составляет целых 4,443 т. о. Чтобы конструировать CFTR-экспрессирующий AAV вектор с необходимыми минимальными 5' и 3' UTR и сайтами клонирования, есть пространство меньше 200 п. о. для встраивания промотора и сигнала полиаденилирования для управления транскрипцией кДНК полноразмерного CFTR.

В последнее время создана модель с нокаутом CFTR у хорьков, которая спонтанно развивает фенотип легких, который отражает ключевые признаки заболевания CF человека, в том числе самопроизвольную бактериальную инфекцию легких, дефектную секрецию из подслизистых желез, диабет и желудочно-кишечное заболевание (Sun et al., 2008; Sun et al., 2010; Oliver et al., 2012; Sun et al., 2014; Yan et al., 2013). Показано, что дыхательные пути новорожденных хорьков можно эффективно трансдуцировать с помощью gAAV1 в присутствии ингибиторов протеасом (Yan et al., 2013). Таким образом, доклинические исследования в модели CF на хорьках можно начинать сразу, как только создадут gAAV вектор, который эффективно экспрессирует CFTR в эпителии дыхательных путей. По существу небольшой геном 4,679 т. о. gAAV требует использования короткого, но надежного транскрипционного регуляторного элемента для эффективной экспрессии большого трансгена, размер которого приближается к пределу упаковки. Создавали кассету, которая эффективно экспрессирует ген CFTR хорька (fCFTR).

gAAV-CFTR вектор первого поколения (AV2.tgCF), зависящий от активности криптического промотора AAV2 ITR, неэффективно экспрессировал CFTR в клинических исследованиях. Чтобы преодолеть эту проблему, использовали другой gAAV вектор, AV2.tg83-CFTR, в котором используют синтетический промотор в 83 п. о. (tg83), чтобы усовершенствовать экспрессию. Несмотря на то, что этот вектор вызывал в 3 раза более высокие цАМФ-опосредованные Cl^- токи в CF НАЕ ALI-культурах, чем AV2.tgCF, этот уровень экспрессии остается субоптимальным для применения в генной терапии CF. Поэтому существует срочная потребность в сильном коротком промоторе для управления экспрессией CFTR в AAV векторе для генной терапии CF. Аналогичным образом, чтобы экспрессировать фактор VIII в 4,3 т. о. с удаленным В-доменом в мышцах и/или печени для генной терапии гемофилии с использованием gAAV, также необходим короткий промотор, эффективный в мышцах и печени.

Другой пример состоит в том, чтобы доставлять систему CRISPR/Cas9 для редактирования генов. Современное развитие способа редактирования генов CRISPR/Cas9 содействует новой стратегии генной терапии у человека посредством коррекции дефектного гена в предварительно выбранных сайтах, не изменяя эндогенную регуляцию гена, представляющего интерес. Эта система состоит из двух ключевых компонентов: белок Cas9 и sgRNA, а также коррекционная матрица, когда необходимо. gAAV можно использовать для того, чтобы доставлять эти элементы *in vivo* в различные целевые органы, но необходима совместная доставка белка Cas9 и химерной sgRNA в одну и ту же клетку, поскольку двойная AAV векторная система доставки мало эффективна. Поскольку размер экспрессирующей кассеты для *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) и sgRNA транскрипционной кассеты вместе превышает 4,2 т. о., то для использования одного gAAV вектора для доставки эффективно экспрессируемого белка SpCas9 необходимо использовать небольшую, но надежную промоторную/энхансерную последовательность, чтобы управ-

лять экспрессией SpCas9, и, таким образом, желательны повсеместные и/или тканеспецифические энхансеры. Несмотря на то, что Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9), который составляет приблизительно 1,0 т. о., меньше по размеру, помещается вместе со своей sgRNA и релевантными экспрессирующими кассетами в один AAV вектор, использование короткого синтетического промотора допускает дополнительное встраивание матрицы коррекции генов для гAAV вектора "все-в-одном" в применении к генной терапии на основе редактирования генов.

Как описано ниже, короткие (меньше чем 0,2 т. о.) синтетические энхансер/промоторы предоставляют решение для разрешения текущей проблемы гAAV вектора при доставке кассеты большого трансгена. Это раскрытие, в одном из вариантов осуществления, относится к использованию синтетического энхансера/промотора F5tg83 в 183 п. о. в гAAV векторах для того, чтобы доставлять эффективную экспрессию CFTR в ткань дыхательных путей легких для генной терапии CF. Это раскрытие, в одном из вариантов осуществления, также предусматривает эффективный подход для скрининга и идентификации комбинаций тканеспецифических или повсеместных синтетических промоторов/энхансеров.

Поскольку энхансерная активность различается в зависимости от клеточных линий и состояния дифференцировки клеток, а также находится под влиянием AAV ITR и последовательности гена, представляющего интерес, скрининг проводили ступенчато, например, в плаزمиде, провирусных векторах и гAAV векторах.

В одном из вариантов осуществления система скрининга включает определенный 83-членный синтетический коровый промотор (tg83p) и набор случайных 100-членных синтетических последовательностей с высокой энхансерной активностью. Скрининговый подход можно использовать для скрининга 100-членных синтетических последовательностей по их энхансерной активности для усиления транскрипции промотора, например, транскрипции промотора tg83p в 83 п. о., в другом органе/ткани для других генов, представляющих интерес, схожим ступенчатым образом: например, для управления экспрессией фактора VIII в мышцах или печени, а также для управления экспрессией белка Cas9 в любых конкретных тканях или стволовых клетках. Помимо тканеспецифической экспрессии, подход также можно использовать для того, чтобы идентифицировать энхансер с повсеместным эффектом, чтобы усовершенствовать активность промотора tg83p в широком диапазоне тканей/органов, через тестирование экспрессии репортерных генов, происходящих из гAAV, на уровне нескольких органов.

В частности, набор векторов, содержащих синтетический промотор tg83, связанный с различными синтетическими последовательностями (приблизительно 100 п. о.) с высокой энхансерной активностью, конструировали для начального скрининга в монослойных (не поляризованных) культурах клеточных линий дыхательных путей человека и первичных клеток дыхательных путей хорька, что, как рассмотрено далее, выявляло, что три из этих синтетических энхансеров (F1, F5 и F10) значительно способствовали транскрипции трансгена люциферазы с tg83p в контексте плазмидной трансфекции. Следующим было конструирование гAAV репортерных векторов с предварительно отобранными кандидатами (F1, F5 или комбинация энхансера/промотора tg83p и F5). Эти векторы также включали частичную последовательность гена, представляющего интерес (здесь CFTR), которая может поместиться в геноме гAAV по максимуму; этот подход допускает скрининг последовательностей кДНК, которые в конечном итоге будут находиться в рекомбинантном вирусе, а также влияет на активность энхансера/промотора через неизвестные процессы (вероятно, вторичная структура ДНК). Анализ в поляризованных культурах эпителия дыхательных путей человека и хорька на границе раздела воздух-жидкость (ALI) в контексте инфекции AAV вектором обнаружил, что комбинация F5tg83 (183 п. о. в длину) являлся наиболее эффективным промотором в обеих ALI-культурах, приводя к 19,6-кратному и 57,5-кратному увеличению репортерной экспрессии (люцифераза светляка), соответственно, относительно безэнхансерного аналога. Промотор F5tg83 также вызывал наивысший уровень экспрессии трансгена в дыхательных путях хорька *in vivo*. Наконец, промотор F5tg83 использовали в гAAV-CFTR векторе для управления экспрессией CFTR, вектор (AV.F5tg83CFTRΔR) давал приблизительно 17-кратное увеличение относительно безэнхансерного вектора (AV.tg83CFTRR) в управляемой вектором транскрипции мРНК CFTR и значительно усовершенствовал СГ токи в CF ALI-культурах человека.

Таким образом, увеличивали экспрессию с гAAV векторов, имеющих большой трансген, используя комбинации небольших синтетических энхансеров/промоторов, имеющие из определенного 83-членного синтетического корового промотора и набор случайных синтетических 100-членных синтетических энхансеров. В частности, несколько комбинаций коротких синтетических промоторов/энхансеров 183 п. о. (F5tg83, F1tg83 и F10tg83) способны определять сильную экспрессию трансгена в клетках дыхательных путей человека, а также не относящегося к человеку млекопитающего (такого как хорек). В одном из вариантов осуществления надежный промотор F5tg83 можно использовать в гAAV векторе для того, чтобы доставлять регулятор трансмембранной проводимости при кистозном фиброзе (CFTR) в 4,4 т. о. для генной терапии кистозного фиброза.

Изобретение дополнительно описано с помощью следующих неограничивающих примеров.

Пример 1.

Материалы и методы.

Получение гAAV векторов. Все стоки гAAV векторов создавали в клетках HEK293 посредством

тройной совместной плазмидной трансфекции с использованием системы без аденовирусов и очищали в двух раундах ультрацентрифугирования с CsCl, как приведено в Yan et al. (2004). Для всех вирусных векторов и провирусных плазмид использовали гAAV2 геномы, которые упаковывали в капсид AAV2 или AAV1 для того, чтобы создавать гAAV2/2 и гAAV2/1 вирусы, соответственно. ПЦР в реальном времени TaqMan использовали для того, чтобы количественно определять физический титр (устойчивые к ДНКазам частицы, DRP) очищенных вирусных стоков, как описано в Yan et al. (2006) и Ding et al. (2006). Набор праймеры/зонд для ПЦР, который использовали для титрования люциферазных векторов, представляет собой:

5'-TTTTTGAAGCGAAGGTTGTGG-3' (прямой праймер) (SEQ ID № 1),
 5'-CACACACAGTTCGCCTCTTTG-3' (обратный праймер) (SEQ ID № 2) и
 5'-FAM-ATCTGGATACCGGGAAAACGCTGGGCGTTAAT-TAMRA-3' зонд (SEQ ID № 3);

набор праймеры/зонд, использованный для векторов с CFTR хорька, представляет собой
 5'-GACGATGTTGAAAGCATACCAC-3' (прямой праймер) (SEQ ID № 4),
 5'-CACAACCAAAGAAATAGCCACC-3' (обратный праймер) (SEQ ID № 5) и
 5'-FAM-AGTGACAACATGGAACACATACCTCCG-TAMRA-3' (зонд) (SEQ ID NO: 6).

Все праймеры и зонды синтезировали с помощью IDT (Coralville, IA). Реакцию ПЦР осуществляли и анализировали с использованием системы обнаружения ПЦР реальном времени и программного обеспечения Bio-Rad My IQTM B.

Анализ целостности вирусных геномов. Вирусную ДНК экстрагировали из 10⁹ DRP AAV-CFTR векторов и разрезали в 0,9% щелочном денатурирующем агарозном геле при 20 вольтах в течение ночи в буфере 50 мМ NaOH/1 мМ EDTA. После переноса на нейлоновую мембрану, осуществляли саузэрн-блоттинг с ³²P-меченным CFTR зондом для визуализации вирусной ДНК. Для проверки 5'-концевых геномных делеций в слишком больших гAAV векторах, 3,33×10⁸ DRP каждого вируса (количественно определяли с помощью ПЦР TaqMan с набором зонд/праймеры для кДНК fCFTR) загружали на нейлоновую мембрану для слот-блоттинга. Сначала блоты гибридизовали с набором из трех ³²P-меченных олигонуклеотидных зондов для минус-цепи генома гAAV: в 5'-последовательности промотора tg83: taccctcgagaacggtgacgtg (SEQ ID № 7); центре кДНК CFTR хорька: ggagatgcgctgtctcctggaatg (SEQ ID № 8); и 3'-последовательности синтетического полиА: gcatcgatcagagtgtgttggtttttgtgtg (SEQ ID №9). После экспозиции с X-film, мембраны очищали от зонда и снова гибридизовали с другим набором из трех ³²P-меченных олигонуклеотидных зондов, комплементарных плюс-цепи. Программное обеспечение NIH ImageJ использовали для того, чтобы количественно определять интенсивность сигнала гибридизации для того, чтобы определять соответствующее число геномов, обнаруживаемых с помощью каждого зонда с использованием серийных разведений провирусной плазмиды в качестве стандартов.

Клеточная культура и условия трансфекции и инфекции. Клеточные линии дыхательных путей человека A549 и IB3, а также клетки HEK293 культивировали в виде монослоев в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и пенициллина-стрептомицина и поддерживали в 37°C инкубаторе при 5% CO₂. Первичные клетки дыхательных путей хорька выделяли и культивировали в качестве не поляризованного монослоя или на ALI для того, чтобы создавать поляризованный эпителий, как описано в Liu et al. (2007). Поляризованный первичный НАЕ создавали из ткани дыхательных путей трансплантата легкого, как описано в Karp et al. (2002) с помощью Cells and Tissue Core of The Center for Gene Therapy в University of Iowa. Поляризацию клеток линии CuFi8, условно трансформированной клеточной линии, которую создавали из ΔF508/ΔF508 CF клеток дыхательных путей (Zabner et al., 2003), поляризовали на ALI с использованием условий, схожих с таковыми, использованными для первичного НАЕ (Yan et al., 2013). Эпителий дыхательных путей хорька и человека выращивали на 12 мм мембранных вставках Millicell (Millipore) и дифференцировали с использованием среды USG с добавкой 2% Ultrosor G (Pall BioSeptra, SA, France) на ALI перед использованием. Клеточные линии и первичные монослойные культуры клеток дыхательных путей трансфицировали плазмидами с использованием липофектамина и 1,0 мкг плазмиды. Для гAAV инфекций клеток A549, поляризованных эпителиальных клеток дыхательных путей человека или хорька, векторы обычно оставляли в среде для культивирования в течение 24 ч (клетки A549) или 16 ч (поляризованные клетки). Для апикальной инфекции поляризованных НАЕ ALI-культур, векторы разводили в среде USG до конечного объема 50 мкл и вносили в верхнюю камеру вставки Millicell. Для базолатеральной инфекции векторы добавляли непосредственно в среду для культивирования в нижнюю камеру. Ингибиторы протеасом добавляли в среду для культивирования на всем протяжении периода инфекции поляризованных клеток, по 40 мкМ LLnL (N-ацетил-L-лейцин-L-лейцин-L-норлейцин) и 5 мкМ доксорубин в случае поляризованных человека и 10 мкМ LLnL и 2 мкМ доксорубин в случае CuFi ALI-культур и ALI-культур хорька. Эпителии экспонировали для вирусов и химических соединений в течение 16 ч и затем удаляли. В этот момент вставки Millicell быстро промывали небольшим количеством среды USG и только в нижнюю камеру добавляли свежую среду USG. Доксорубин получали из Sigma (St, Louis, MO) и LLnL получали из Boston Biochem (Cambridge, MA).

гAAV инфекция легких хорька. Все эксперименты с животными осуществляли в соответствии с протоколами, одобренными в Institutional Animal Care and Use Committee из University of Iowa. Инфекцию легких хорька *in vivo* осуществляли посредством интратрахеальной инъекции 300 мкл инокулята, содержащего 2×10^{11} DRP гAAV2/1 и 250 мкМ доксорубина. Перед инфицированием в возрасте 5 суток, детенышей хорьков анестезировали посредством ингаляции смеси изофлурана и кислорода. На 8 сутки после инфекции животных умерщвляли интраперитонеальной инъекции чрезмерной дозы пентобарбитала натрия. Для анализа экспрессии люциферазы контейнер с трахеей и легкими хорька незамедлительно замораживали в жидком азоте и затем измельчали в порошок с использованием криогенного тканевого измельчителя. 1 мл Passive Lysis Buffer (Promega, Madison, WI) добавляли в порошкообразную ткань, чтобы экстрагировать белок. После четырех циклов заморозки-оттаивания, тканевой экстракт центрифугировали на 15000 об./мин в течение 5 мин, и осветленный тканевой экстракт использовали для люциферазного анализа с использованием набора для люциферазного анализа из Promega.

Измерение экспрессии репортерной люциферазы светляка. В указанное время после инфекции или трансфекции, клетки лизировали с использованием люциферазного клеточного лизирующего буфера и определяли ферментативную активность люциферазы в клеточных лизатах с использованием Luciferase Assay System (Promega) в 20/20 люминометре, оборудованном автоматическим инжектором (Turner Biosystems, Sunnyvale, CA).

Измерение токов короткого замыкания. Трансэпителиальные токи короткого замыкания (Isc) измеряли с использованием фиксации напряжения в эпителии (Model EC-825) и автономной камерной системы Ussing (обе приобретали в Warner Instruments, Inc., Hamden, CT), как описано в Liu et al. (2007). На всем протяжении эксперимента камеру содержали при 37°C и аэрировали раствор в камере. Базолатеральную сторону камеры заполняли буферным раствором Рингера, содержащим 135 мМ NaCl, 1,2 мМ CaCl₂, 1,2 мМ MgCl₂, 2,4 мМ KH₂PO₄, 0,2 мМ K₂HPO₄ и 5 мМ Hepes, pH 7,4. Апикальную сторону камеры заполняли раствором Рингера с низким содержанием хлоридов, в котором NaCl заменяли на 135 мМ глюконат натрия. Трансэпителиальное напряжение фиксировали на нуле, токовые импульсы подавали каждые 5 с и регистрировали ток короткого замыкания с использованием многоканальной фиксации напряжения/тока VCC MC8 (Physiologic Instruments) и программного обеспечения Quick DataAcq. Следующие химические соединения последовательно добавляли в апикальную камеру: (1) амилорид (100 мкМ), чтобы ингибировать эпителиальную натриевую проводимость с помощью ENaC; (2) 4,4'-диизотиоцианато-стильбен-2,2'-дисульфоновая кислота (DIDS) (100 мкМ), чтобы ингибировать не CFTR хлорные каналы; (3) агонисты цАМФ форсколин (10 мкМ) и 3-изобутил-1-метилксантин (IBMX) (100 мкМ) для того, чтобы активировать CFTR хлорные каналы; и (4) ингибитор CFTR GlyH-101 (N-(2-лигроинленил)-[(3,5-дибром-2,4-дигидроксифенил)метил]глицингидразид) (10 мкМ), чтобы блокировать секрецию Cl⁻ через CFTR. ΔIsc вычисляли по различиям в Cl⁻ измерении плато, усредненным за 45 с до и после каждого изменения условий (химический стимул).

Количественный анализ мРНК CFTR векторного происхождения после трансдукции с использованием гAAV. Общую РНК из гAAV-инфицированных клеток получали с использованием RNeasy Mini plus Kit (Qiagen). Поскольку остаточный оцДНК геном гAAV в образце РНК может представлять собой нежелательную матрицу для традиционной ПЦР в реальном времени, использовали модифицированный РНК-специфичный способ ПЦР для гAAV вектора⁴⁶ для того, чтобы обнаружить мРНК CFTR хорька векторного происхождения. Вкратце, синтез 1-й цепи кДНК инициировали с использованием связанного с адаптером (нижний регистр) вектор-специфичного праймера, который направлен на синтетическую сигнальную последовательность полиаденилирования (верхний регистр). Последовательность этого праймера представляет собой 5'-gcacgagggcgacugucaUGAUCGAUGCAUCUGAGCUCUUUAUUA-3' (SEQ ID № 10), где все dT заменены на dU. После того, как осуществляли расщепление РНКазой H для устранения РНК-матриц, специфичный к CFTR хорька праймер (5'-TGAGATGAGGTTGGACTCA-3'; SEQ ID № 11) использовали для синтеза 2-й цепи. Во избежание ложно амплификации с кДНК, полученной из одноцепочечной вирусной ДНК, все dU-компоненты в кДНК продуктах 1-й и 2-й цепи, а также избыточные адаптерные праймеры, расщепляли с применением урацил-N-гликозилазы (UNG). Таким образом, получали кДНК продукт 2-й цепи, связанный с комплементарной последовательностью адаптера, который происходил исключительно из гAAV транскриптов. Набор праймеров для ПЦР TaqMan содержал последовательность CFTR хорька 5'-CAAGTCTCGCTCTCAAATTC-3' (SEQ ID № 12) и адаптерную последовательность 5'-GCACGAGGGCGACTGTCA-3' (SEQ ID № 13).

Используемый зонд TaqMan представлял собой 5'-FAM-ACCTTCTTCCGTCTCCTCCTTCA-TAMRA-3' (SEQ ID № 14).

Результаты Синтетические олигонуклеотидные энхансеры, которые увеличивают управляемую промотором tg83 транскрипцию в клетках дыхательных путей.

Предшествующий объективный скрининг, оценивающий короткие синтетические энхансеры из библиотеки, содержащей 52429 уникальных последовательностей, идентифицировал энхансерные элементы, способные активировать транскрипцию с минимального цитомегаловирусного (CMV) IE промо-

тора в 128 п. о. (от -53 до +75) в клетках HeLa (Schlabach et al., 2010). Эта библиотека содержала все возможные 10-членные ДНК последовательности, напечатанные на микрочипах в виде 10 тандемных повторов (общей длины в 100 оснований каждая). Наиболее эффективные 100-членные олигонуклеотиды усиливали транскрипцию этого минимального CMV IE промотора в 128 п. о. до 75-137% от того, что индуцировал CMV IE промотор дикого типа в 600 п. о. (Schlabach et al., 2010). В предыдущих исследованиях последовательность синтетического промотора в 83 п. о. (tg83) использовали для экспрессии полноразмерного гена CFTR из rAAV вектора (AV2.tg83-CFTR), и обнаруживали, что он вызывает более высокую экспрессию трансгена в CF НАЕ культурах чем криптоический промотор из AAV2 ITR (Zhang et al., 2009). Промотор tg83 состоит из сайта ATF-1/CREB и сайта связывания Sp1 из промотора $\alpha 1$ субъединицы Na, K-АТФазы и ТАТА-бокса и сайта инициации транскрипции из CMV IE промотора. Предложена гипотеза о том, что объединение промотора tg83 с синтетическим энхансером, идентифицированным посредством скрининга библиотеки, позволит получить транскрипционные единицы с более высокой эффективностью в поляризованном эпителии дыхательных путей человека и/или хорька *in vitro* и *in vivo*. Для того чтобы тестировать эту возможность, лучшие восемь энхансерных последовательностей, идентифицированных Schlabach et al. (F1, F4, F5, F10, C9, D3, CREB6 и CREB8; Schlabach et al., 2010) оценивали по их способности усиливать tg83 транскрипцию в эпителии дыхательных путей человека и хорька.

F1

AGTCAGGGCAAGTCAGTGGCAAGTCAGGGCAGTCAGGGCAGTCAGGGCAAGTCAGGGCA
AGTCAGGGCAAGTCAGGGCAAGTCAGGGCAAGTCAGGGCA (SEQ ID № 15)

F10

gaattgacgcatatattgacgcatattgacgcaaattgacgcaaattgacgcaagattg
acgcaaattgacgcaaattgacgcaaattaattgacgcat (SEQ ID № 16)

F4

CTGATGCAATCTGATGCAATCTGATGCAATCTGATGCAATCTGATGCAATCTGATGCAATCTGAGCAAT
CTGATGCAATCTGATGCAATATGATGAATGTGATGCAAT (SEQ ID № 17)

F5

TGGTGAGCGTCTGGGCATGTCTGGGCATGTCTGGGCATGTCTGGGCATGTCTGGGCATGTCTGGGCATTC
TGGGCATGTCTGGGCATGTCTGGGCATGTCTGGGCAT (SEQ ID № 18)

C3

GCTGATGCAATCTGATGCAATCTGATGCAATCTGATGCAATCTGATGCAATCTGATGCAATCTGAGCAA
TCTGATGCAATCTGATGCAATATGATGAATGTGATGCAAT (SEQ ID № 19)

D9

GCTGATGCAATCTGATGCAATCTGATGCAATCTGATGCAATCTGATGCAATCTGATGCAATCTGAGCAA
TCTGATGCAATCTGATGCAATATGATGAATGTGATGCAAT (SEQ ID № 20)

CREB6

ATTGACGCGGATTGACGCGGATTGACGCGGATTGACGCGGATTGACGCGGATTGACGCGG
G (SEQ ID № 21)

CREB8

ATTGACGCGGATTGACGCGGATTGACGCGGATTGACGCGGATTGACGCGGATTGACGCGG
GATTGACGCGGATTGACGCG (SEQ ID № 22)

Комбинации энхансеров/промоторов:

tg83

ctcgagaacggtgacgtgcacgctgggaggagccatcacgcaggttgctatataagca
gagctcggttagtgaaccgtcaga (SEQ ID № 23)

F1tg83

AGTCAGGGCAAGTCAGTGGCAAGTCAGGGCAGTCAGGGCAGTCAGGGCAAGTCAGGGCA
AGTCAGGGCAAGTCAGGGCAAGTCAGGGCAAGTCAGGGCActcgagaacggtgacgtgcacgctg
gggaggagccatcacgcaggttgctatataagcagagctcggttagtgaaccgtcaga (SEQ
ID № 24)

F10tg83

GAATTGACGCATATATTGACGCATATTGACGCAAATTGACGCAAATGACAGCAAGATTG
ACGCAAATTGACGCAAATTGACGCAAATTAATTGAC

ctcgagaacggtgacgtgcacgcgtggcgagccatcacgcaggttgctatataagcagagct
cgtttagtgaaccgtcaga (SEQ ID № 25)

F4tg83

CTGATGCAATCTGATGCAATCTGATGCAATCTGATGCAATCTGATGCAATCTGAGCAAT
CTGATGCAATCTGATGCAATATGATGAATGTGATGCAAT

ctcgagaacggtgacgtgcacgcgtggcgagccatcacgcaggttgctatataagcagagct
cgtttagtgaaccgtcaga (SEQ ID № 26)

F5tg83

GTGGTGAGCGTCTGGGCATGTCTGGGCATGTCTGGGCATGTCTGGGCATGTCTGGGCATT
CTGGGCGTCTGGGCATGTCTGGGCATGTCTGGGCATctcggagaacggtgacgtgcacgcgtggg
cggagccatcacgcaggttgctatataagcagagctcglltaglgaaccglcaga (SEQ ID
№ 27)

C3tg83

GCTGATGCAATCTGATGCAATCTGATGCAATCTGATGCAATCTGATGCAATCTGAGCAA
TCTGATGCAATCTGATGCAATATGATGAATGTGATGCAATctcggagaacggtgacgtgcacgc
gtggcgagccatcacgcaggttgctatataagcagagctcgtttagtgaaccgtcaga
(SEQ ID № 28)

D9tg83

GCTGATGCAATCTGATGCAATCTGATGCAATCTGATGCAATCTGATGCAATCTGAGCAA
TCTGATGCAATCTGATGCAATATGATGAATGTGATGCAATctcggagaacggtgacgtgcacgc
gtggcgagccatcacgcaggttgctatataagcagagctcgtttagtgaaccgtcaga
(SEQ ID № 29)

CREB6tg83

ATTGACGCGGATTGACGCGGATTGACGCGGATTGACGCGGATTGACGCGGATTGACGCG
Gctcggagaacggtgacgtgcacgcgtggcgagccatcacgcaggttgctatataagcagagc
tcgtttagtgaaccgtcaga (SEQ ID № 30)

Промотор tg83 клонировали в беспромоторный люциферазный репортерный плазмидный рGL3-Basic Vector (Promega) для того, чтобы создавать рGL3-tg83. Затем конструировали серию люциферазных репортерных экспрессирующих плазмид, в которую помещали один из восьми 100-членных энхансеров перед промотором tg83 в рGL3-tg83 (фиг. 1А). Сравнение репортерной экспрессии с рGL3-tg83 и его энхансер-содержащих производных проводили в монослойных (не поляризованных) культурах двух клеточных линий дыхательных путей человека (A549 и IB3) и первичных клетках дыхательных путей хорька (фиг. 1B-1D). Две дополнительные люциферазные экспрессирующие плазмиды, рAV2-CMV-luc (содержит CMV IE энхансер-промотор дикого типа, 600 п. о.) и рAV2-CBA-luc (содержит энхансер CMV IE-промотор β-актина курицы, т. е., промотор CBA) включали в качестве контролей для промоторной активности высокого уровня. Оценка экспрессии люциферазы после плазмидной трансфекции показывала, что все тестируемые энхансеры увеличивали управляемую tg83 экспрессию люциферазы и что их эффективности варьировали в зависимости от клеточной линии: в культурах клеток A459 человека и первичных клеток дыхательных путей хорька F1tg83 и F5tg83 превышали активность промоторов CBA и CMV; и в культурах клеток IB3 человека F10tg83 был наиболее эффективным, но вызывал значительно меньшую экспрессию, чем промотор CMV (фиг. 1B-1D).

Элемент F5 наиболее эффективно усиливает управляемую tg83 транскрипцию в поляризованном эпителии дыхательных путей человека и хорька *in vitro*, а также в дыхательных путях хорька *in vivo*.

Поскольку энхансеры F1, F5 и F10 наиболее эффективны при активации управляемой tg83 транскрипции в монослойных культурах клеток дыхательных путей, оценивали способность этих элементов содействовать транскрипции в контексте гAAV векторных геномов. Конструировали четыре гAAV провирусных вектора, несущих люциферазную экспрессирующую кассету, с экспрессией под управлением tg83 (безэнхансерный), F1tg83, F5tg83 или F10tg83. Провирусную плазмиду рAV2-tg83-fCFTR использовали в качестве шаблонного вектора для клонирования, его промотор и 5' часть fCFTR кодирующей области заменяли на люциферазную экспрессирующую кассету в 2,1 или 2,2 т. о. Размер генома составлял 4,75 т. о. в случае гAV2.tg83luc и 4,85 т. о. для энхансер-содержащих векторов. Эту конструкцию использовали по двум причинам. Во-первых, сохранение как можно большей последовательности fCFTR обеспечивало то, что размер векторного генома будет схож с таковым у гAAV-CFTR экспрессирующих векторов, которые в конечном итоге будут созданы. Во-вторых, сохранение областей кДНК fCFTR максимизировало потенциальное влияние последовательности CFTR хорька на функцию энхансера.

В качестве первой стадии исследования влияния AAV ITR и части последовательности трансгена fCFTR, подлежащей тестированию (т.е. 3'-половины от кДНК fCFTR), на транскрипцию с промотора tg83, репортерную экспрессию с плазмид рGL3-tg83 и рAV2-tg83luc сравнивали после трансфекции в монослойные культуры A549 и первичных клеток дыхательных путей хорька. Обнаруживали, что плазмиды рAV2-tg83luc в 2,5 раза (в A549) и 2 раза (в первичных клетках дыхательных путей хорька) транс-

крипционна более активна, чем плазмиды на основе pGL3 (фиг. 2А), что подсказывает, что включение AAV ITR и/или "лишних" последовательностей fCFTR оказывало в целом положительные эффекты на активность промотора tg83. Затем сравнивали экспрессию репортерного гена для плазмид pAV2-F1tg83luc, pAV2-F5tg83luc, pAV2-F10tg83luc, и pAV-tg83luc. Как и ожидали, энхансеры F1, F5 и F10 значительно усовершенствовали транскрипцию с промотора tg83 (приблизительно в 10-19 раз) в клетках обоих типов (фиг. 2В). Однако эффективность почти всех энхансеров была значительно снижена (приблизительно в 3-18 раз) в gAAV провирусных плаزمиды по сравнению с плаزمиды pGL3-tg83, которые не содержат ITR и последовательность CFTR (фиг. 2В, заливные столбцы в сравнении с фиг. 1В; фиг. 2В, незакрашенные столбцы в сравнении с фиг. 1D). Это подсказывает, что последовательности из AAV ITR и/или части кДНК CFTR хорька оказывают общее негативное влияние на функцию энхансера. Однако этот эффект, оказываемый на синтетические энхансеры, различался между монослоями A549 и первичных клеток дыхательных путей хорька. В клетках A549 энхансер F1 испытывал наиболее значительное влияние, при снижении его активности в gAAV провирусной плазмиде в 18,1 раза, тогда как таковая у энхансеров F5 и F10 снижалась только в 8,2 раза и 3,8 раза, соответственно. В первичных клетках дыхательных путей хорька энхансеры F1 и F5 имели 4,4-кратное и 2,8-кратное снижение активности, соответственно, в контексте провирусной плазмиды, тогда как функция F10 была слегка усилена (приблизительно 40%).

Затем оценивали экспрессию с различных энхансерных элементов в контексте gAAV2/2 векторов. В клетках A549, схожие увеличения экспрессии с комбинации энхансера/промотора tg83 наблюдали после трансфекции провирусной плазмидой и инфекции соответствующим gAAV вектором (фиг. 2В, заливные столбцы в сравнении с фиг. 2С). Затем первичные ALI-культуры эпителия дыхательных путей человека и хорька инфицировали равными титрами каждого gAAV вектора, и экспрессию трансгена оценивали в 2 сутки после инфекции. Эти эксперименты демонстрировали, что F5tg83 является наиболее эффективным промотором в обеих ALI-культурах человека и хорька (фиг. 2D и 2E), приводя к 19,6-кратному и 57,5-кратному увеличению, соответственно, управляемой tg83 транскрипции относительно таковой, управляемой с помощью безэнхансерного контроля (фиг. 2D и 2E). Следует отметить, что дифференцированное состояние эпителиальных клеток дыхательных путей хорька, похоже, оказывает значительное влияние на экспрессию с различных комбинаций энхансера/промотора tg83 в контексте gAAV трансдукции; энхансер F5 более эффективно усиливал tg83 экспрессию в поляризованном эпителии (фиг. 2E; 57,5-кратно), чем в недифференцированных монослоях (фиг. 2В; 16,6-кратно); энхансер F1 только немного увеличивал активность промотора tg83 в поляризованных клетках, но увеличивал экспрессию трансгена в 13,8 раза в клетках монослоя.

Наконец, активности *in vivo* у промоторов F5tg83 и F10tg83 сравнивали в дыхательных путях новорожденных хорьков, используя интратрахеальную инъекцию двух gAAV1 векторов с псевдотипированным капсидом (AV2/1.F5tg83luc и AV2/1.F10tg83luc; инъекцировали равные титры частиц). Ранее показано, что этот серотип капсида эффективен при трансдукции дыхательных путей хорька в присутствии ингибитора протеасом (Yan et al., 2013). Люциферазную активность измеряли в экстрактах, полученных из ткани трахеи и легких на 8 сутки после инфекции, и обнаруживали, что F5tg83 более эффективен, чем F10tg83, при трансдукции и легких и трахеи хорька (фиг. 2F). Эти находки соответствовали таковым для поляризованных ALI-культур эпителия дыхательных путей хорька (фиг. 2E).

Узкие пределы для размера генома gAAV оказывают значительное влияние на функциональность gAAV-CFTR векторов, при этом не меняя эффективность упаковки.

Размер ожидаемого генома AV.tg83fCFTR, если полностью упакован, составляет 4,937 т. о. (фиг. 3А). Встраивание энхансера F5 увеличивает его до 5,040 т. о. Несмотря на то, что общепризнана способность AAV заключать в капсид геном gAAV слегка более длинный, чем его естественный размер (4,679 т. о.), постепенное увеличение размера gAAV вектора с 4,675 т. о. до 4,883 т. о. и 5,083 т. о. ведет к 25 и 75%, соответственно, снижению трансдукции (Dong et al., 1996). Кроме того, одномолекулярное секвенирование (SMS) двух концов gAAV после упаковки провирусного генома в 5,8 т. о. показало, что 5' ITR нестабилен и имеет издержки в виде делеций (Karganov et al., 2012). Учитывая, что пределы для упаковки функционального генома в контексте gAAV-CFTR векторов еще не определены, было не ясно, будет ли геном AV.F5tg83fCFTR в 5,04 т. о. скомпрометирован в отношении стабильности и функции генома.

Этот вопрос изучали путем конструирования вектора AV2.tg83-fCFTR(HA) в 5,036 т. о., в котором экспрессирующую CFTR кассету продлевали посредством добавления эпитопной метки 3×HA (99 нуклеотидов) в области, кодирующей четвертую внеклеточную петлю (ECL4) в CFTR хорька (предыдущие исследования показывали, что эта инсерция не оказывает влияния на функцию хлорных каналов (Glozman et al., 2009; Fisher et al., 2012)). Этот вектор позволял авторам изобретения проверять, как размер генома влияет на функциональность CFTR в отсутствие изменений транскрипции трансгена. Получали два gAAV2 вектора (AV2/2.tg83-fCFTR и AV2/2.tg83-fCFTR-HA; фиг. 3А), и оценивали их способность создавать CFTR-опосредованные хлорные токи в поляризованных CF HAE. Выход векторов для двух вирус был почти одинаковым (AV2/2.tg83-fCFTR приблизительно 5×10^9 DRP/мкл и AV2/2.tg83-

fCFTR(НА) приблизительно 3×10^9 DRP/мкл). Поляризованные CF НАЕ культивировали на ALI и инфицировали с относительно высокой множественностью заражения (MOI) приблизительно 10^5 DRP/клетка (10^{11} DRP каждого gAAV2 вектора на вставку). На 10 сутки после инфекции, определяли уровень экспрессии CFTR посредством измерения тока короткого замыкания (Isc), как описано в Zhang et al. (2004) и Fisher et al. (2011). На фиг. 3B представлена типичная кривая Isc после инфекции CF НАЕ с использованием AV2/2.tg83-fCFTR или AV2/2.tg83-fCFTR-НА. Амилорид и DIDS сначала применяли для блокирования не CFTR хлорных каналов и ENaC-опосредованных натриевых токов, а затем агонисты цАМФ (IBMX и форсколин) использовали для того, чтобы индуцировать активность CFTR. Изменения в Isc после добавления IBMX и форсколина (Δ IscIBMX & Forsk) и последующего добавления ингибитора CFTR GlyH101 (Δ IscglyH) использовали для того, чтобы оценивать функцию CFTR. Эти результаты четко показывали, что функциональное дополнение активности CFTR в CF НАЕ выше после инфекции с использованием AV2/2.tg83-fCFTR, чем с использованием AV2/2.tg83-fCFTR-НА (фиг. 3B). Средние значения Δ IscIBMX & Forsk и Δ IscglyH из этих экспериментов сведены на фиг. 3C. CFTR-опосредованные цАМФ-индуцибельные Cl⁻ токи, которые получали с помощью AV2/2.tg83-fCFTR(НА), составляли только 3,6% от таковых в не CF НАЕ ALI-культурах, но все же выше фоновых уровней ($p < 0,01$). В отличие от этого, инфекция с использованием AV2/2.tg83-fCFTR создавала в 10 раз более высокие цАМФ-индуцибельные Cl⁻ токи, чем AV2/2.tg83-fCFTR(НА) и достигала приблизительно 30% активности CFTR в не CF НАЕ ALI-культурах. Эти результаты демонстрируют, что пределы для сохранения функции CFTR очень узки, когда получают слишком большие геномы gAAV, и что функциональность вектора не зависит только от эффективности упаковки DRP. Кроме того, эти исследования показывают, что встраивание 100-нуклеотидного энхансера F5 в AV2/2.tg83-fCFTR, при общем размере генома в 5,04 т. о., может иметь значимое негативное влияние на функцию генома.

Эффективная упаковка функционального минигена CFTR хорька в gAAV.

Далее исследовали возможность использования укороченного минигена CFTR хорька, чтобы дополнительно уменьшать размер генома gAAV-CFTR вектора и сделать возможным встраивание энхансера F5. Сообщалось, что миниген CFTR человека (CFTR Δ R) с частичной делецией R-домена в 156 п. о. (кодирующей аминокислоты 708-759) сохраняет большую часть активности хлорного канала полноразмерного белка (Ostedgaard et al., 2002; Ostedgaard et al., 2011). Миниген fCFTR Δ R создавали посредством делеции гомологичной последовательности в 159 п. о., кодирующей аминокислоты 708-760 в соответствующем положении белка человека, и получали два дополнительных вектора: AV2/2.tg83-fCFTR Δ R (4,778 т. о.) и AV2/2.tg83-fCFTR Δ R(НА) (4,877 т. о.). Эта пара векторов позволяла исследовать не только функцию минигена fCFTR в CF НАЕ ALI-культурах, но также влияние инсерции НА-метки в ген fCFTR. Анализ ответов Δ IscIBMX & Forsk и Δ IscglyH на эти два вируса показывал, что и AV2/2.tg83-fCFTR и AV2/2.tg83-fCFTR(НА) создавали существенные CFTR-опосредованные Cl⁻ токи после инфекции CF НАЕ ALI-культур (фиг. 3C). Однако НА-меченная форма создавала приблизительно на 20% меньший Cl⁻ ток, чем AV2/2.tg83-fCFTR Δ R. Эта находка согласуется с gAAV векторами в 4,88 т. о., которые имеют только приблизительно 25% функциональной активности векторов в 4,68 т. о. (Dong et al., 1996). Альтернативно, сама НА-метка может влиять на функцию CFTR в контексте делеции R-домена, несмотря на то, что в контексте полноразмерного CFTR эта ECL4 НА-метка не оказывает влияния на функцию Cl⁻ канала (Glozman et al., 2009; Fisher et al., 2011). Несмотря на больший размер генома у AV2/2.tg83-fCFTR (4,9437 т. о.), этот вектор создавал приблизительно на 30% больший CFTR-опосредованный ток, чем его более короткий аналог AV2/2.tg83-fCFTR Δ R (4,778 т. о.) (фиг. 3C). Это снижение активности Cl⁻ канала fCFTR Δ R схоже с таковым у hCFTR Δ R (Ostedgaard et al., 2002). Однако, учитывая потенциал к сниженной функциональности у более крупных векторных геномов, влияние делеции R-домена на функцию белка CFTR хорька вероятно больше такового на CFTR человека.

Чтобы устанавливать влияние длины генома на упаковку тестируемых gAAV векторов, целостность вирусного генома исследовали с использованием щелочного денатурирующего агарозного электрофореза в геле после, чего следовал саузерн-блоттинг (фиг. 4A). Этот анализ показывал, что наименьший векторный геном (т. е. из AV2.tg83-fCFTR Δ R, 4,778 т. о.) можно отличать от других трех вирусов на основе его более быстрой миграции через гель (AV2.tg83-fCFTR Δ R на 99 нуклеотидов короче, чем вектор AV2.tg83-fCFTR Δ R(НА)). Однако AV2.tg83-fCFTR(НА) (5,036 т. о.), AV2.tg83-fCFTR (4,937 т. о.) и AV2.tg83-fCFTR Δ R(НА) (4,887 т. о.) нельзя отличить друг от друга на основе этого анализа. Учитывая что, может быть возможно визуализировать отличия и 149 нуклеотидов (AV2.tg83-fCFTR(НА) в сравнении с AV2.tg83-fCFTR Δ R(НА)) и 99 нуклеотидов (AV2.tg83-fCFTR(НА) в сравнении с AV2.tg83-fCFTR Δ R(НА) и AV2.tg83-fCFTR(НА) в сравнении с AV2.tg83-fCFTR), эти находки интерпретировали как подтверждение мнения о том, что вирусные геномы, которые больше таковых у AV2.tg83-fCFTR Δ R(НА) (4,887 т. о.), склонны подвергаться делециям, которые компрометируют экспрессию трансгена CFTR.

Мнение о том, что делеция возникает в контексте более длинных геномов, дополнительно подтверждала гибридизация вирусных геномов с двумя наборами олигонуклеотидных зондов плюс-и минус-

цепей в центре кДНК CFTR, промоторе tg83 и синтетических последовательностях полиА (фиг. 4В). Результаты этого анализа показывали, что вирусная ДНК из наибольшего вектора AV2.tg83-fCFTR(НА) подвержена делециям на 5'-концах геномов плюс- и минус-цепей. В отличие от этого, 3'-концы геномов плюс- и минус-цепей AV2.tg83-fCFTR(НА) оставались интактными, что согласуется с упаковкой одноцепочечных геномов AAV в направлении от 3' к 5'. Тот факт, что прочность гибридизации на промоторе tg83 (для плюс-цепи) и последовательности полиА (для минус-цепи) ниже, чем таковая при гибридизации кДНК fCFTR, подсказывал, что эти делеции не ограничены областью ITR (т. е. что повреждение распространялось в экспрессирующую CFTR кассету). Такие делеции не наблюдали во втором самом длинном векторе, AV2.tg83-fCFTR, следовательно, экспрессирующая CFTR кассета в этом векторе наиболее вероятно все же остается интактной, несмотря на то, что частичные делеции в области ITR вероятно возникают, как предполагали по миграции вирусной ДНК в денатурирующем агарозном геле. Хотя делеции в областях ITR могут не оказывать непосредственного влияния на экспрессию трансгена CFTR, они могут влиять на стабильность вирусных геномов и, таким образом, опосредованно влиять на экспрессию CFTR. Эти результаты, вместе с функциональным анализом, приводят к заключению о том, что кДНК fCFTRΔ без НА-метки лучше всего подойдет для тестирования влияния энхансера F5, оказываемого на gAAV-опосредованное дополнение CFTR.

Синтетический промотор F5tg83 усовершенствует gAAV-опосредованное дополнение CFTR.

Далее создавали провирусную плазмиду pAV2.F5tg83-fCFTRΔR и получали вирус AV2/2.F5tg83-fCFTRΔR с размером генома 4,87 т. о. Эффективность этого вируса для дополнения функции CFTR канала после инфекции поляризованных CF HAE сравнивали с таковой у аналогичного безэнхансерного вектора (AV2.tg83-fCFTRΔR).

Результаты этого анализа показывали, что встраивание энхансера F5 значительно усовершенствовало CFTR-опосредованные Cl⁻ токи (фиг. 5). Через две недели после базолатеральной инфекции при MOI 5×10^4 DRP/клетка, цАМФ-индуцированные CFTR-опосредованные Cl⁻токи для AV2/2.F5tg83-fCFTRΔR в 3,5 раза превышали AV2/2.tg83-fCFTRΔR, и первый составлял 89% от того, что наблюдали в не CF первичных HAE. Схоже усовершенствование функции CFTR (4,8-кратное) наблюдали с использованием AV2/2.F5tg83-fCFTRΔR после апикальной инфекции, но в этом случае эффективность трансдукции была значительно ниже, как предварительно сообщалось для этого серотипа. При сниженной MOI 1×10^4 DRP/клетка базолатерально, AV2/2.F5tg83-fCFTRΔR вызывал 69% CFTR тока, создаваемого с помощью этого вектора при 5-кратно увеличенной MOI, что подсказывает, что в последнем случае дополнение функции CFTR достигало насыщения. Таким образом, когда сравнивают эффективность векторов AV2/2.F5tg83-fCFTRΔR (1×10^4 DRP/клетка) и AV2/2.tg83-fCFTRΔR (5×10^4 DRP/клетка) в контексте оптимальной инфекции (т. е. базолатеральной) и ненасыщающих условий, встраивание энхансера F5 усовершенствовало эффект вектора в 13,5 раза. Этот уровень увеличения тока согласуется с увеличением экспрессии, наблюдаемой при использовании аналогичных люциферазных экспрессирующих векторов (фиг. 2D, в 19,6 раза).

Учитывая очевидное насыщение CFTR токов при наивысшей MOI (5×10^4 DRP/клетка) после базолатеральной инфекции с использованием AV2/2.F5tg83-fCFTRΔR, кинетику экспрессии CFTR оценивали при промежуточной MOI (2×10^4 DRP/клетка). Измерения осуществляли на 3 и 10 сутки после инфекции CF HAE с использованием AV2/2.F5tg83-fCFTRΔR и AV2/2.tg83-fCFTRΔR. Результаты этого анализа показывали, что, в контексте энхансера F5, начало CFTR-опосредованных Cl⁻ токов было более быстрым, чем в его отсутствие (фиг. 6A). Фактически, CFTR токи были максимальными на 3 сутки после инфекции с использованием AV2/2.F5tg83-fCFTRΔR, при этом токи возрастали в 3,6 раза между 3 и 10 сутками после инфекции с использованием AV2/2.tg83-fCFTRΔR. Для более непосредственного сравнения транскрипционной активности между этими векторами, мРНК CFTR хорька исследовали с помощью РНК-специфичной ПЦР с обратной транскриптазой в реальном времени (RS-PCR), этот способ предотвращает амплификацию ДНК продуктов векторного происхождения и его ранее применяли при обнаружении мРНК CFTR из gAAV-инфицированных клеток и тканей (Zhang et al., 2004; Gerard et al., 2003). Анализ результатов RS-PCR, после нормализации по транскриптам GAPDH хорька, показывал в 6,4 раза и 17,1 раза повышенные уровни мРНК fCFTR после инфекции с использованием AV2.F5tg83-fCFTRΔR в сравнении с AV2/2.tg83-fCFTRΔR, в моменты времени на 3 и 10 сутки, соответственно (фиг. 6B). 10-кратное увеличение мРНК CFTR, которое наблюдали между 3 и 10 сутками после инфекции, подтверждает, что CFTR токи были насыщены к 3 суткам после инфекции. Таким образом, на транскрипционном уровне, встраивание энхансера F5 увеличивало экспрессию CFTR в 17,1 раза, близко отражая результаты, наблюдаемые с использованием люциферазных экспрессирующих векторов (фиг. 2D, в 19,6 раза).

Обсуждение.

gAAV векторы привлекают существенное внимание в отношении генной терапии человека, но их по существу небольшой геном (4,679 т. о.) является значимой проблемой для доставки больших генов, таких как CFTR. Несмотря на то, что несколько лабораторий пытались проводить рациональное конструирование коротких энхансеров и промоторов для использования в gAAV векторах, этот подход еще должен дать надежную экспрессию CFTR в дыхательных путях. В данном исследовании предпринят полно-

стью эмпирический подход посредством скрининга синтетических энхансеров по их эффективности при доставке экспрессии репортерного гена ступенчато - в плазидах, провирусных векторах и вирусных векторах. Хотя основная цель состояла в разработке гAAV векторов для доставки CFTR в дыхательные пути, схожий подход может оказаться эффективным при попытках генной терапии, направленных на доставку других больших генов (например, фактора VIII и дистрофина), которые делают необходимым использование коротких промоторов.

Известно, что получение слишком большого генома гAAV ведет к случайным делециям на 5'-концах одноцепочечных геномов, заключаемых в капсиды (Karpanov et al., 2012), но функциональная целостность векторных геномов гAAV, которые приближаются к общепринятой максимальной емкости гAAV (приблизительно 5,0 т. о.), тщательно не исследована. Данное исследование дает, в контексте CFTR-экспрессирующих гAAV векторов, доказательство того, что функциональность генома гAAV начинает снижаться значительно ниже этого порога в 5,0 т. о. Доказательство, подтверждающее это, включает снижение функции CFTR для генома в 4,877 т. о. в сравнении с геномом в 4,778 т. о. (фиг. 3С) и отсутствие различий в миграции одноцепочечных геномов в 4,877-5,036 т. о. при визуализации на щелочных гелях (фиг. 4А). Дополнительно, самый большой CFTR вектор (5,036 т. о.) подвержен делеции в приблизительно 30% геномов, которая выходит за пределы 5' ITR и в промотор (в случае плюс-цепи) или область полиА (в случае минус-цепи). Это подсказывает, что повреждение экспрессирующей CFTR кассеты может отвечать за значительное ослабление функции CFTR, доставляемого с помощью этого вектора. Хотя используемые олигонуклеотиды обнаруживали только делеции в 30% геномов для этой самой большой конструкции, 90% снижение CFTR хлорного тока между векторами в 4,937 и 5,036 т. о. подсказывает, что значительно большая процентная доля геномов подвержена функциональным делециям и что делеции ITR также могут ослаблять эффективность вектора.

Данные находки выглядят несоответствующими предыдущему наблюдаемому только 4-кратному изменению экспрессии трансгена между гAAV векторами, размер которых составляет 4,7 т. о. и 5,2 т. о. (Wu et al., 2010). Однако в этом более раннем исследовании "лишнюю" последовательность, использованную для продления вектора, располагали между экспрессирующей кассетой и ITR, и делеции "лишней" последовательности вероятно будут оказывать меньшее влияние на транскрипционную активность трансгена. В данном исследовании AAV-CFTR вектора вместо этого использовали короткий синтетический промотор и сигнал полиА, и следовало ожидать значительного влияния небольших делеции в этих коротких транскрипционных регуляторных элементах, оказываемого на экспрессию гена. Поскольку титр устойчивых к ДНКазам частиц обычно используют для того, чтобы подтверждать эффективную упаковку геномов гAAV, небольшие 5'-концевые делеции будут оказывать значительное влияние на функциональность слишком больших гAAV векторов.

Эмпирический подход, который использовали для скрининга синтетических 100 п. о. энхансеров по способности усовершенствовать гAAV-опосредованную экспрессию трансгена в дыхательных путях, давал несколько важных наблюдений: 1) энхансерная активность различалась в зависимости от клеточных линий, а также состояния дифференцировки клеток; 2) на энхансерную активность влияли ITR AAV и также возможно влияла последовательность гена, представляющего интерес (в этом исследовании, 3'-половина кодирующей области кДНК CFTR хорька); 3) энхансерная активность в случае гAAV инфекции в целом схожа с таковой в контексте провирусного вектора, хотя с небольшими различиями; 4) инфекция дыхательных путей человека и хорька с использованием вирусных векторов обнаруживала некоторые различия в функции энхансера (наиболее заметно для AV2/2.F1tg83luc, фиг. 2D и 2E). Эти результаты показывают, что, несмотря на то, что трансфекция провирусной плазмидой подходит для начального скрининга синтетических энхансеров, выполнение такого скрининга в неполяризованных первичных культурах дыхательных путей может не создавать те же паттерны экспрессии гена, которые наблюдают после AAV инфекции поляризованных культур дыхательных путей.

С помощью этого скрининга идентифицировали синтетический энхансер в 100 п. о. (F5), который значительно усовершенствует транскрипционную активность синтетического промотора в 83 п. о. (tg83), в поляризованных культурах и первичных эпителиальных клеток человека и дыхательных путей хорька, а также в легких и трахее хорька *in vivo*. Миниген CFTR хорька, не содержащий часть R-домена из 53 аминокислот (fCFTR Δ R), сохранял приблизительно 70% функции fCFTR дикого типа, подобно сохранению 80% функции у аналогичной конструкции hCFTR Δ R, о которой сообщали ранее (Ostedgaard et al., 2002). Тем не менее, это значительно скомпенсировано увеличенной экспрессией трансгена с AV2.F5tg83-fCFTR Δ R, поскольку использование укороченного минигена позволяет сэкономить пространство в 150 п. о., чтобы сделать возможным встраивание энхансера F5. В контексте гAAV вектора, энхансер F5 значительно усовершенствовал управляемую tg83 экспрессию мРНК CFTR (17,1-кратно) на 10 сутки после инфекции CF НАЕ относительно вектора AV2/2.tg83-fCFTR Δ R, который не содержит этот энхансер. Это увеличение экспрессии мРНК CFTR с AV2/2.F5tg83-fCFTR Δ R хорошо коррелировало с 19,6-кратным усовершенствованием CFTR-опосредованных токов, которое делал возможным этот вектор, и вело к возникновению приблизительно 89% цАМФ-опосредованных Cl⁻ токов, которые наблюдали в не CF НАЕ.

Стоит отметить, что найден потолок на уровне функциональной коррекции, которого можно достичь в отношении изменений в *Isc*. В динамических исследованиях максимальной коррекции *Isc* в CF НАЕ достигали на 3 сутки после инфекции, приблизительно с 10-кратным увеличением мРНК CFTR на 10 сутки после инфекции, которое не приносило усовершенствования *Cl* токов (фиг. 6). Эти находки дают важное понимание для оценки функциональности гAAV-CFTR векторов: дозозависимые эффекты вектора необходимы для точного сравнения конструкций векторов. Потолок CFTR токов может быть отражением самоограничивающей биологии клетки (например, контроль над общим количеством CFTR на плазматической мембране), или аберрантной направленной миграции CFTR к базолатеральной мембране при более высоких уровнях экспрессии (Farmen et al., 2005).

Вкратце, создавали гAAV-CFTR вектор, который обеспечивает экспрессию на высоком уровне, пригодную для использования в исследованиях генной терапии легких в модели CF на хорьках. Кроме того, данные находки подсказывают, что небольшие синтетические энхансеры и промоторы могут быть эффективными инструментами для оптимизации конструкции гAAV векторов для доставки больших транскриптов.

Краткое изложение.

Как рассмотрено в настоящем описании, комбинацию небольшого синтетического энхансера/промотора размером приблизительно 200 п. о. или меньше, можно использовать в гAAV векторе для того, чтобы доставлять эффективную экспрессию трансгена для экспрессии большого трансгена; в этом исследовании геном является CFTR. В настоящем описании также рассмотрен эмпирический подход для скрининга набора 100-членных синтетических энхансерных элементов по их способности увеличивать репортерную экспрессию с короткого синтетического промотора в 83 п. о. (tg83p) в ткани дыхательных путей легких. Частичную последовательность гена, представляющего интерес (в данном исследовании это CFTR), включают в репортерный вектор для того, чтобы максимизировать эффект для скрининга наилучшей энхансерной последовательности. Скрининг проводили ступенчато - в плаزمидных, провирусных векторах и гAAV векторах, а также на различных клеточных/тканевых уровнях - в монослойных (не поляризованных) культурах клеточных линий дыхательных путей человека и первичных клеток дыхательных путей хорька, в поляризованных культурах эпителия дыхательных путей человека и хорька на границе раздела воздух-жидкость (ALI) и дыхательных путях хорька *in vivo*. Энхансерная активность различается в зависимости от клеточных линий и состояния дифференцировки клеток, а также находится под влиянием AAV ITR и последовательности гена, представляющего интерес. Таким образом, эффекты энхансера в контексте плазмидной трансфекции могут отличаться от таковых в контексте гAAV трансдукции. Эффекты конкретного энхансера *in vivo* могут не быть предсказуемыми на основе его поведения, демонстрируемого в культуральных клеточных линиях. Таким образом, скрининг нужно проводить на различных клеточных/тканевых уровнях и ступенчато - в плазмидных, провирусных векторах и гAAV векторах, чтобы обеспечивать успех.

Обнаружено, что три синтетических энхансера (F1, F5 и F10) значительно увеличивают транскрипцию tg83p для трансгена люциферазы в контексте плазмидной трансфекции. Промотор F5tg83, комбинация энхансера F5 и tg83p в 183 п. о., был наиболее эффективным промотором в ALI-культурах человека и хорька, приводя к 19,6-кратному и 57,5-кратному увеличению репортерной экспрессии, соответственно, относительно безэнхансерного аналога. Промотор F5tg83 также давал наивысший уровень экспрессии трансгена в дыхательных путях хорька *in vivo*. Когда промотор F5tg83 использовали для того, чтобы транскрибировать миниген CFTR в 4,2 т. о. (CFTRΔR) в гAAV векторе, он давал приблизительно 17-кратное увеличение транскрипции мРНК CFTR векторного происхождения и значительно усовершенствовал *Cl* токи в CF ALI-культурах человека, по сравнению с вектором, в котором используют только tg83p.

Комбинации энхансера/промотора для эпителия легких (например, F5tg83) не обязательно могут быть также эффективными для других органов/тканей. Например, когда AAV векторы, несущие репортерный ген люциферазы под управлением F5tg83 или F10tg83, использовали для того, чтобы инфицировать различные ткани/органы пищеварительной системы, F5tg83 демонстрировал самую сильную промоторную активность в поджелудочной железе, желчном пузыре и печени, тогда как F10tg83 превосходил по эффективности F5tg83 в тонкой кишке (фиг. 7A-7B).

Несмотря на то, что исследования сосредотачивали на идентификации последовательности сильного синтетического энхансера/промотора, используемой для эффективной экспрессии CFTR в ткани легких/дыхательных путей, скрининговый подход можно использовать для любых желаемых типов клеток, тканей и органов *in vitro* и *in vivo*.

Таким образом, обнаруживали, что использование коротких энхансерных элементов (приблизительно 100-членных синтетических олигонуклеотидных последовательностей, состоящих из 10-членных повторов) усиливает экспрессию гена с минимального промотора в гAAV векторах. Эти 100 п. о. энхансерные элементы предварительно идентифицировали по их способности активировать транскрипцию под управлением предраннего (IE) минимального промотора CMV в клеточных линиях (Schlabach et al., 2010). Предложена гипотеза о том, что энхансеры, которые наиболее сильны в активации транскрипции, можно использовать для усиления активности синтетического промотора tg83 в клетках дыхательных

путей в контексте гAAV векторов. Тестировали восемь комбинаций промотора tg83 и синтетических энхансеров в 100 п. о. и обнаруживали, что тот, который обозначали как F5, эффективно усиливал транскрипцию с промотора tg83 в поляризованных клетках дыхательных путей (in vitro), полученных как от человека, так и от хорька, а также в дыхательных путях хорька (in vivo). При использовании промотора F5tg83 и минигена CFTR хорька с частичной делецией в R-домене (fCFTR Δ R) находили гAAV вектор (AV2/2.F5tg83-fCFTR Δ R), у которого тестировали способность корректировать CFTR-опосредованный Cl⁻ транспорт в CF ALI-культурах.

Пример 2.

AV.F5Tg83-hCFTR Δ R тестировали на экспрессию hCFTR в дыхательных путях новорожденных и взрослых хорьков. Конечной точкой этих анализов было соотношение мРНК CFTR человека трансгенного происхождения (hCFTR) и эндогенного CFTR хорька (fCFTR). У новорожденных хорьков в возрасте 3 суток (фиг. 9) AV.F5Tg83-CFTR Δ R вел к 240% более высокой экспрессии CFTR человека по сравнению с эндогенным CFTR (хорька) после доставки гена в легкие.

Принимая во внимание, что фенотип эпителия дыхательных путей хорька и секреция в дыхательных путях меняются по мере развития легких, оценивали, трансдуцирует ли AV.F5Tg83-CFTR Δ R дыхательные пути взрослого хорька и остается ли промотор активным. С этой целью оценивали способность AV.F5Tg83-CFTR Δ R трансдуцировать легкие хорьков в возрасте 1 месяца. У взрослых хорьков в возрасте 1 месяца (фиг. 10) AV.F5Tg83-CFTR Δ R вел к 300% более высокой экспрессии CFTR человека по сравнению с эндогенным CFTR (хорька) после доставки гена в легкие. Кроме того, соотношение CFTR человека и хорька составляло приблизительно один в носовом ходу. Эти находки у новорожденных и взрослых хорьков подсказывают, что промотор F5tg83 надежно экспрессирует трансген CFTR в легких in vivo.

Литература

- Aitken et al., *Chest*, 123:792 (2003).
- Aitken et al., *Hum Gene Ther.*, 12:1907 (2001).
- Carter, *Hum Gene Ther.*, 16:541 (2005).
- Conrad et al., *Gene Ther.*, 3:658 (1996).
- Daya & Berns, *Clin. Microb. Rev.*, 21:583 (2008).
- Ding et al., *Gene Ther.*, 12:873 (2005).
- Ding et al., *Mol. Ther.*, 13:671 (2006).
- Dong et al., *Hum. Gene Ther.*, 7:2101 (1996).
- Duan et al., *Hum. Gene Ther.*, 9:2761 (1998).
- Duan et al., *J. Clin. Invest.*, 105:1573 (2000).
- Farmen et al., *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 289:1123 (2005).
- Fisher et al., *J. Biol. Chem.*, 287:21673 (2012).
- Flotte et al., *J. Biol. Chem.*, 268:3781 (1993).
- Flotte, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 3: 497 (2001).
- Flotte, et al., *J. Biol. Chem.*, 268:3781 (1993).

- Gerard et al., *Gene Ther.*, 10:1744 (2003).
- Glozman et al., *J. Cell Biol.*, 184:847 (2009).
- Griesenbach et al., *Virus Adapt. Treat.*, 2:159, (2010).
- Griesenback & Alton, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 61:128 (2009).
- Kapranov et al., *Hum. Gene Ther.*, 23:46 (2012).
- Karp et al., *Methods Mol. Biol.*, 188:115 (2002).
- Li et al., *Mol. Ther.*, 17:2067 (2009).
- Liu et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 36:313 (2007).
- Liu et al., *Gene Ther.*, 14:1543 (2007).
- Liu et al., *Mol. Ther.*, 15:2114 (2007).
- Moss et al., *Hum. Gene Ther.*, 18:726 (2007).
- Mueller & Flotte, *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 35:164 (2008).
- Olivier et al., *J. Clin. Invest.*, 122:3755 (2012).
- Ostedgaard et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:2952 (2005).
- Ostedgaard et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108:2921 (2011).
- Ostedgaard et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:3093 (2002).
- O'Sullivan & Freedman, *Lancet*, 373:1891 (2009).
- Riordan et al., *Science*, 245:1066 (1989).
- Rommens et al., *Science*, 245:1059 (1989).
- Rowe et al., *N. Engl. J. Med.*, 352:1992 (2005).
- Schlabach et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107:2538 (2010).
- Summer-Jones et al., *Gene Therapy for Cystic Fibrosis Lung Disease*, Birkhauser Basel, Basel (2010).
- Sun et al., *Am. J. Pathol.*, 184:1309 (2014).
- Sun et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 50:502 (2014).
- Sun et al., *J. Clin. Invest.*, 118:1578 (2008).
- Sun et al., *J. Clin. Invest.*, 120:3149 (2010).
- Wagner et al., *Hum. Gene Ther.*, 13:1349 (2002).
- Welsch, *FASEB. J.*, 4:2718 (1990).
- Welsh et al., *In The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, eds. McGraw-Hill, New York, p. 3799 (1995).
- Wu et al., *Mol. Ther.*, 14:316 (2006).
- Wu et al., *Mol. Ther.*, 18:80 (2010).
- Yan et al., *Hum. Gene Ther.*, 24:786 (2013).
- Yan et al., *Hum. Gene Ther.*, 26:334 (2015).
- Yan et al., *J. Virol.*, 76:2043 (2002).
- Yan et al., *J. Virol.*, 78:2863 (2004).
- Yan et al., *Mol. Ther.*, 21:2181 (2013).
- Zabner et al., *Am J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 284:844 (2003).
- Zhang et al., *Mol. Ther.*, 10:990 (2004).
- Zhang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:10158 (1998).

Все публикации, патенты и патентные заявки включены в настоящее описание посредством ссылки. Несмотря на то, что в приведенном выше описании это изобретение описано по отношению к определенным предпочтительным вариантам его осуществления и многие детали приведены в иллюстративных целях, специалистам в данной области будет очевидно, что изобретение допускает дополнительные варианты осуществления и определенные подробности в настоящем описании можно значительно изменять, не отступая от основных принципов изобретения.

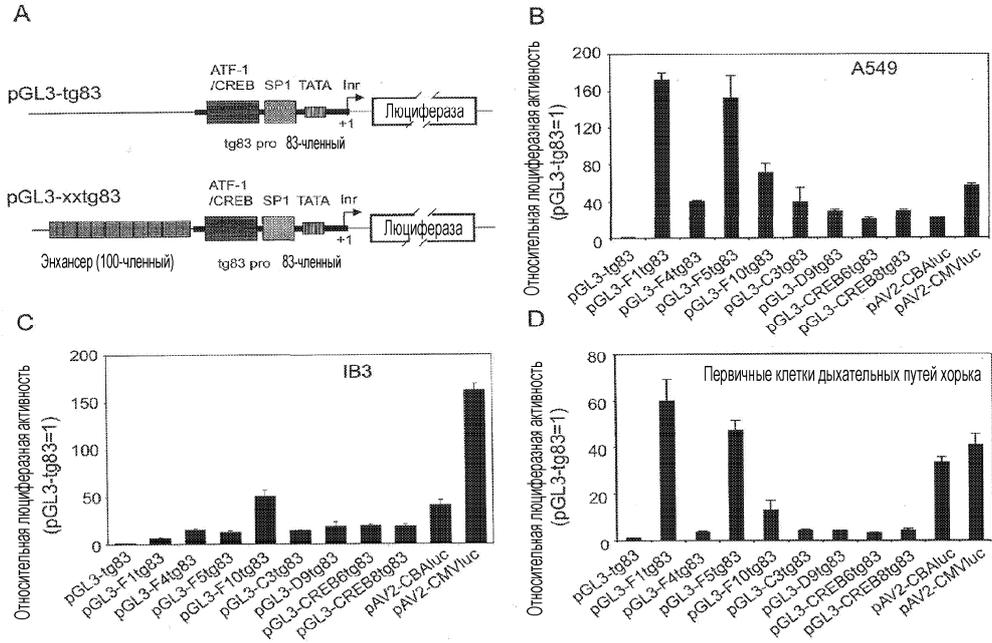
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный рекомбинантный парвовирусный вектор, содержащий энхансер, функционально связанный с промотором, причем энхансер и промотор имеют по меньшей мере 90% идентичности нуклеотидных последовательностей с SEQ ID NO: 27.
2. Рекомбинантный парвовирусный вектор по п.1, в котором энхансер содержит F5.
3. Рекомбинантный парвовирусный вектор по п.1 или 2, в котором энхансер и промотор имеют по меньшей мере 95, 98, 99% или большую идентичность последовательностей нуклеиновых кислот с SEQ ID NO: 27.
4. Рекомбинантный парвовирусный вектор по п.3, в котором промотор и энхансер включают последовательность SEQ ID NO: 27.
5. Рекомбинантный парвовирусный вектор по любому из пп.1-4, в котором промотор представляет собой tg83.
6. Рекомбинантный парвовирусный вектор по любому из пп.1-5, который представляет собой бокавирусный или аденоассоциированный вирусный вектор.
7. Рекомбинантный парвовирусный вектор по п.6, который представляет собой аденоассоциированный вирусный вектор.
8. Рекомбинантный парвовирусный вектор по любому из пп.1-7, в котором промотор функционально связан с открытой рамкой считывания.
9. Рекомбинантный парвовирусный вектор по п.8, в котором открытая рамка считывания кодирует профилактический или терапевтический продукт гена.
10. Рекомбинантный парвовирусный вектор по п.9, в котором терапевтический продукт гена представляет собой регулятор трансмембранной проводимости при кистозном фиброзе (CFTR) или CFTRΔR.
11. Рекомбинантный парвовирусный вектор по п.10, в котором CFTR или CFTRΔR представляет собой CFTR человека или CFTRΔR человека.
12. Способ экспрессии трансгена в клетке, включающий: введение композиции, содержащей рекомбинантный парвовирусный вектор по любому из пп.1-11, в эукариотическую клетку с тем, чтобы экспрессировать трансген в клетке.
13. Способ экспрессии трансгена у млекопитающего, включающий введение млекопитающему композиции, содержащей рекомбинантный парвовирусный вектор по любому из пп.1-11, чтобы экспрессировать трансген в клетках млекопитающего.
14. Способ по п.12 или 13, в котором экспрессию трансгена усиливают по меньшей мере в 2, 5, 10 или 15 или более раз относительно соответствующего парвовирусного вектора, который не содержит энхансер.
15. Способ по любому из пп.12-14, в котором композицию вводят инъекцией.
16. Способ по любому из пп.12-14, в котором композицию вводят интраназально.
17. Способ по любому из пп.12-16, в котором млекопитающее представляет собой человека.
18. Выделенный вектор, содержащий энхансер, функционально связанный с промотором, причем энхансер и промотор имеют по меньшей мере 90% идентичности нуклеотидных последовательностей с SEQ ID NO: 27.
19. Вектор по п.18, в котором энхансер содержит F5.
20. Вектор по п.18 или 19, в котором промотор представляет собой tg83.
21. Вектор по любому из пп.18-20, в котором промотор функционально связан с открытой рамкой считывания.
22. Вектор по п.21, в котором открытая рамка считывания кодирует профилактический или терапевтический продукт гена.
23. Вектор по п.22, в котором терапевтический продукт гена представляет собой CFTR или CFTRΔR.
24. Вектор по п.23, в котором CFTR или CFTRΔR представляет собой CFTR человека или CFTRΔR человека.
25. Вектор по любому из пп.18-24, в котором энхансер и промотор имеют по меньшей мере 95, 98, 99% или большую идентичность нуклеотидных последовательностей с SEQ ID NO: 27.
26. Вектор по любому из пп.18-25, который представляет собой плазмиду.
27. Рекомбинантный аденоассоциированный вектор, содержащий (i) энхансер, функционально связанный с промотором, причем энхансер и промотор содержат последовательность SEQ ID NO: 27; и (ii) трансген CFTRΔR человека, функционально связанный с промотором.
28. Применение рекомбинантного парвовирусного вектора по любому из пп.1-11, вектора по любому из пп.18-26 или рекомбинантного аденоассоциированного вектора по п.27 для генной терапии муковисцидоза у человека.
29. Применение по п.28, где вектор предназначен для инъекции.
30. Применение по п.28, где вектор предназначен для интраназального введения.
31. Способ генной терапии муковисцидоза у человека, включающий введение субъекту рекомби-

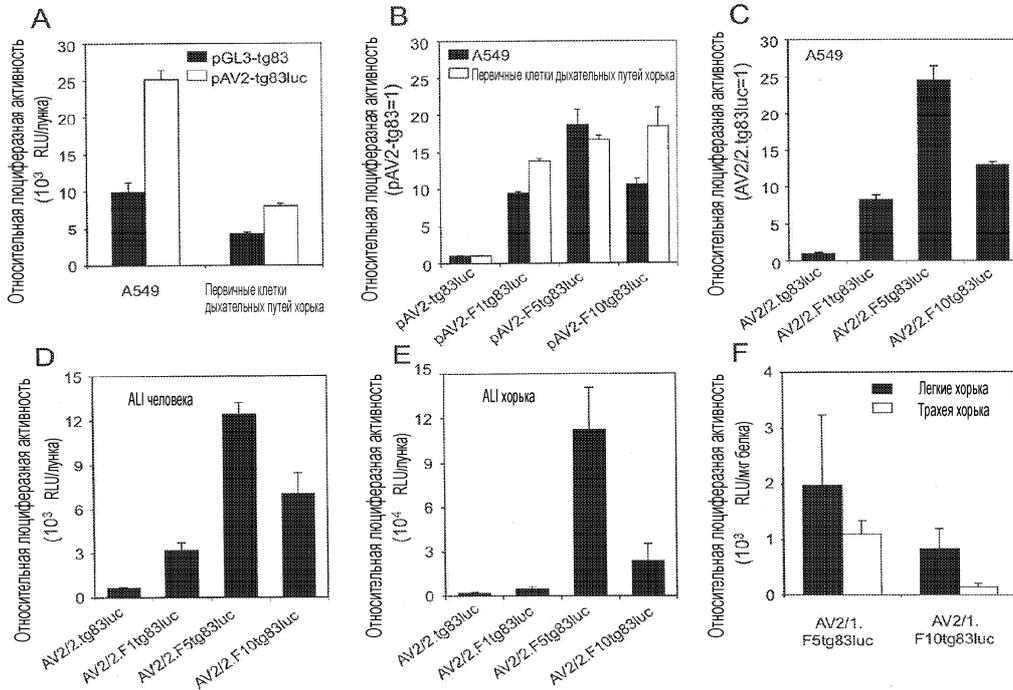
нантного парвовирусного вектора по п.11, вектора 24 или рекомбинантного аденоассоциированного вектора по п.27.

32. Способ по п.31, где рекомбинантный парвовирусный вектор, вектор или рекомбинантный аденоассоциированный вектор вводят инъекцией.

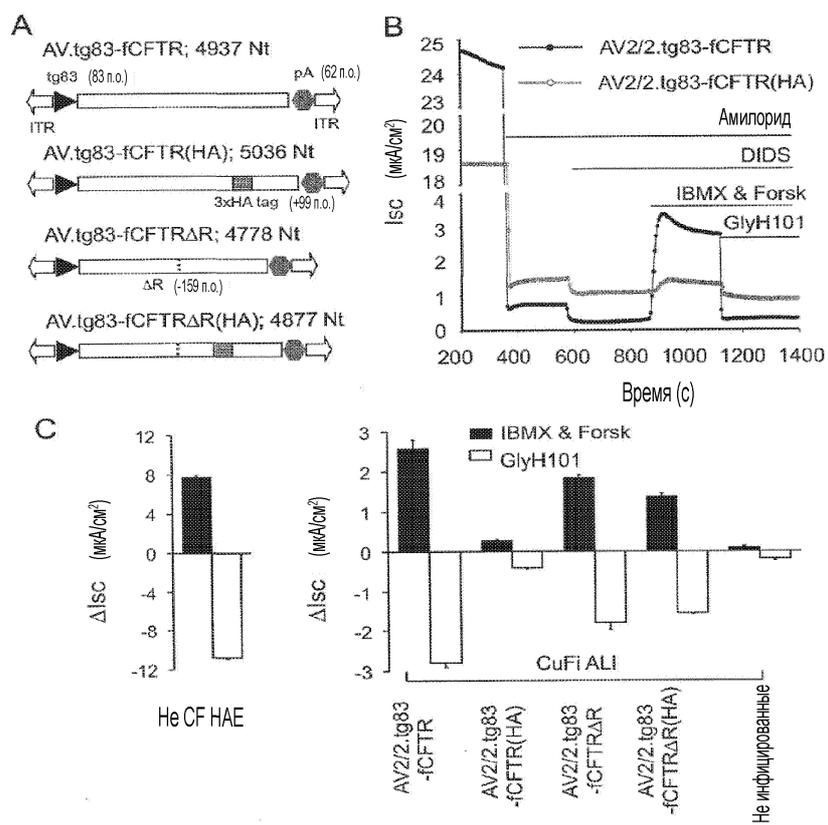
33. Способ по п.31, где рекомбинантный парвовирусный вектор, вектор или рекомбинантный аденоассоциированный вектор вводят интраназальным путем.



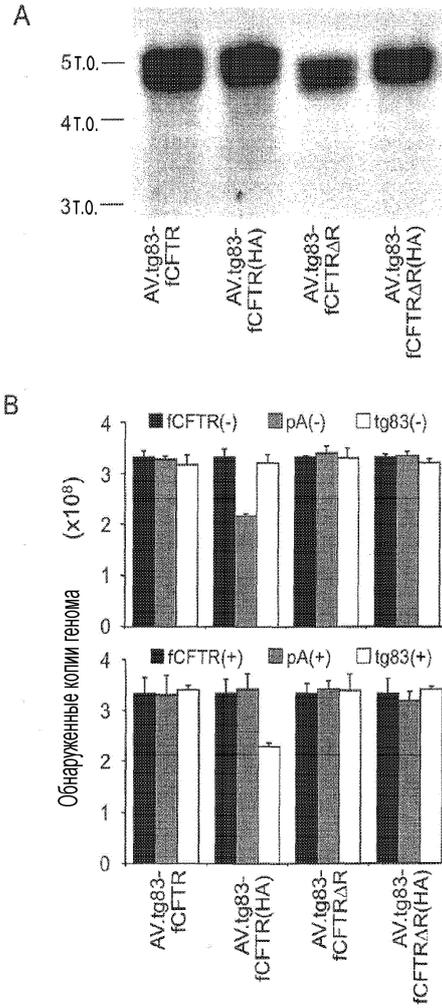
Фиг. 1



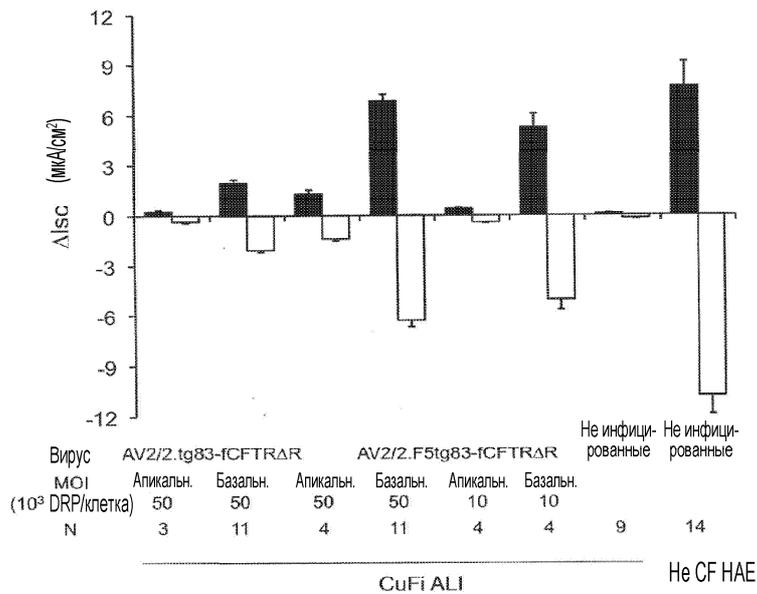
Фиг. 2



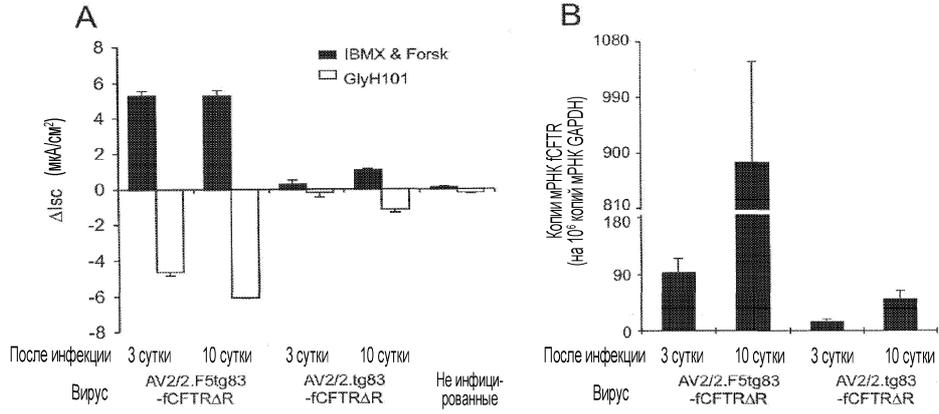
Фиг. 3



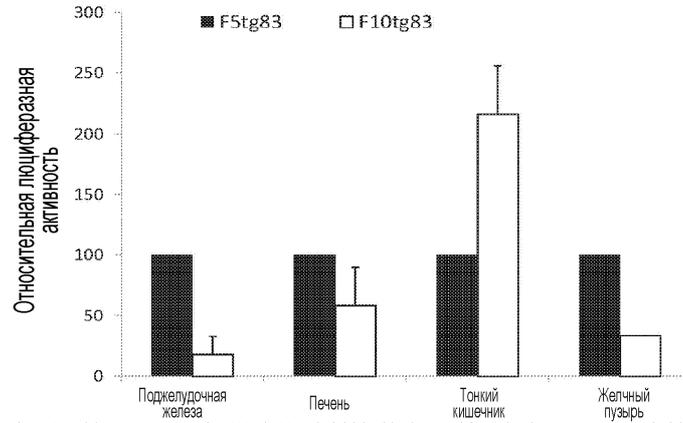
Фиг. 4



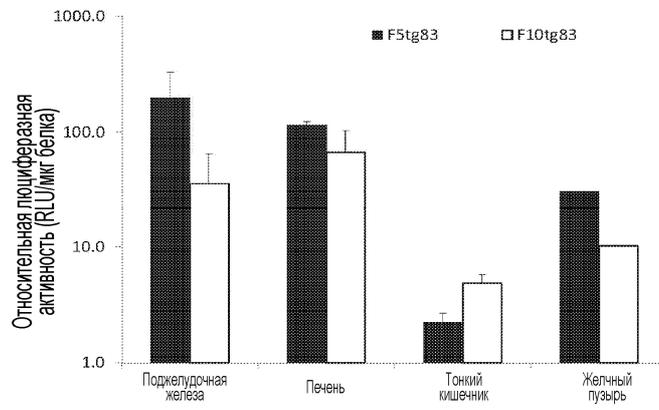
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7А



Фиг. 7В

Идентификатор	Связывающий фактор	Последовательность (поисковый паттерн)
HS\$A11COL_02		GTGGTTAGC
MOUSE\$IAP_01		GTGGT
MOUSE\$IAP_03	EBP-80	GTGGT
EBV\$IR4_04	R	CACCAC
EBV\$IR4_05	R	CACCAC
HSSPR264_01	c-Myb	GGTGAG
HSSAPOA2_06		TCACC
TDNA\$NOS_01	ASF-1, OBF3.1, TGA1a, TGA1b	TGAGC
DROME\$UBX_08	Zeste	TGAGCG
DROME\$E74_07	Zeste	TGAGCG
DROME\$E74_08	Zeste	TGAGCG
DROME\$WHLO_04	Zeste	TGAGCG
DROME\$ZESTE_02	Zeste	TGAGCG
DROME\$UBX_06	Zeste	CGCTCA
DROME\$EVE_04	Фактор GAGA	CGCTC
DROME\$EVE_08	Фактор GAGA	CGCTC
DROME\$EVE_10	Фактор GAGA	CGCTC
ASSPAX4_29	Pax-4a	CATTCCCAGACG
CHICK\$BAG_04		TCTGGGCA
CHICK\$BAG_09	CTF	TCTGGGCA
SV\$SV40_37		CTGGG
RAT\$STAT_06	NRF-1	CATGCGCAG
SV\$SV40_63	T-Ag	TGGGC
CHICK\$BAG_03		GGGCA
RAT\$NF1_01	LF-A1	GGGCA
HSSCATHD_01	ER- α , Sp1	GGGCA
RAT\$VEGF_01	ER- α , ER- β	GGGCA
MOUSE\$PIDD_01	p53	GGACATGTCT
CHICK\$BAG_03		TGCCC
RAT\$VEGF_02	ER- α , ER- β	TGCCC
RAT\$SPI23_02	C/EBP α	CCCAGAAAT

Фиг. 8А

Идентификатор	Связывающий фактор	Последовательность (поисковый паттерн)
AS\$TGIF_09	TGIF	TGTCT
CHICK\$BAG_04		TCTGGGCA
CHICK\$BAG_09	CTF	TCTGGGCA
SV\$SV40_37		CTGGG
RAT\$STAT_06	NRF-1	CATGCGCAG
SV\$SV40_63	T-Ag	TGGGC
CHICK\$BAG_03		GGGCA
RAT\$NF1_01	LF-A1	GGGCA
HS\$CATHD_01	ER- α , Sp1	GGGCA
RAT\$VEGF_01	ER- α , ER- β	GGGCA
MOUSE\$PIDD_01	p53	GGACATGTCT
CHICK\$BAG_03		TGCCC
RAT\$VEGF_02	ER- α , ER- β	TGCCC
RAT\$SPI23_02	C/EBP α	CCCAGAAAT
AS\$TGIF_09	TGIF	TGTCT
CHICK\$BAG_04		TCTGGGCA
CHICK\$BAG_09	CTF	TCTGGGCA
SV\$SV40_37		CTGGG
RAT\$STAT_06	NRF-1	CATGCGCAG
SV\$SV40_63	T-Ag	TGGGC
CHICK\$BAG_03		GGGCA
RAT\$NF1_01	LF-A1	GGGCA
HS\$CATHD_01	ER- α , Sp1	GGGCA
RAT\$VEGF_01	ER- α , ER- β	GGGCA
MOUSE\$PIDD_01	p53	GGACATGTCT
CHICK\$BAG_03		TGCCC
RAT\$VEGF_02	ER- α , ER- β	TGCCC
RAT\$SPI23_02	C/EBP α	CCCAGAAAT
AS\$TGIF_09	TGIF	TGTCT
CHICK\$BAG_04		TCTGGGCA
CHICK\$BAG_09	CTF	TCTGGGCA
SV\$SV40_37		CTGGG
RAT\$STAT_06	NRF-1	CATGCGCAG
SV\$SV40_63	T-Ag	TGGGC

Фиг. 8B

Идентификатор	Связывающий фактор	Последовательность (поисковый паттерн)
CHICK\$BAG_03		GGGCA
RAT\$NF1_01	LF-A1	GGGCA
HSSCATHD_01	ER- α , Sp1	GGGCA
RAT\$VEGF_01	ER- α , ER- β	GGGCA
CHICK\$BAG_03		TGCCC
RAT\$VEGF_02	ER- α , ER- β	TGCCC
HSSAPAF1_01	p53	CGACAAGCCC
AS\$HOXA3_13	HOXA3	CATGTTGGG
AS\$FTZ_56	Ftz	CCGACA
HSV1\$GD_01	ICP4	CCGAC
AT\$COR15A_01	ANT, CBF1, CBF2, CBF3	CCGAC
AT\$RD29B_01	CBF1	CCGAC
AT\$RD29A_01	CBF1, DREB1 A, DREB2 A	CCGAC
AT\$COR78_01	ANT, CBF1, CBF2, CBF3	CCGAC
AT\$COR15B_01	CBF1, CBF2, CBF3	CCGAC
HSSCGB_03		CGGGCATCCTG
HSSCETP_02	LXR- α , LXR- β , RXR- α	CGGGCA
HSSCYCD1_15	Sp1, Sp2, Sp3, Sp4	GCCCG
CHICK\$BAG_03		GGGCA
RAT\$NF1_01	LF-A1	GGGCA
HSSCATHD_01	ER- α	GGGCA

Фиг. 8С

Идентификатор	Связывающий фактор	Последовательность (поисковый паттерн)
	Sp1	
RAT\$VEGF_01	ER- α , ER- β	GGGCA
CHICK\$BAG_03		TGCCC
RAT\$VEGF_02	ER- α , ER- β	TGCCC
ASPNS\$ABAA_03	abaA	CATTCT
ASPNS\$ABAA_04	abaA	CATTCT
ASPNS\$ABAA_05	abaA	CATTCT
ASPNS\$BRLA_03	abaA	CATTCT
ASPNS\$RODA_05	abaA	CATTCT
ABAA\$CONS_01	abaA	CATTCT
ASPNS\$BRLA_05	abaA	CATTCT
ASPNS\$YA_02	abaA	AGAATG
ISHSF_01	HSF	AGAAN
F\$HSF_01	HSF	AGAAN
SV\$SV40_37		CTGGG
RAT\$IGFBP2_03	Sp1	TGGGCGTGTG
SV\$SV40_63	T-Ag	TGGGC
YSHOP1_01		TGGGCGGCT
RAT\$BMHC_04	NF κ B	TGACGCCCA
MOUSE\$GLUT4_03	Sp1	GGGCGT
HS\$U2SN_04	Sp1	ACGCC
HS\$CD11B_01	Sp1	CGCCC
AS\$PAX4_29	Pax-4a	CATTCCCAGACG
CHICK\$BAG_04		TCTGGGCA
CHICK\$BAG_09	CTF	TCTGGGCA
SV\$SV40_37		CTGGG
RAT\$TAT_06	NRF-1	CATGCGCAG
SV\$SV40_63	T-Ag	TGGGC
CHICK\$BAG_03		GGGCA
RAT\$NF1_01	LF-A1	GGGCA
HS\$CATHD_01	ER- α , Sp1	GGGCA
RAT\$VEGF_01	ER- α , ER- β	GGGCA
MOUSE\$PIDD_01	p53	GGACATGTCT
CHICK\$BAG_03		TGCCC
RAT\$VEGF_02	ER- α , ER- β	TGCCC
RAT\$SPI23_02	C/EBP α	CCCAGAAAT

Фиг. 8D

Идентификатор	Связывающий фактор	Последовательность (поисковый паттерн)
AS\$TGIF_09	TGIF	TGTCT
CHICK\$BAG_04		TCTGGGCA
CHICK\$BAG_09	CTF	TCTGGGCA
SV\$SV40_37		CTGGG
RAT\$STAT_06	NRF-1	CATGCGCAG
SV\$SV40_63	T-Ag	TGGGC
CHICK\$BAG_03		GGGCA
RAT\$NFI_01	LF-A1	GGGCA
H\$CATHD_01	ER- α , Sp1	GGGCA
RAT\$VEGF_01	ER- α , ER- β	GGGCA
MOUSE\$PIDD_01	p53	GGACATGTCT
CHICK\$BAG_03		TGCCC
RAT\$VEGF_02	ER- α , ER- β	TGCCC
RAT\$SPI23_02	C/EBP α	CCCAGAAAT
AS\$TGIF_09	TGIF	TGTCT
CHICK\$BAG_04		TCTGGGCA
CHICK\$BAG_09	CTF	TCTGGGCA
SV\$SV40_37		CTGGG
SV\$SV40_63	T-Ag	TGGGC
CHICK\$BAG_03		GGGCA
RAT\$NFI_01	LF-A1	GGGCA
H\$CATHD_01	ER- α , Sp1	GGGCA
RAT\$VEGF_01	ER- α , ER- β	GGGCA
CHICK\$BAG_03		TGCCC
RAT\$VEGF_02	ER- α , ER- β	TGCCC

Фиг. 8E

Идентификатор	Связывающий фактор	Последовательность (поисковый паттерн)
Y\$MAL61_04	MIG1	AATTG
RAT\$TH_03	ARIX	AATTGA
PSAM\$U7SN_04		ATTGA
HS\$EGFR_15		TCAAT
AS\$TWRKY_01	WRKY3, WRKY4	TTGAC
AS\$WRKY_01	WRKY1, WRKY2	TTGAC
AS\$WRKY_02	WRKY1, WRKY2	TTGAC
AS\$WRKY_03	WRKY1, WRKY2	TTGAC
AS\$WRKY_04	WRKY1, WRKY2	TTGAC
AT\$RLK4_01	WRKY18	TTGAC
AT\$RLK4_02	WRKY18	TTGAC
CAMV\$35SR_01	ASF-1, OBF4, OBF5, SARP, TGA1, TGA1a, TGA1b, TGA2, TGA2.1, TGA2.2, TGA3, TGA6, ZAP1	TGACG
PIG\$UPA_02	CREB	TGACG
PIG\$UPA_03	CREB, CREB β	TGACG
HS\$INS_04	CREB	TGACG
HS\$PL_12		TGACG
HS\$CFOS_11	AP-1, ATF	TGCGTCA
HS\$PK_02		TGCGTCA
HS\$PK_03	AP-1, ATF3, c-Fos, c-Jun, CRE-BP1, CREB, CREB β	TGCGTCA
HS\$VIP_01	c-Fos, c-Jun, CRE-BP1, CREB	CGTCA
BOVIN\$PPTA_01	C/EBP δ , CRE-BP2	TGCGTCA
RAT\$PDYN_01	CREB	TGCGTCA
AS\$PAX2_67	Pax-2.1, Pax- 2.2	AATAAATG C

Фиг. 8F

Идентификатор	Связывающий фактор	Последовательность (поисковый паттерн)
RAT\$GLU_04		TATAT
HS\$HH4_08	HiNF-D, HiNF-M, HiNF-P, TFIID, TMF	TATAT
MOUSE\$SRF_03	SRF (504 AA)	TATAT
RAT\$GLU_04		TATAT
HS\$HH4_08	HiNF-D, HiNF-M, HiNF-P, TFIID, TMF	TATAT
MOUSE\$SRF_03	SRF (504 AA)	TATAT
RAT\$DBH_01	ARIX, c-Fos, c-Jun, CREB, CREM τ	TGCGTCAT TA
PSAM\$U7SN_04		ATTGA
HS\$EGFR_15		TCAAT
AS\$WRKY_01	WRKY3, WRKY4	TTGAC
AS\$WRKY_01	WRKY1, WRKY2	TTGAC
AS\$WRKY_02	WRKY1, WRKY2	TTGAC
AS\$WRKY_03	WRKY1, WRKY2	TTGAC
AS\$WRKY_04	WRKY1, WRKY2	TTGAC
AT\$RLK4_01	WRKY18	TTGAC
AT\$RLK4_02	WRKY18	TTGAC
CAMV\$35SR_01	ASF-1, OBF4, OBF5, SARP, TGA1, TGA1a, TGA1b, TGA2, TGA2.1, TGA2.2, TGA3, TGA6,ZAP1	TGACG
PIG\$UPA_02	CREB	TGACG
PIG\$UPA_03	CREB, CREB β	TGACG
HS\$INS_04	CREB	TGACG
HS\$PL_12		TGACG
HS\$CFOS_11	AP-1, ATF	TGCGTCA
HS\$PK_02		TGCGTCA
HS\$PK_03	AP-1, ATF3,	TGCGTCA

Фиг. 8G

Идентификатор	Связывающий фактор	Последовательность (поисковый паттерн)
	c-Fos, c-Jun, CRE-BP1, CREB, CREB β	
HS\$VIP_01	c-Fos, c-Jun, CRE-BP1, CREB	CGTCA
BOVIN\$PPTA_01	C/EBP δ , CRE-BP2	TGCGTCA
RAT\$PDYN_01	CREB	TGCGTCA
RAT\$DBH_01	ARIX, c-Fos, c-Jun, CREB, CREMtau	TGCGTCAT TA
PSAM\$U7SN_04		ATTGA
HS\$EGFR_15		TCAAT
AS\$TWRKY_01	WRKY3, WRKY4	TTGAC
AS\$WRKY_01	WRKY1, WRKY2	TTGAC
AS\$WRKY_02	WRKY1, WRKY2	TTGAC
AS\$WRKY_03	WRKY1, WRKY2	TTGAC
AS\$WRKY_04	WRKY1, WRKY2	TTGAC
AT\$RLK4_01	WRKY18	TTGAC
AT\$RLK4_02	WRKY18	TTGAC
CAMV\$35SR_01	ASF-1, OBF4, OBF5, SARP, TGA1, TGA1a, TGA1b, TGA2, TGA2.1, TGA2.2, TGA3, TGA6, ZAP1	TGACG
PIG\$UPA_02	CREB	TGACG
PIG\$UPA_03	CREB, CREB β	TGACG
HS\$INS_04	CREB	TGACG
HS\$PL_12		TGACG
HBV\$HBVE_27	CRE-BP1, CREB, pX	TGACGCAA
HS\$CFOS_11	AP-1, ATF	TGCGTCA
HS\$PK_02		TGCGTCA
HS\$PK_03	AP-1, ATF3,	TGCGTCA

Фиг. 8H

Идентификатор	Связывающий фактор	Последовательность (поисковый паттерн)
	c-Fos, c-Jun, CRE-BP1, CREB, CREB β	
HSSVIP_01	c-Fos, c-Jun CRE-BP1, CREB,	CGTCA
BOVIN\$PPTA_01	C/EBP δ , CRE-BP2	TGCGTCA
RAT\$PDYN_01	CREB	TGCGTCA
ASSNCX_33	Ncx	ACGTAAAT TG
HS\$EGFR_14		CAAAT
MAIZE\$PMS1_01		CAAAT
HS\$IGH_04		ATTTG
YSMAL61_04	MIG1	AATTG
RAT\$TH_03	ARIX	AATTGA
PSAM\$U7SN_04		ATTGA
HS\$EGFR_15		TCAAT
AS\$WRKY_01	WRKY3, WRKY4	TTGAC
AS\$WRKY_01	WRKY1, WRKY2	TTGAC
AS\$WRKY_02	WRKY1, WRKY2	TTGAC
AS\$WRKY_03	WRKY1, WRKY2	TTGAC
AS\$WRKY_04	WRKY1, WRKY2	TTGAC
AT\$RLK4_01	WRKY18	TTGAC
AT\$RLK4_02	WRKY18	TTGAC
CAMV\$35SR_01	ASF-1, OBF4, OBF5, SARP, TGA1, TGA1a, TGA1b, TGA2, TGA2.1, TGA2.2, TGA3, TGA6, ZAP1	TGACG
PIG\$UPA_02	CREB	TGACG
PIG\$UPA_03	CREB, CREB β	TGACG
HS\$INS_04	CREB	TGACG
HS\$PL_12		TGACG
HBV\$HBVE_27	CRE-BP1,	TGACGCAA

Фиг. 8I

Идентификатор	Связывающий фактор	Последовательность (поисковый паттерн)
	CREB, pX	
HSSCFOS_11	AP-1, ATF	TGCGTCA
HSSPK_02		TGCGTCA
HSSPK_03	AP-1, ATF3, c-Fos, c-Jun, CRE-BP1, CREB, CREB β	TGCGTCA
HSSVIP_01	c-Fos, c-Jun, CRE-BP1, CREB	CGTCA
BOVIN\$PPTA_01	C/EBP δ , CRE-BP2	TGCGTCA
RAT\$PDYN_01	CREB	TGCGTCA
HSEGFR_14		CAAAT
MAIZE\$PMS1_01		CAAAT
DROME\$SNA_12	Twf	CAAATG
HSSIGH_04		ATTTG
XENLA\$AC_05	EMF1, MyoD	CATTTG
MOUSE\$ACRG_01	MyoD	CATTTG
HSSIRF1_02	IPCS-BF	AAATGAC GGC
HSSGMCSF_03	YY1	CATTT
MOUSE\$IL4_01	NF-CLE0a, NF-CLE0b	TCATTT
HSSUPA_05	UEF-1	CATGACAG C
HSSFN_05	PEBP2	ATGACCGC AA
HSSUPA_06	Pbx-1a, Pbx-1b, Pbx-2, PKNOX1, PKNOX2, UEF-3	TGACAG
ASSMEIS1_01	Meis-1a, Meis-1b	TGACAG
ASSMEIS1_03	Meis-1a, Meis-1b	TGACAG
ASSMEIS1_04	Meis-1a, Meis-1b	TGACAG
ASSMEIS1_05	Meis-1a, Meis-1b	TGACAG
ASSMEIS1_06	Meis-1a, Meis-1b	TGACAG
ASSMEIS1_07	Meis-1a, Meis-1b	TGACAG
ASSMEIS1_08	Meis-1a,	TGACAG

Фиг. 8J

Идентификатор	Связывающий фактор	Последовательность (поисковый паттерн)
	Meis-1b	
AS\$MEIS1_14	Meis-1a, Meis-1b	TGACAG
AS\$MEIS1_19	Meis-1a, Meis-1b	TGACAG
AS\$MEIS1AHOXA 9_01	HOXA9, Meis-1a	TGACAG
AS\$MEIS1AHOXA 9_02	HOXA9, Meis-1a	TGACAG
AS\$MEIS1AHOXA 9_03	HOXA9, Meis-1a	TGACAG
AS\$MEIS1AHOXA 9_04	HOXA9, Meis-1a	TGACAG
AS\$MEIS1AHOXA 9_05	HOXA9, Meis-1a	TGACAG
AS\$MEIS1AHOXA 9_06	HOXA9, Meis-1a	TGACAG
AS\$MEIS1AHOXA 9_09	HOXA9, Meis-1a	TGACAG
AS\$MEIS1AHOXA 9_10	HOXA9, Meis-1a	TGACAG
AS\$MEIS1AHOXA 9_13	HOXA9, Meis-1a	TGACAG
AS\$MEIS1BHOXA 9_01	HOXA9, Meis-1b	TGACAG
AS\$MEIS1BHOXA 9_02	HOXA9, Meis-1b	TGACAG
AS\$MEIS1BHOXA 9_03	HOXA9, Meis-1b	TGACAG
AS\$MEIS1BHOXA 9_04	HOXA9, Meis-1b	TGACAG
AS\$MEIS1BHOXA 9_05	HOXA9, Meis-1b	TGACAG
AS\$MEIS1BHOXA 9_06	HOXA9, Meis-1b	TGACAG
AS\$MEIS1BHOXA 9_07	HOXA9, Meis-1b	TGACAG
POT\$PR10a_01	PBF-1, PBF-2 (p24)	TGACA
AS\$TGIF_01	TGIF	TGTCA
AS\$TGIF_02	TGIF	TGTCA
AS\$TGIF_03	TGIF	TGTCA
AS\$TGIF_04	TGIF	TGTCA
AS\$TGIF_05	TGIF	TGTCA
AS\$TGIF_06	TGIF	TGTCA
AS\$TGIF_07	TGIF	TGTCA
AS\$TGIF_08	TGIF	TGTCA

Фиг. 8K

Идентификатор	Связывающий фактор	Последовательность (поисковый паттерн)
AS\$TGIF_10	TGIF	TGTCA
AS\$TGIF_11	TGIF	TGTCA
AS\$TGIF_12	TGIF	TGTCA
AS\$TGIF_13	TGIF	TGTCA
AS\$TGIF_14	TGIF	TGTCA
AS\$TGIF_15	TGIF	TGTCA
H\$SD1A_01	Meis-2a, Meis-2b, Meis-2c, Meis-2d, TGIF	CTGTCA
AS\$MEIS1_11	Meis-1a, Meis-1b	CTGTCA
AS\$MEIS1_12	Meis-1a, Meis-1b	CTGTCA
POT\$PR10a_01	PBF-1, PBF-2 (p24)	TGTCA
H\$SGG_12	NF-E	CTGTC
DROME\$EVE_10	Фактор GAGA	CTGTC
MOUSE\$M2EAK_03	NF-Y	CAGCA
MOUSE\$THY1_06		CAGCAA
RAV0\$RAV0_01	C/EBP α	GCAAG
AMV\$AMV_02	C/EBP α	CTTGC
XENLA\$ACY_01	SRF	AAGAT
XENLA\$ACY_01	SRF	ATCTT
H\$GG_26	GATA-1	AGATTG
MOUSE\$BMG_04	GATA-1	AATCT
PSAM\$U7SN_04		ATTGA
H\$SEGFR_15		TCAAT
AS\$TWRKY_01	WRKY3, WRKY4	TTGAC
AS\$WRKY_01	WRKY1, WRKY2	TTGAC
AS\$WRKY_02	WRKY1, WRKY2	TTGAC
AS\$WRKY_03	WRKY1, WRKY2	TTGAC
AS\$WRKY_04	WRKY1, WRKY2	TTGAC
AT\$RLK4_01	WRKY18	TTGAC
AT\$RLK4_02	WRKY18	TTGAC
CAMV\$35SR_01	ASF-1, OBF4, OBF5, SARP, TGA1, TGA1a, TGA1 b, TGA2,	TGACG

Фиг. 8L

Идентификатор	Связывающий фактор	Последовательность (поисковый паттерн)
	TGA2.1, TGA2.2, TGA3, TGA6, ZAP1	
PIG\$UPA_02	CREB	TGACG
PIG\$UPA_03	CREB, CREBbeta	TGACG
HS\$INS_04	CREB	TGACG
HS\$PL_12		TGACG
HBV\$HBVE_27	CRE-BP1, CREB, pX	TGACGCAA
HS\$CFOS_11	AP-1, ATF	TGCGTCA
HS\$PK_02		TGCGTCA
HS\$PK_03	AP-1, ATF3, c-Fos, c-Jun, CRE-BP1, CREB, CREB β	TGCGTCA
HS\$VIP_01	c-Fos, c-Jun, CRE-BP1, CREB	CGTCA
BOVIN\$PPTA_01	C/EBP δ , CRE-BP2	TGCGTCA
RAT\$PDYN_01	CREB	TGCGTCA
ASS\$NCX_33	Ncx	ACGTAAAT TG
HS\$EGFR_14		CAAAT
MAIZE\$PMS1_01		CAAAT
HS\$IGH_04		ATTTG
YSMAL61_04	MIG1	AATTG
RAT\$TH_03	ARIX	AATTGA
PSAM\$U7SN_04		ATTGA
HS\$EGFR_15		TCAAT
TDNA\$NOS_01	ASF-1, OBF3.1, TGA1a, TGA1b	TGAGC
DROME\$UBX_08	Zeste	TGAGCG
DROME\$E74_07	Zeste	TGAGCG
DROME\$E74_08	Zeste	TGAGCG
DROME\$WHLO_04	Zeste	TGAGCG
DROME\$ZESTE_02	Zeste	TGAGCG
DROME\$UBX_06	Zeste	CGCTCA
DROME\$EVE_04	Фактор GAGA	CGCTC
DROME\$EVE_08	Фактор GAGA	CGCTC
DROME\$EVE_10	Фактор GAGA	CGCTC

Фиг. 8M

Идентификатор	Связывающий фактор	Последовательность (поисковый паттерн)
MOUSE\$MT1_06	MTF-1	TGCGCTC
HS\$EGFR_14		CAAAT
MAIZE\$PMS1_01		CAAAT
HS\$IGH_04		ATTTG
Y\$MAL61_04	MIG1	AATTG
RAT\$TH_03	ARIX	AATTGA
PSAM\$U7\$N_04		ATTGA
HS\$EGFR_15		TCAAT
AS\$TWRKY_01	WRKY3, WRKY4	TTGAC
AS\$WRKY_01	WRKY1, WRKY2	TTGAC
AS\$WRKY_02	WRKY1, WRKY2	TTGAC
AS\$WRKY_03	WRKY1, WRKY2	TTGAC
AS\$WRKY_04	WRKY1, WRKY2	TTGAC
AT\$RLK4_01	WRKY18	TTGAC
AT\$RLK4_02	WRKY18	TTGAC
CAMV\$35SR_01	ASF-1, OBF4, OBF5, SARP, TGA1, TGA1a, TGA1b, TGA2, TGA2.1, TGA2.2, TGA3, TGA6, ZAPI	TGACG
PIG\$UPA_02	CREB	TGACG
PIG\$UPA_03	CREB, CREB β	TGACG
HS\$INS_04	CREB	TGACG
HS\$PL_12		TGACG
HBV\$HBVE_27	CRE-BP1, CREB, P α	TGACGCAA
HS\$CFOS_11	AP-1, ATF	TGCGTCA
HS\$PK_02		TGCGTCA
HS\$PK_03	AP-1, ATF3, c-Fos, c-Jun, CRE-BP1, CREB, CREB β	TGCGTCA
HS\$VIP_01	c-Fos, c-Jun, CRE-BP1, CREB	CGTCA

Фиг. 8N

Идентификатор	Связывающий фактор	Последовательность (поисковый паттерн)
BOVINS\$PPTA_01	C/EBP δ , CRE-BP2	TGCGTCA
RAT\$PDYN_01	CREB	TGCGTCA
HS\$EGFR_14		CAAAT
MAIZES\$PMS1_01		CAAAT
HS\$IGH_04		ATTTG
ASS\$ATHB1_26	ATHB-1	CAATTAAT TG
ASS\$NKX61_02	Nkx6-1	TTAATTT
ASS\$ATHB1_26	ATHB-1	CAATTAAT TG
YSSUC2_02	MIG1	AATTA
RAT\$DBH_01	ARIX, c-Fos, c-Jun, CREB, CREMtau	AATTA
DROME\$EN_01	En, Eve, Ftz, Prd, Zen-1, Zen-2	TCAATCAA TT
DROME\$EN_01	En, Eve, Ftz, Prd, Zen-1, Zen-2	TCAATTAA AT
DROME\$EN_04	En, POU2F2 (Oct-2.1)	TCAATTAA AT
ASS\$FTZ_47	Ftz, Prd, Zen-1, Zen-2	TCAATTAA AT
AS\$EN_01	En	TCAATTAA AT
EN\$CONS	Abd-A, Abd-B, BarH1, Cfla, Cut, Ems, En, Lab, PDM-1, Zfh-1, Zfh-2	TCAATTAA AT
YSMEL1_02	MIG1	ATTAA
CHICK\$MGF_01	Gbx2	ATTAA
DROME\$EN_05	En	TCAATTAA A
DROME\$ADH_29		CTCAATTA AT
CHICK\$MGF_02	Gbx2	TTAAT
UBX\$CONS_02	Ubx	TTAATKG
MOUSE\$HOXC8_04		TTAATTG
CHICK\$MGF_02	Gbx2	TTAAT
ASS\$NKX61_01	Nkx6-1	TTAATTG
ASS\$NKX61_02	Nkx6-1	TTAATTG
ASS\$NKX61_03	Nkx6-1	TTAATTG

Фиг. 80

Идентификатор	Связывающий фактор	Последовательность (поисковый паттерн)
AS\$NKX61_05	IPF1, Nkx6-1	TTAATTG
AS\$NKX61_06	Nkx6-1	TTAATTG
AS\$NKX61_08	Nkx6-1	TTAATTG
AS\$NKX61_09	Nkx6-1	TTAATTG
AS\$NKX61_10	Nkx6-1	TTAATTG
YSMEL1_02	MIG1	ATTAA
BOVIN\$RHO_02	Crx	CAATTAA
CHICK\$MGF_01	Gbx2	ATTAA
YSSUC2_02	MIG1	AATTA
RAT\$DBH_01	ARIX, c-Fos, c-Jun, CREB, CREM _{tau}	AATTA
YSMAL61_04	MIG1	AATTG
RAT\$TH_03	ARIX	AATTGA
PSAM\$U7SN_04		ATTGA
HS\$EGFR_15		TCAAT
AS\$TWRKY_01	WRKY3, WRKY4	TTGAC
AS\$WRKY_01	WRKY1, WRKY2	TTGAC
AS\$WRKY_02	WRKY1, WRKY2	TTGAC
AS\$WRKY_03	WRKY1, WRKY2	TTGAC
AS\$WRKY_04	WRKY1, WRKY2	TTGAC
AT\$RLK4_01	WRKY18	TTGAC
AT\$RLK4_02	WRKY18	TTGAC

Фиг. 8P

Идентификатор	Связывающий фактор	Последовательность (поисковый паттерн)
HSSA11COL_02		GTGGTTAGC
MOUSE\$IAP_01		GTGGT
MOUSE\$IAP_03	EBP-80	GTGGT
EBV\$IR4_04	R	CACCAC
EBV\$IR4_05	R	CACCAC
HSSPR264_01	c-Myb	GGTGAG
HSAPOA2_06		TCACC
TDNASNOS_01	ASF-1, OBF3.1, TGA1a, TGA1b	TGAGC
DROME\$SUBX_08	Zeste	TGAGCG
DROME\$E74_07	Zeste	TGAGCG
DROME\$E74_08	Zeste	TGAGCG
DROME\$WHLO_04	Zeste	TGAGCG
DROME\$ZESTE_02	Zeste	TGAGCG
DROME\$SUBX_06	Zeste	CGCTCA
DROME\$EVE_04	Фактор GAGA	CGCTC
DROME\$EVE_08	Фактор GAGA	CGCTC
DROME\$EVE_10	Фактор GAGA	CGCTC
AS\$PAX4_29	Pax-4a	CATTCCCAGACG
CHICK\$BAG_04		TCTGGGCA
CHICK\$BAG_09	CTF	TCTGGGCA
SV\$SV40_37		CTGGG
RAT\$STAT_06	NRF-1	CATGCGCAG
SV\$SV40_63	T-Ag	TGGGC
CHICK\$BAG_03		GGGCA
RAT\$NF1_01	LF-A1	GGGCA
HSCATHD_01	ER- α , Sp1	GGGCA
RAT\$VEGF_01	ER- α , ER- β	GGGCA
MOUSE\$PIDD_01	p53	GGACATGTCT
CHICK\$BAG_03		TGCC
RAT\$VEGF_02	ER- α , ER- β	TGCC
RAT\$SPI23_02	C/EBP α	CCCAGAAAT
AS\$TGIF_09	TGIF	TGTCT

Фиг. 8Q

Идентификатор	Связывающий фактор	Последовательность (поисковый паттерн)
CHICK\$BAG_04		TCTGGGCA
CHICK\$BAG_09	CTF	TCTGGGCA
SV\$SV40_37		CTGGG
RAT\$STAT_06	NRF-1	CATGCGCAG
SV\$SV40_63	T-Ag	TGGGC
CHICK\$BAG_03		GGGCA
RAT\$NF1_01	LF-A1	GGGCA
HS\$CATHD_01	ER- α , Sp1	GGGCA
RAT\$VEGF_01	ER- α , ER- β	GGGCA
MOUSE\$PIDD_01	p53	GGACATGTCT
CHICK\$BAG_03		TGCCC
RAT\$VEGF_02	ER- α , ER- β	TGCCC
RAT\$SPI23_02	C/EBP α	CCCAGAAAT
AS\$TGIF_09	TGIF	TGTCT
CHICK\$BAG_04		TCTGGGCA
CHICK\$BAG_09	CTF	TCTGGGCA
SV\$SV40_37		CTGGG
RAT\$STAT_06	NRF-1	CATGCGCAG
SV\$SV40_63	T-Ag	TGGGC
CHICK\$BAG_03		GGGCA
RAT\$NF1_01	LF-A1	GGGCA
HS\$CATHD_01	ER- α , Sp1	GGGCA
RAT\$VEGF_01	ER- α , ER- β	GGGCA
MOUSE\$PIDD_01	p53	GGACATGTCT
CHICK\$BAG_03		TGCCC
RAT\$VEGF_02	ER- α , ER- β	TGCCC
RAT\$SPI23_02	C/EBP α	CCCAGAAAT
AS\$TGIF_09	TGIF	TGTCT
CHICK\$BAG_04		TCTGGGCA
CHICK\$BAG_09	CTF	TCTGGGCA
SV\$SV40_37		CTGGG
RAT\$STAT_06	NRF-1	CATGCGCAG
SV\$SV40_63	T-Ag	TGGGC
CHICK\$BAG_03		GGGCA
RAT\$NF1_01	LF-A1	GGGCA
HS\$CATHD_01	ER- α , Sp1	GGGCA
RAT\$VEGF_01	ER- α , ER- β	GGGCA

Фиг. 8R

Идентификатор	Связывающий фактор	Последовательность (поисковый паттерн)
CHICK\$BAG_03		TGCCC
RAT\$VEGF_02	ER- α , ER- β	TGCCC
HS\$APAF1_01	p53	CGACAAGCCC
AS\$HOXA3_13	HOXA3	CATGTTGGG
AS\$FTZ_56	Ftz	CCGACA
HSV1\$GD_01	ICP4	CCGAC
AT\$COR15A_01	ANT, CBF1, CBF2, CBF3	CCGAC
AT\$RD29B_01	CBF1	CCGAC
AT\$RD29A_01	CBF1, DREB1A, DREB2A	CCGAC
AT\$COR78_01	ANT, CBF1, CBF2, CBF3	CCGAC
AT\$COR15B_01	CBF1, CBF2, CBF3	CCGAC
HS\$CGB_03		CGGGCATCCT G
HS\$CETP_02	LXR- α , LXR- β , RXR- α ,	CGGGCA
HS\$CYCD1_15	Sp1, Sp2, Sp3, Sp4	GCCCG
CHICK\$BAG_03		GGGCA
RAT\$NF1_01	LF-A1	GGGCA
HS\$CATHD_01	ER- α , Sp1	GGGCA
RAT\$VEGF_01	ER- α , ER- β	GGGCA
CHICK\$BAG_03		TGCCC
RAT\$VEGF_02	ER- α , ER- β	TGCCC
ASPNS\$ABAA_03	abaA	CATTCT
ASPNS\$ABAA_04	abaA	CATTCT
ASPNS\$ABAA_05	abaA	CATTCT
ASPNS\$BRLA_03	abaA	CATTCT
ASPNS\$RODA_05	abaA	CATTCT
ABAA\$CONS_01	abaA	CATTCY
ASPNS\$BRLA_05	abaA	CATTCT

Фиг. 8S

Идентификатор	Связывающий фактор	Последовательность (поисковый паттерн)
ASPN\$YA_02	abaA	AGAATG
I\$HSF_01	HSF	AGAAN
F\$HSF_01	HSF	AGAAN
SV\$SV40_37		CTGGG
RAT\$IGFBP2_03	Sp1	TGGGCGTGTG
SV\$SV40_63	T-Ag	TGGGC
Y\$HOP1_01		TGGGCGGCT
RAT\$BMHC_04	NFe	TGACGCCCA
MOUSE\$GLUT4_03	Sp1	GGGCGT
HS\$U2SN_04	Sp1	ACGCC
HS\$CD11B_01	Sp1	CGCC
AS\$PAX4_29	Pax-4a	CATTCCCAGACG
CHICK\$BAG_04		TCTGGGCA
CHICK\$BAG_09	CTF	TCTGGGCA
SV\$SV40_37		CTGGG
RAT\$TAT_06	NRF-1	CATGCGCAG
SV\$SV40_63	T-Ag	TGGGC
CHICK\$BAG_03		GGGCA
RAT\$NF1_01	LF-A1	GGGCA
HS\$CATHD_01	ER- α , Sp1	GGGCA
RAT\$VEGF_01	ER- α , ER- β	GGGCA
MOUSE\$PIDD_01	p53	GGACATGTCT
CHICK\$BAG_03		TGCCC
RAT\$VEGF_02	ER- α , ER- β	TGCCC
RAT\$SPI23_02	C/EBP α	CCCAGAAAT
AS\$TGIF_09	TGIF	TGTCT
CHICK\$BAG_04		TCTGGGCA
CHICK\$BAG_09	CTF	TCTGGGCA
SV\$SV40_37		CTGGG
RAT\$TAT_06	NRF-1	CATGCGCAG
SV\$SV40_63	T-Ag	TGGGC
CHICK\$BAG_03		GGGCA
RAT\$NF1_01	LF-A1	GGGCA
HS\$CATHD_01	ER-alpha, Sp1	GGGCA
RAT\$VEGF_01	ER- α , ER- β	GGGCA
MOUSE\$PIDD_01	p53	GGACATGTCT
CHICK\$BAG_03		TGCCC
RAT\$VEGF_02	ER- α , ER- β	TGCCC

Фиг. 8Т

Идентификатор	Связывающий фактор	Последовательность (поисковый паттерн)
RAT\$SPI23_02	C/EBP α	CCCAGAAAT
AS\$TGIF_09	TGIF	TGICT
CHICK\$BAG_04		TCTGGGCA
CHICK\$BAG_09	CTF	TCTGGGCA
SV\$SV40_37		CTGGG
SV\$SV40_63	T-Ag	TGGGC
CHICK\$BAG_03		GGGCA
RAT\$NF1_01	LF-A1	GGGCA
HS\$CATHD_01	ER- α , Sp1	GGGCA
RAT\$VEGF_01	ER- α , ER- β	GGGCA
CHICK\$BAG_03		TGCC
RAT\$VEGF_02	ER- α , ER- β	TGCC
AS\$STAT5A_44	STAT5A	TTCICGACA
ISHSF_01	HSF	AGAAN
F\$HSF_01	HSF	AGAAN
HS\$TERT_01	c-Myc	CACCGT
WHEAT\$H4_01	ssDBP-1, ssDBP-2	CCACGTCACCG
CREB\$CONS_02	CREB, CREB β , δ CRE B	GNTGACGY
AS\$BZIP911_27	bZIP911	GGTGACGTGT AC
AS\$BZIP911_28	bZIP911	GGTGACGTGT AC
AS\$BZIP911_30	bZIP911	GGTGACGTGT AC
HS\$APOA2_06		TCACC
AD\$MLP_10	USF	CACGTGACC
AD\$E4_02	E4F1	GTGACGT
AD\$E4_03	CRE-BP1, E4F1	GTGACGT
AD\$E4_05	E4F1	GTGACGT
AD\$SE1A_14	ATF	GTGACGT
AD\$SE1A_16	ATF	GTGACGT
AD\$SE1A_21	ATF	GTGACGT
HS\$M1B7_03		GTGACG
HS\$P53_03	Pax-2, Pax-5, Pax-8	GTGAC
HS\$MMP1_06		GTCAC

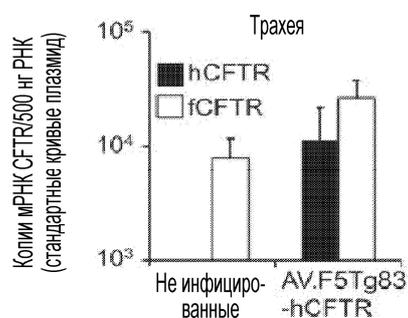
Фиг. 8U

Идентификатор	Связывающий фактор	Последовательность (поисковый паттерн)
CAMV\$35SR_01	ASF-1, OBF4, OBF5, SARP, TGA1, TGA1a, TGA1b, TGA2, TGA2.1, TGA2.2, TGA3, TGA6, ZAP1	TGACG
HS\$GHA_03	GR, GR- α , GR- β	TGACGT
PIG\$UPA_02	CREB	TGACG
PIG\$UPA_03	CREB, CREB β	TGACG
HS\$VIP_04	ATF	TGACGT
CAMV\$35SR_03	HBP-1, HBP-1a, HBP- 1a(1), HBP- 1a(c14), HBP-1b, HBP- 1b(c1)	TGACGT
HS\$INS_04	CREB	TGACG
RAT\$TH2A_01		TGACGT
AT\$DBP_01	GBF1, HBP-1a, HBP-1b, OBF3.1, OBF3.2, OBF4, OBF5, TGA1, TGA3, TGA6	TGACGT
PEA\$LEGA_01	HBP-1a, HBP-1b	TGACGT
HS\$PL_12		TGACG
HT1\$HTLVI_20	TAF-I, TAF-II, Tax	TGACGT

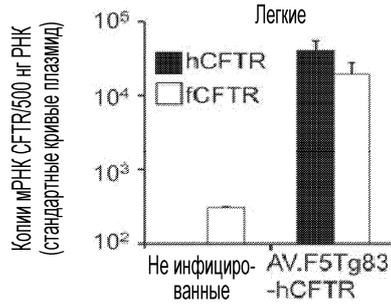
Фиг. 8V

Идентификатор	Связывающий фактор	Последовательность (поисковый паттерн)
BZIP910\$CONS_01	bZIP910	TGACGTG
BZIP910\$CONS_02	bZIP910	TGACGT
ADSE4_16	ATF, atf1, ATF3, c-Jun, CRE-BP1, CREB, δ CREB, EivF, TREB-1	ACGTCA
RAT\$TH_02	ATF	ACGTCA
HSS\$VIP_01	c-Fos, c-Jun, CRE-BP1, CREB	CGTCA
TDNA\$NOS_02	HBP-1, HBP-1a, HBP-1b	ACGTCA
RAT\$TH2B_04		ACGTCA
RICE\$NR1_01	HBP-1a, HBP-1b	ACGTCA
Y\$LPD1_02	ATF	ACGTCA
HSS\$ENO1_01	HIF-1	GACGTG
AT\$GST6_02	OBF4	GACGTG
RICE\$EM_01	OSBZ8, TRAB1	ACGTG
RICE\$EM_02	OSBZ8	ACGTG
HS\$ET1_03	HIF-1	GCACGT
AS\$mEMBP_15	EmBP-1a	CACGT
MOUSE\$MT1_01	Sp1	TGCAC
MOUSE\$MT1_01	Sp1	TGCAC
RAT\$CYTOP_04	AhR, Arnt	CACGC
DAUCE\$DC3_04	DPBF-1, DPBF-2	CACGCG
AS\$AHRARNT_50	AhR, Arnt	GCGTG
AS\$DSC1_01	DSC1	ACGCGT
Y\$CDC9_02	DSC1	ACGCGT
Y\$POL1_01	MCBF	ACGCGT

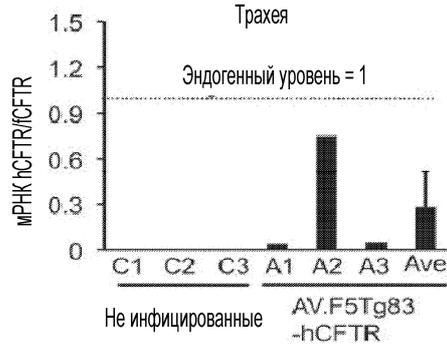
Фиг. 8W



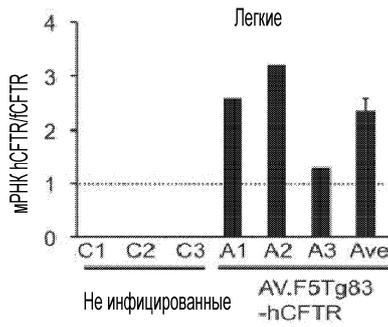
Фиг. 9A



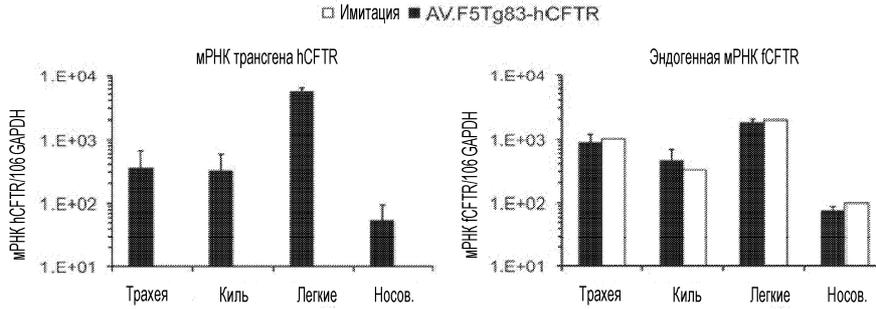
Фиг. 9B



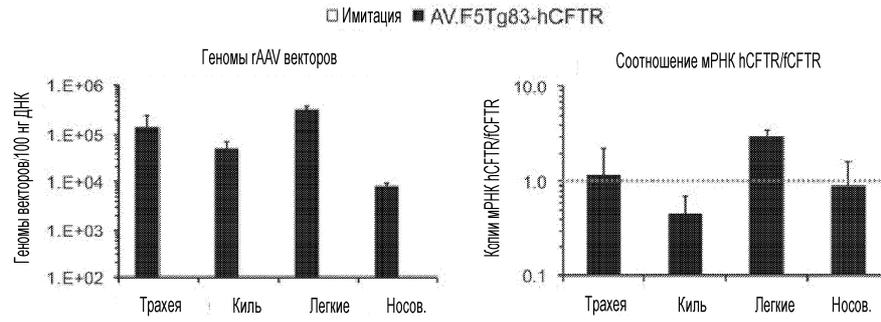
Фиг. 9C



Фиг. 9D



Фиг. 10A, B



Фиг. 10С, D

