

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490762 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.07.03

(51) Int. Cl. C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.10.18

(54) КОНТРОЛИРУЕМАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

(31) 63/256,831

(72) Изобретатель:

(32) 2021.10.18

Чжао Юй, Бураков Дарья, Чэнь Ган
(US)

(33) US

(86) PCT/US2022/078271

(74) Представитель:

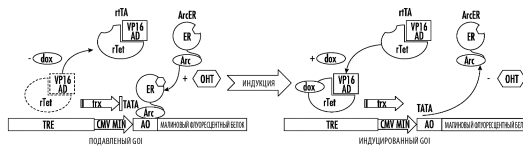
(87) WO 2023/069929 2023.04.27

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(57) В изобретении предложены композиции и способы транскрипции полинуклеотидных последовательностей, кодирующих полипептиды в клетках. В данном изобретении предложены клетки и способы полезные для контроля экспрессии полипептидов для разных целей.



202490762

A1

A1

202490762

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-581078EA/071

КОНТРОЛИРУЕМАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

Данная заявка испрашивает приоритет по отношению к заявке США с серийным номером 63/256831, поданной 18 октября 2021 г., которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0001] Данные изобретения, описанные в данном документе, предлагают, среди прочего, клетки, клеточные культуры, полинуклеотидные и полипептидные конструкции, системы и способы контроля транскрипции одной или более представляющих интерес полинуклеотидных последовательностей. Данные изобретения, описанные в данном документе, дополнительно предлагают стабильные клеточные линии, в которых транскрипцию по меньшей мере одной полинуклеотидной (в частности, полидезоксирибонуклеотидной) последовательности, представляющей интерес, можно жестко контролировать, чтобы контролировать экспрессию полипептида. Когда РНК не транскрибируется с ДНК, полипептид не может транслироваться с РНК, что позволяет контролировать экспрессию белка путем контроля транскрипции. ССЫЛКА НА ЭЛЕКТРОННЫЙ ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Данная заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде в формате XML и настоящим включенный в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Указанная копия XML, созданная 5 октября 2022 года, называется «135975-66502.xml» и имеет размер 98.737 байт. Перечень последовательностей, содержащийся в этом файле XML, является частью описания и включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Различные способы контролируемой транскрипции представляющей интерес полинуклеотидной последовательности в клетке известны в данной области техники и описаны в патенте США № 9469856. Например, No *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:3346-3351 (1996) описывают контролируемую систему экспрессии генов, использующую химерный трансактиватор, состоящий из ядерного рецептора эрдизона, слитого с доменом трансактивации VP16 вируса простого герпеса. Gossen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-5551 (1992) описывает единую систему контроля транскрипции представляющей интерес полинуклеотидной последовательности на основе химерного белка, состоящего из белка-репрессора тетрациклина, слитого с доменом трансактивации VP16. Gossen *et al.*, *Science* 268: 1766-69 (1995) описывает слияние домена активации VP16 с мутированным «обратным» репрессором Tet, для индукции которого требуется тетрациклин. Экспрессия генов, индуцируемая тетрациклином, обсуждается в работе Ortiz and Johnson, *Molec. Biochem. Parasitology* 128: 43-40 (2003). Другие описанные единые системы управления цитируются в патентах США № 9469856, включая Sadowski *et al.*, *Nature* 335:563-564 (1988); Brent *et al.*, *Cell* 40:729-736 (1985); Labow *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*

10:3342-3356 (1990), например.

[0004] Проблемы, возникающие из-за негерметичной транскрипции, связанной с зависимостью исключительно от минимальных промоторов, привели к созданию систем, использующих слияние стероидсвязывающих доменов глюкокортикоидных или эстрогеновых ядерных рецепторов. См., например, Mattioni *et al.*, *Methods Cell Biol.* 43:335-352 (1994); Louvion *et al. Gene* 131:129-134 (1993); Iida *et al. J. Virol.* 70: 6054-6059 (1996).

[0005] Дальнейшие усовершенствования систем регулируемой экспрессии описаны и заявлены в патенте США № 9469856. Однако желателен еще более жесткий контроль транскрипции полинуклеотидов и экспрессии полипептидов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] Данные изобретения преимущественно включают и применяют регуляторные слитые белки (RFP) (которые могут действовать как активаторы или репрессоры) и белки-репрессоры (которые действуют как репрессоры), такие как антибиотики-репрессоры, и тандемно расположенные операторы для контроля транскрипции по меньшей мере одного представляющего интерес полинуклеотида. Транскрипцию одного представляющего интерес полинуклеотида можно контролировать согласно данным изобретениям, или можно контролировать множество полинуклеотидов в оперонподобном расположении согласно данным изобретениям.

[0007] В данном документе первый RFP может связываться с первым оператором, который может располагаться с 5'-конца от промотора и представляющего интерес полинуклеотида, подлежащего транскрипции. Второй RFP или белок-репрессор могут связываться со вторым оператором. Второй оператор может располагаться с 3'-конца промотора, но с 5'-конца транскрибируемого полинуклеотида. В некоторых вариантах реализации второй оператор может быть расположен на 3'-конце промотора, но на 5'-конце транскрибируемого полинуклеотида, а другой второй оператор необязательно может быть функционально связан с полинуклеотидом, кодирующим первый RFP или белок-репрессор.

[0008] В описаниях аспектов и вариантов реализации данного изобретения представлены способы контроля транскрипции представляющего интерес полинуклеотида в клетке, при этом способ включает (I) поддержание клетки в среде без эффективного количества лиганда как активатора, так и репрессора, причем клетка содержит: (A) промотор, функционально связанный с представляющим интерес полинуклеотидом и контролируемый первым оператором, функционально связанным и расположенным на 5'-конце относительно промотора; (B) полинуклеотид, кодирующий активатор; (C) второй оператор; и (D) полинуклеотид, кодирующий репрессор, причем транскрипция представляющего интерес полинуклеотида ингибируется в отсутствие лиганда как активатора, так и репрессора; и (II) контроль клетки над транскрипцией представляющего интерес полинуклеотида путем поддержания клетки в среде с эффективным количеством лиганда как активатора, так и репрессора. Второй оператор может быть функционально

связан и расположен на 3'-конце относительно промотора и на 5'-конце относительно представляющего интерес полинуклеотида. Активатор может связываться с первым оператором в присутствии лиганда, обеспечивая транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида. Репрессор может представлять собой белок-репрессор, такой как антибиотик-репрессор, причем транскрипция представляющего интерес полинуклеотида ингибируется в отсутствие лиганда и при этом транскрипция происходит в присутствии лиганда. Белок-репрессор может связываться со вторым оператором в отсутствие лиганда. Активатором может быть регуляторным слитым белком (RFP). Лиганд может быть выбран из группы, состоящей из тетрациклина и доксициклина. Активатор RFP может представлять собой обратный трансаактиватор тетрациклина. Белок-репрессор может представлять собой репрессор антибиотика, такой как репрессор тетрациклина.

[0009] Кроме того, предложены способы контроля транскрипции представляющего интерес полинуклеотида в клетке, причем способ включает (I) поддержание клетки в среде без эффективного количества лиганда активатора (лиганда-активатора) и с эффективным количеством лиганда-репрессора (лиганда-репрессора), при этом клетка содержит: (A) промотор, функционально связанный с представляющим интерес полинуклеотидом и контролируемый первым оператором, функционально связанным и расположенным на 5'-конце относительно промотора; (B) полинуклеотид, кодирующий активатор; (C) второй оператор; и (D) полинуклеотид, кодирующий репрессор, причем транскрипция представляющего интерес полинуклеотида ингибируется в отсутствие лиганда-активатора и в присутствии лиганда-репрессора; и (II) контроль клетки над транскрипцией представляющего интерес полинуклеотида путем поддержания клетки в среде с эффективным количеством лиганда-активатора и без эффективного количества лиганда-репрессора. Второй оператор может быть функционально связан и расположен на 3'-конце относительно промотора и на 5'-конце относительно представляющего интерес полинуклеотида. Активатор может связываться с первым оператором в присутствии лиганда-активатора, обеспечивая транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида. Активатором может быть регуляторным слитым белком (RFP). Репрессор может представлять собой регуляторный слитый белок (RFP), при этом транскрипция представляющего интерес полинуклеотида ингибируется в присутствии лиганда-репрессора, и транскрипция происходит в отсутствие лиганда-репрессора. Активатор RFP может представлять собой обратный трансаактиватор тетрациклина. Лиганд-активатор может быть выбран из группы, состоящей из тетрациклина и доксициклина. Репрессор RFP может представлять собой ArcEr, а лиганд репрессора RFP может быть выбран из группы, состоящей из эстрогена, эстрадиола (E2), тамоксифена и 4-гидрокситамоксифена (ОНТ).

[0010] Также предложены способы контроля транскрипции представляющего интерес полинуклеотида в культуре клеток, причем способы включают: I. поддержание по меньшей мере одной клетки в среде без эффективного количества первого лиганда первого регуляторного слитого белка (RFP) и с эффективным количеством второго

лиганда второго RFP, причем клетка содержит: (A) промотор, функционально связанный с представляющим интерес полинуклеотидом и контролируемый первым оператором, функционально связанным и расположенным на 5'-конце относительно промотора; (B) полинуклеотид, кодирующий первый RFP, при этом первый RFP содержит: (1) домен, активирующий транскрипцию, слитый с первым ДНК-связывающим доменом; и (2) лигандсвязывающий домен; при этом первый лиганд способен связываться с лигандсвязывающим доменом первого RFP, и при этом ДНК-связывающий домен первого RFP способен связываться с оператором, расположенным 5', в присутствии первого лиганда; (C) второй оператор; и (D) полинуклеотид, кодирующий второй RFP, который отличается от первого RFP, причем второй RFP содержит: (1) второй ДНК-связывающий домен; и (2) лигандсвязывающий домен; при этом второй лиганд способен связываться с лигандсвязывающим доменом второго RFP, и при этом второй RFP способен связываться со вторым оператором в присутствии второго лиганда; при этом транскрипция представляющего интерес полинуклеотида ингибируется в отсутствие эффективного количества первого лиганда и в присутствии эффективного количества второго лиганда; и (II) управление клеткой для транскрипции представляющего интерес полинуклеотида путем поддержания клетки в среде с эффективным количеством первого лиганда и без эффективного количества второго лиганда. Второй оператор может быть функционально связан и расположен на 3'-конце относительно промотора и на 5'-конце относительно полинуклеотидной последовательности, кодирующей представляющий интерес белок. Другой второй оператор необязательно может быть функционально связан с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей первый RFP. Первый RFP в качестве активатора может представлять собой обратный тетрациклиновый трансактиватор (rtTA). Второй RFP в качестве репрессора может содержать домен связывания репрессора Arc, слитый с доменом связывания лиганда рецептора эстрогена (ArcEr). Первым оператором может быть элемент ответа Tet (TRE). Вторым оператором может быть оператор Arc (AO). Клетки могут дополнительно содержать репрессор, который изменяется первым лигандом. Репрессор может представлять собой белок-репрессор tet (TetR). Кроме того, полинуклеотид, кодирующий первый RFP, может быть функционально связан с промотором и, необязательно, со вторым оператором Arc. Промотор может представлять собой промотор CMV, такой как CMVmin. ArcEr может контролировать транскрипцию полинуклеотида, кодирующего rtTA.

[0011] Также предложены способы контроля транскрипции представляющих интерес полинуклеотидов в культуре клеток, причем способы включают: (I) поддержание по меньшей мере одной клетки в среде с или без эффективного количества первого лиганда первого регуляторного слитого белка (RFP) и с эффективным количеством второго лиганда второго RFP, причем клетка содержит: (A) промотор, функционально связанный с представляющим интерес полинуклеотидом и контролируемый Tet-ответным элементом (TRE), функционально связанным и расположенным на 5'-конце относительно промотора; (B) полинуклеотид, кодирующий первый RFP, при этом первый RFP

содержит: (1) домен, активирующий транскрипцию, слитый с ДНК-связывающим доменом; и (2) лиганд-связывающий домен, причем первый лиганд способен связываться с лиганд-связывающим доменом первого RFP, и при этом ДНК-связывающий домен первого RFP способен связываться с оператором, расположенным 5', в присутствии первого лиганда; (C) оператор Arg, функционально связанный и расположенный на 3'-конце относительно промотора и на 5'-конце относительно полинуклеотида, кодирующего представляющий интерес белок; и (D) полинуклеотид, кодирующий второй RFP, причем второй RFP содержит: (1) ДНК-связывающий домен Arg-репрессора; и (2) лигандсвязывающий домен; при этом второй лиганд способен связываться с лигандсвязывающим доменом второго RFP, и при этом второй RFP способен связываться с оператором Arg в присутствии второго лиганда; при этом транскрипция полинуклеотида, кодирующего представляющего интерес белка, ингибируется в отсутствие эффективного количества первого лиганда и в присутствии эффективного количества второго лиганда; и (II) управление клеткой для транскрипции представляющего интерес полинуклеотида путем поддержания клетки в среде с эффективным количеством первого лиганда и без эффективного количества второго лиганда. Первый лиганд может быть выбран из группы, состоящей из тетрациклина, доксициклина и их производных. Вторым лигандом может быть выбран из группы, состоящей из эстрогена, эстрадиола (E2), тамоксифена, 4-гидрокситамоксифена (ОНТ) и их производных. Лигандсвязывающий домен второго RFP может представлять собой лигандсвязывающий домен стероидного рецептора. Первый регуляторный слитый белок (RFP) в качестве активатора может представлять собой обратный тетрациклиновый трансаактиватор (rtTA). Вторым RFP в качестве репрессора может быть ArgER, у которого домен связывания репрессора Arg слит с доменом связывания лиганда рецептора эстрогена (Arg представляет собой репрессор из фага P22). Промотор, функционально связанный с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей представляющий интерес полипептид, может представлять собой промотор CMV, такой как промотор CMVmin. Промотор CMV и оператор Arg необязательно могут быть функционально связаны с полинуклеотидом, кодирующим первый RFP. Промотор E/L SV40 или другой конститутивный промотор может быть функционально связан с полинуклеотидом, кодирующим второй RFP.

[0012] Кроме того, предложены способы контроля транскрипции представляющего интерес полинуклеотида в клетке, причем способ включает (I) поддержание по меньшей мере одной клетки в среде без эффективного количества лиганда регуляторного слитого белка (RFP) и белка-репрессора, при этом клетка содержит: (A) промотор, функционально связанный с представляющим интерес полинуклеотидом и контролируемый первым оператором, функционально связанным и расположенным на 5'-конце относительно промотора; (B) полинуклеотид, кодирующий RFP, при этом RFP содержит: (1) домен, активирующий транскрипцию, слитый с ДНК-связывающим доменом; и (2) лигандсвязывающий домен; при этом лиганд способен связываться с лигандсвязывающим доменом RFP, и при этом ДНК-связывающий домен RFP способен связываться с первым

оператором в присутствии лиганда; (С) второй оператор; и (D) полинуклеотид, кодирующий белок-репрессор, причем белок-репрессор может связываться со вторым оператором только в отсутствие лиганда, причем транскрипция полинуклеотида ингибируется в отсутствие эффективного количества лиганда; и (II) контроль клетки над транскрипцией представляющего интерес полинуклеотида путем поддержания клетки в среде с эффективным количеством лиганда. Второй оператор может быть функционально связан и расположен на 3'-конце относительно промотора и на 5'-конце относительно представляющего интерес полинуклеотида. Белок-репрессор может связываться со вторым оператором в отсутствие лиганда, чтобы ингибировать транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида. RFP может связываться с первым оператором в присутствии лиганда-активатора, обеспечивая транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида. Лиганд может быть выбран из группы, состоящей из тетрациклина и доксициклина. Активатор RFP может представлять собой обратный трансактиватор тетрациклина (rtTA). Белок-репрессор может представлять собой репрессор тетрациклина (TetR). Первым оператором может быть элемент ответа Tet (TRE). Второй оператор может быть оператором Tet.

[0013] Кроме того, предложены способы контроля транскрипции представляющих интерес полинуклеотидов в культуре клеток, причем способы включают: (I) поддержание по меньшей мере одной клетки в среде с или без эффективного количества первого лиганда первого регуляторного слитого белка (RFP) и с эффективным количеством второго лиганда второго RFP, причем клетка содержит: (A) промотор, функционально связанный с представляющим интерес полинуклеотидом и контролируемый Tet-ответным элементом (TRE), функционально связанным и расположенным на 5'-конце относительно промотора; (B) полинуклеотид, кодирующий первый RFP, при этом первый RFP содержит: (1) домен, активирующий транскрипцию, слитый с ДНК-связывающим доменом; и (2) лиганд-связывающий домен, причем первый лиганд способен связываться с лиганд-связывающим доменом первого RFP, и при этом ДНК-связывающий домен первого RFP способен связываться с TRE, расположенным 5', в присутствии первого лиганда; (C) оператор Tet, функционально связанный и расположенный на 3'-конце относительно промотора и на 5'-конце относительно представляющим интерес полинуклеотида; и (D) полинуклеотид, кодирующий второй RFP, причем второй RFP содержит: (1) ДНК-связывающий домен Arc-репрессора; и (2) лиганд-связывающий домен; при этом второй лиганд способен связываться с лиганд-связывающим доменом второго RFP, и при этом второй RFP способен связываться с оператором Arc в присутствии второго лиганда; при этом транскрипция представляющего интерес полинуклеотида ингибируется в отсутствие эффективного количества первого лиганда и в присутствии эффективного количества второго лиганда; и (II) управление клеткой для транскрипции представляющего интерес полинуклеотида путем поддержания клетки в среде с эффективным количеством первого лиганда и без эффективного количества второго лиганда. Первый лиганд может быть выбран из группы, состоящей из тетрациклина,

доксидциклина и их производных. Вторым лигандом может быть выбран из группы, состоящей из эстрогена, эстрадиола (E2), тамоксифена, 4-гидрокситамоксифена (ОНТ) и их производных. Лигандсвязывающий домен второго RFP может представлять собой лигандсвязывающий домен стероидного рецептора. Первый регуляторный слитый белок (RFP) в качестве активатора может представлять собой обратный тетрациклиновый трансаактиватор (rtTA). Вторым RFP в качестве репрессора может быть ArcER. Промотор, функционально связанный с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей представляющий интерес полипептид, может представлять собой промотор CMV, такой как CMVmin. Промотор CMV и оператор Arc необязательно могут быть функционально связаны с полинуклеотидом, кодирующим первый RFP. Промотор E/L SV40 или другой конститутивный промотор может быть функционально связан с полинуклеотидом, кодирующим второй RFP. Клетки могут дополнительно содержать полинуклеотид, кодирующий репрессор, измененный первым лигандом. Репрессором может быть TetR.

[0014] Также предложены способы контроля транскрипции представляющего интерес полинуклеотида в культуре клеток, причем способы включают: поддержание по меньшей мере одной клетки в среде с эффективным количеством первого лиганда первого регуляторного слитого белка (RFP) или без него; и с эффективным количеством второго лиганда второго RFP, причем клетка содержит (A) промотор; (B) оператор Arc; и (C) полинуклеотид, кодирующий слитый белок обратного тетрациклинового трансаактиватора (rtTA), при этом (A), (B) и (C) функционально связаны, и при этом транскрипция полинуклеотида rtTA контролируется слитым белком, содержащим репрессор Arc связывающий домен и лигандсвязывающий домен рецептора эстрогена (ArcEr); при этом rtTA может контролировать транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида. Промотор может представлять собой промотор CMV, такой как CMVmin. Первый лиганд может быть выбран из группы, состоящей из тетрациклина и доксициклина, и их производных. Вторым лигандом может быть выбран из группы, состоящей из эстрогена, эстрадиола (E2), тамоксифена, 4-гидрокситамоксифена (ОНТ) и их производных.

[0015] Данные изобретения также предлагают клетки, способные контролировать транскрипцию по меньшей мере одного представляющего интерес полинуклеотида, причем клетка содержит: (A) промотор, функционально связанный с представляющим интерес полинуклеотидом и контролируемый первым оператором, функционально связанным и расположенным на 5'-конце относительно промотора; (B) полинуклеотид, кодирующий активатор; (C) второй оператор; и (D) полинуклеотид, кодирующий репрессор, причем транскрипция представляющего интерес полинуклеотида ингибируется в отсутствие лиганда как активатора, так и репрессора и присутствует в присутствии лиганда как активатора, так и репрессора. Второй оператор может быть функционально связан и расположен на 3'-конце относительно промотора и на 5'-конце относительно представляющего интерес полинуклеотида. Активатор может связываться с первым оператором в присутствии лиганда, обеспечивая транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида. Репрессор может представлять собой белок-репрессор, в котором

транскрипция представляющего интерес полинуклеотида ингибируется в отсутствие лиганда и в котором транскрипция присутствует в присутствии лиганда. Белок-репрессор может связываться со вторым оператором в отсутствие лиганда. Активатором может быть регуляторным слитым белком (RFP). Лиганд может быть выбран из группы, состоящей из тетрациклина и доксициклина. Активатор RFP может представлять собой обратный трансактиватор тетрациклина. Белок-репрессор может представлять собой репрессор тетрациклина.

[0016] Кроме того, предложены клетки, способные контролировать транскрипцию по меньшей мере одного представляющего интерес полинуклеотида, причем клетка содержит: (A) промотор, функционально связанный с представляющим интерес полинуклеотидом и контролируемый первым оператором, функционально связанным и расположенным на 5'-конце относительно промотора; (B) полинуклеотид, кодирующий первый регуляторный слитый белок (RFP), при этом первый RFP содержит: (1) домен, активирующий транскрипцию, слитый с первым ДНК-связывающим доменом; и (2) лигандсвязывающий домен; при этом первый лиганд способен связываться с лигандсвязывающим доменом первого RFP, и при этом ДНК-связывающий домен первого RFP способен связываться с оператором, расположенным 5', в присутствии первого лиганда; (C) второй оператор; и (D) полинуклеотид, кодирующий второй RFP, который отличается от первого RFP, причем второй RFP содержит: (1) второй ДНК-связывающий домен; и (2) лигандсвязывающий домен; при этом второй лиганд способен связываться с лигандсвязывающим доменом второго RFP, и при этом второй RFP способен связываться со вторым оператором в присутствии второго лиганда; при этом транскрипция полинуклеотида ингибируется в отсутствие первого лиганда и в присутствии второго лиганда и присутствует в присутствии первого лиганда и в отсутствие второго лиганда. Второй оператор может быть функционально связан и расположен на 3'-конце относительно промотора и на 5'-конце относительно полинуклеотидной последовательности, кодирующей представляющий интерес белок. Второй оператор необязательно может быть функционально связан с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей первый RFP. Клетки могут содержать полинуклеотид, который кодирует репрессор, измененный первым лигандом. Репрессором может быть TetR. Полинуклеотид (B), кодирующий первый RFP, может быть функционально связан с промотором и вторым оператором Arg. Промотор может представлять собой промотор CMV, такой как CMVmin. Первый RFP в качестве активатора может представлять собой слитый белок обратного трансактиватора тетрациклина (rtTA), а второй RFP в качестве репрессора может представлять собой слитый белок, содержащий домен, связывающий репрессор Arg, и лигандсвязывающий домен рецептора эстрогена (ArgEg). ArgEg может контролировать транскрипцию полинуклеотида, кодирующего rtTA.

[0017] Кроме того, предложены клетки, способные контролировать транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида, причем клетка содержит (A) промотор, функционально связанный с представляющим интерес полинуклеотидом и

контролируемый первым оператором, функционально связанным и расположенным 5' относительно промотора; (B) полинуклеотид, кодирующий активатор; (C) второй оператор; и (D) полинуклеотид, кодирующий репрессор; при этом транскрипция представляющего интерес полинуклеотида ингибируется в отсутствие эффективного количества лиганда-активатора и присутствия эффективного количества лиганда-репрессора; и присутствует в присутствии эффективного количества лиганда-активатора и отсутствии эффективного количества лиганда-репрессора. Второй оператор может быть функционально связан и расположен на 3'-конце относительно промотора и на 5'-конце относительно представляющего интерес полинуклеотида. Активатор может связываться с первым оператором в присутствии лиганда-активатора, обеспечивая транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида. Активатором может быть регуляторным слитым белком (RFP). Репрессор может представлять собой регуляторный слитый белок (RFP), при этом транскрипция представляющего интерес полинуклеотида ингибируется в присутствии лиганда-репрессора, и транскрипция происходит в отсутствие лиганда-репрессора. Активатор RFP может представлять собой обратный трансактиватор тетрациклина. Лиганд-активатор может быть выбран из группы, состоящей из тетрациклина и доксициклина. Репрессором RFP может быть ArcEr. Репрессорный лиганд может быть выбран из группы, состоящей из эстрогена, эстрадиола (E2), тамоксифена и 4-гидрокситамоксифена (ОНТ).

[0018] Также предложены клетки, способные контролировать транскрипцию по меньшей мере одного представляющего интерес полинуклеотида, причем клетка содержит: (A) промотор, функционально связанный с представляющим интерес полинуклеотидом и контролируемый Tet-ответным элементом (TRE), функционально связанным и расположенным на 5'-конце относительно промотора;

(B) полинуклеотид, кодирующий первый регуляторный слитый белок (RFP), при этом первый RFP содержит: (1) домен, активирующий транскрипцию, слитый с ДНК-связывающим доменом; и (2) лиганд-связывающий домен, причем первый лиганд способен связываться с лиганд-связывающим доменом первого RFP, и при этом ДНК-связывающий домен первого RFP способен связываться с оператором, расположенным 5', в присутствии первого лиганда; (C) оператор Arc, функционально связанный и расположенный на 3'-конце относительно промотора и на 5'-конце относительно полинуклеотида, кодирующего представляющий интерес белок; и

(D) полинуклеотид, кодирующий второй RFP, при этом второй RFP содержит: (1) ДНК-связывающий домен Arc-репрессора; и (2) лигандсвязывающий домен; при этом второй лиганд способен связываться с лигандсвязывающим доменом второго RFP, и при этом второй RFP способен связываться со оператором Arc в присутствии второго лиганда; при этом транскрипция полинуклеотида ингибируется в отсутствие первого лиганда и в присутствии второго лиганда и присутствует в присутствии первого лиганда и в отсутствие второго лиганда. Первый лиганд может быть выбран из группы, состоящей из тетрациклина, доксициклина и их производных. Второй лиганд может быть выбран из

группы, состоящей из эстрогена, эстрадиола (E2), тамоксифена, 4-гидрокситамоксифена (ОНТ) и их производных. Лигандсвязывающий домен второго RFP может представлять собой лигандсвязывающий домен стероидного рецептора. Первый регуляторный слитый белок (RFP) в качестве активатора может представлять собой обратный тетрациклиновый трансактиватор (rtTA). Вторым RFP в качестве репрессора может быть ArcER. Промотор, функционально связанный с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей представляющий интерес полипептид, может представлять собой промотор CMV, такой как промотор CMVmin. Промотор CMV и оператор Arc необязательно могут быть функционально связаны с полинуклеотидом, кодирующим первый RFP. Промотор E/L SV40 или другой конститутивный промотор может быть функционально связан с полинуклеотидом, кодирующим второй RFP.

[0019] Кроме того, предложены клетки, способные контролировать транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида, причем клетка содержит (A) промотор, функционально связанный с представляющим интерес полинуклеотидом и контролируемый первым оператором, функционально связанным и расположенным 5' относительно промотора; (B) полинуклеотид, кодирующий регуляторный слитый белок (RFP), при этом RFP содержит: (1) домен, активирующий транскрипцию, слитый с ДНК-связывающим доменом; и (2) лигандсвязывающий домен; при этом лиганд способен связываться с лиганд-связывающим доменом RFP, и при этом ДНК-связывающий домен RFP способен связываться с первым оператором в присутствии лиганда; (C) второй оператор; и (D) полинуклеотид, кодирующий белок-репрессор, причем белок-репрессор может связываться со вторым оператором только в отсутствие лиганда, причем транскрипция представляющего интерес полинуклеотида ингибируется в отсутствие эффективного количества лиганда обоих активатора и репрессора, и допускается в присутствии эффективного количества лиганда как активатора, так и репрессора. Вторым оператором может быть функционально связан и расположен на 3'-конце относительно промотора и на 5'-конце относительно представляющего интерес полинуклеотида. Белок-репрессор может связываться со вторым оператором в отсутствие лиганда, чтобы ингибировать транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида. RFP может связываться с первым оператором в присутствии лиганда-активатора, обеспечивая транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида. Лиганд может быть выбран из группы, состоящей из тетрациклина и доксициклина. Активатор RFP может представлять собой обратный трансактиватор тетрациклина (rtTA). Белок-репрессор может представлять собой репрессор тетрациклина (TetR). Первым оператором может быть элемент ответа Tet (TRE). Вторым оператором может быть оператором Tet.

[0020] Кроме того, предложены клетки, способные контролировать транскрипцию по меньшей мере одного представляющего интерес полинуклеотида, причем клетка содержит: (A) промотор, функционально связанный с представляющим интерес полинуклеотидом и контролируемый Tet-ответным элементом (TRE), функционально связанным и расположенным на 5'-конце относительно промотора; (B) полинуклеотид,

кодирующий первый регуляторный слитый белок (первый RFP), при этом первый RFP содержит: (1) домен, активирующий транскрипцию, слитый с ДНК-связывающим доменом; и (2) лиганд-связывающий домен, причем первый лиганд способен связываться с лиганд-связывающим доменом первого RFP, и при этом ДНК-связывающий домен первого RFP способен связываться с TRE, расположенным 5', в присутствии первого лиганда; (C) оператор Tet, функционально связанный и расположенный на 3'-конце относительно промотора и на 5'-конце относительно представляющим интерес полинуклеотида; и (D) полинуклеотид, кодирующий второй RFP, причем второй RFP содержит: (1) ДНК-связывающий домен Arc-репрессора; и (2) лигандсвязывающий домен; при этом второй лиганд способен связываться с лигандсвязывающим доменом второго RFP, и при этом второй RFP способен связываться со оператором Arc в присутствии второго лиганда; при этом транскрипция полинуклеотида ингибируется в отсутствие первого лиганда и в присутствии второго лиганда и присутствует в присутствии первого лиганда и в отсутствие второго лиганда. Первый лиганд может быть выбран из группы, состоящей из тетрациклина, доксициклина и их производных. Второй лиганд может быть выбран из группы, состоящей из эстрогена, эстрадиола (E2), тамоксифена, 4-гидрокситамоксифена (ОНТ) и их производных. Первый регуляторный слитый белок (RFP) в качестве активатора может представлять собой обратный тетрациклиновый трансактиватор (rtTA). Вторым RFP в качестве репрессора может быть ArcER. Промотор, функционально связанный с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей представляющий интерес полипептид, может представлять собой промотор CMV, такой как CMVmin. Промотор CMV и оператор Arc необязательно могут быть функционально связаны с полинуклеотидом, кодирующим первый RFP. Промотор E/L SV40 или другой конститутивный промотор может быть функционально связан с полинуклеотидом, кодирующим второй RFP. Клетка может дополнительно содержать полинуклеотид, кодирующий репрессор, измененный первым лигандом. Репрессором может быть TetR.

[0021] Кроме того, предложены клетки, способные контролировать транскрипцию по меньшей мере одного представляющего интерес полинуклеотида, если он присутствует, причем клетка содержит: (A) полинуклеотидную последовательность, кодирующую первый регуляторный слитый белок (первый RFP), причем первый RFP содержит: (1) домен, активирующий транскрипцию, слитый с ДНК-связывающим доменом; и (2) лигандсвязывающий домен; при этом первый лиганд способен связываться с лигандсвязывающим доменом первого RFP, и при этом ДНК-связывающий домен первого RFP способен связываться с оператором, расположенным 5', в присутствии первого лиганда; (B) полинуклеотидную последовательность, кодирующую второй регуляторный слитый белок (второй RFP), причем второй RFP содержит: (1) ДНК-связывающий домен, содержащий ДНК-связывающий домен Arc-репрессора; и (2) лигандсвязывающий домен; при этом второй лиганд способен связываться с лигандсвязывающим доменом второго RFP, и при этом второй RFP способен связываться с оператором Arc в присутствии второго лиганда; (C) один или более сайтов инсерции

представляющего интерес полинуклеотида, который функционально связан с промотором и по меньшей мере с одним оператором. Первый лиганд может быть выбран из группы, состоящей из тетрациклина, доксициклина и их производных. Второй лиганд может быть выбран из группы, состоящей из эстрогена, эстрадиола (E2), тамоксифена, 4-гидрокситамоксифена (ОНТ) и их производных. Первый регуляторный слитый белок (RFP) в качестве активатора может представлять собой обратный тетрациклиновый трансактиватор (rtTA). Вторым RFP в качестве репрессора может быть ArcER. Промотор, функционально связанный с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей представляющий интерес полипептид, может представлять собой промотор CMV, такой как промотор CMVmin. Промотор CMV и оператор Arc необязательно могут быть функционально связаны с полинуклеотидом, кодирующим первый RFP. Промотор E/L SV40 или другой конститутивный промотор может быть функционально связан с полинуклеотидом, кодирующим второй RFP. Клетка может дополнительно содержать полинуклеотид, кодирующий репрессор, измененный первым лигандом. Репрессором может быть TetR.

[0022] Также предложены клетки, способные контролировать транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида, причем клетка содержит (A) промотор; (B) оператор Arc; и (C) полинуклеотид, кодирующий слитый белок обратного тетрациклинового трансактиватора (rtTA), причем (A), (B) и (C) функционально связаны, и при этом транскрипция полинуклеотида rtTA контролируется слитым белком, содержащим репрессор Arc связывающий домен и лигандсвязывающий домен рецептора эстрогена (ArcEr); при этом rtTA может контролировать транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида. Промотор может представлять собой промотор CMV, такой как CMVmin. Первый лиганд может быть выбран из группы, состоящей из тетрациклина и доксициклина. Второй лиганд может быть выбран из группы, состоящей из эстрогена, эстрадиола (E2), тамоксифена, 4-гидрокситамоксифена (ОНТ) и их производных.

[0023] Также предусмотрены основные банки клеток, рабочие банки клеток, банки клеток развития, культуры клеток, посевные культуры и производственные культуры, содержащие клетки согласно данным изобретениям, а также биореакторы и ферментеры, содержащие культуры клеток, содержащие клетки согласно данным изобретениям, описанным в данном документе.

[0024] Аспекты вариантов реализации включают: поддержание клеток в отсутствие первого лиганда и в присутствии второго лиганда или, альтернативно, также в присутствии первого лиганда. В таких условиях поддержания процент клеток, содержащих копии полинуклеотидной последовательности ДНК, кодирующей представляющий интерес полипептид, снизился менее чем около на 5%. При тех же условиях поддержания экспрессия представляющего интерес полипептида может быть по меньшей мере на 50% меньше, по меньшей мере на 60% меньше, по меньшей мере на 70% меньше, по меньшей мере на 80% меньше, по меньшей мере на 90% меньше или по меньшей мере на 95% меньше, чем экспрессия полипептида в клетках в присутствии

первого лиганда и отсутствии второго лиганда по истечении периода времени, достаточного для того, чтобы позволить второму лиганду, ранее присутствовавшему, очиститься, обычно от 4 до 14 дней в зависимости от второго лиганда и условия культивирования. При тех же условиях поддержания количество копий РНК, кодирующих представляющий интерес полипептид, может быть по меньшей мере на 70% меньше, по меньшей мере на 75% меньше, по меньшей мере на 80% меньше, по меньшей мере на 85% меньше, по меньшей мере на 90% меньше или на по меньшей мере на 95% меньше, чем число копий РНК, кодирующей полипептид, в клетках в присутствии первого лиганда и отсутствии ранее присутствовавшего второго лиганда после периода времени, достаточного для того, чтобы дать возможность второму лиганду очиститься, обычно от 4 до 14 дней в зависимости от второго лиганда и условий культивирования.

[0025] В некоторых вариантах реализации транскрипция полинуклеотидной последовательности, кодирующей первый регуляторный слитый белок (первый RFP), ингибируется в присутствии второго лиганда, такого как ОНТ, и второго RFP, такого как ArcER.

[0026] В некоторых вариантах реализации промотор, функционально связанный с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей представляющий интерес белок, представляет собой промотор CMV. Промотор может представлять собой промотор CMVmin.

[0027] В некоторых вариантах реализации представляющая интерес полинуклеотидная последовательность кодирует представляющий интерес полипептид и/или продукт. Представляющая интерес полинуклеотидная последовательность может кодировать представляющий интерес полипептид. Представляющий интерес полипептид может представлять собой белок, который является токсичным или ингибирующим для клетки, например, вирусный белок.

[0028] В некоторых вариантах реализации клетки сохраняют способность транскрибировать представляющий интерес полинуклеотид в присутствии первого лиганда и в отсутствие второго лиганда после замораживания и оттаивания по меньшей мере одного, по меньшей мере двух, по меньшей мере трех или по меньшей мере четырех раз.

[0029] В некоторых вариантах реализации культура клеток имеет плотность клеток от по меньшей мере от 400 000 до одного миллиона жизнеспособных клеток на мл, находясь в репрессированном состоянии в присутствии второго лиганда. В индуцированном состоянии в присутствии первого лиганда и отсутствии второго лиганда культура клеток может иметь плотность клеток от по меньшей мере 600 000 до двух миллионов жизнеспособных клеток на мл. В дополнительных вариантах реализации клетки выращивают в исследовательских или производственных биореакторах, имеющих объем, например, по меньшей мере 2 литра, по меньшей мере 5 литров, по меньшей мере 10 литров, 50 литров, по меньшей мере 75 литров, по меньшей мере 100 литров, по меньшей мере 150 литров, по меньшей мере 200 литров, по меньшей мере 500 литров, по

меньшей мере 1000 литров, по меньшей мере 2000 литров, по меньшей мере 5000 литров, по меньшей мере 10000 литров, по меньшей мере 15000 литров, по меньшей мере 20000 литров и более.

[0030] В некоторых вариантах реализации клетка представляет собой клетку млекопитающего, такую как клетка примата, собаки или грызуна. В более конкретных вариантах реализации клетка представляет собой клетку СНО, такую как клетка СНО-K1, клетка ВНК, амниотическая клетка человека или клетка НЕК293.

[0031] В некоторых вариантах реализации в отсутствие первого лиганда и присутствии второго лиганда транскрипция полинуклеотидной последовательности, кодирующей представляющий интерес полипептид, существенно снижается. Например, достигается по меньшей мере 10-кратное снижение транскрипции по сравнению с уровнем транскрипции, наблюдаемым в присутствии первого лиганда и отсутствии второго лиганда. В некоторых вариантах реализации достигается по меньшей мере 20-кратное снижение транскрипции по сравнению с уровнем транскрипции, наблюдаемым в присутствии первого лиганда и отсутствии второго лиганда. В некоторых вариантах реализации достигается по меньшей мере 50-кратное снижение транскрипции по сравнению с уровнем транскрипции, наблюдаемым в присутствии первого лиганда и отсутствии второго лиганда. В некоторых вариантах реализации достигается по меньшей мере 100-кратное снижение транскрипции по сравнению с уровнем транскрипции, наблюдаемым в присутствии первого лиганда и отсутствии второго лиганда. В некоторых вариантах реализации достигается по меньшей мере 500-кратное снижение транскрипции по сравнению с уровнем транскрипции, наблюдаемым в присутствии первого лиганда и отсутствии второго лиганда.

[0032] В некоторых вариантах реализации степень транскрипции представляющей интерес полинуклеотидной последовательности, достигаемая в присутствии первого лиганда и отсутствии второго лиганда, может быть по меньшей мере в 10 раз выше, чем в отсутствие первого лиганда и присутствии второго лиганда. В некоторых вариантах реализации степень транскрипции представляющей интерес полинуклеотидной последовательности, достигаемая в присутствии первого лиганда и отсутствии второго лиганда, может быть по меньшей мере в 20 раз выше, чем в отсутствие первого лиганда и присутствии второго лиганда. В некоторых вариантах реализации степень транскрипции представляющей интерес полинуклеотидной последовательности, достигаемая в присутствии первого лиганда и отсутствии второго лиганда, может быть по меньшей мере в 50 раз выше, чем в отсутствие первого лиганда и присутствии второго лиганда. В некоторых вариантах реализации степень транскрипции представляющей интерес полинуклеотидной последовательности, достигаемая в присутствии первого лиганда и отсутствии второго лиганда, может быть по меньшей мере в 100 раз выше, чем в отсутствие первого лиганда и присутствии второго лиганда. В некоторых вариантах реализации степень транскрипции представляющей интерес полинуклеотидной последовательности, достигаемая в присутствии первого лиганда и отсутствии второго

лиганда, может быть по меньшей мере в 500 раз выше, чем в отсутствие первого лиганда и присутствии второго лиганда.

[0033] Другие варианты реализации, аспекты, цели и преимущества станут очевидными из обзора последующего подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0034] На **Фиг. 1** изображена индукция транскрипции представляющего интерес гена (в данном примере полинуклеотида, кодирующего малиновый флуоресцентный белок) в присутствии dox и отсутствии ОНТ. Левая сторона изображает подавленное состояние, когда dox отсутствует и присутствует ОНТ. Справа изображено индуцированное состояние, в котором присутствует dox, а ОНТ отсутствует. На фигуре показан пример тандемного расположения элемента ответа Tet (TRE) и оператора Arc (AO).

[0035] На **Фиг. 2** показаны результаты транскрипции представляющего интерес гена (GOI) (в данном примере полинуклеотида, кодирующего малиновый флуоресцентный белок) в присутствии или в отсутствие лигандов. См. Фиг. 1. Полинуклеотид, кодирующий малиновый флуоресцентный белок, транскрибировали под контролем rtTA в сочетании с ArcER (TRE-AO) или под контролем CMV-TO. В присутствии E2 и отсутствии Dox наблюдаются очень низкие уровни транскрипции GOI (малиновый цвет) (TRE-TO репрессирован (+E2/-Dox) по сравнению с контролем (Негативная, немодифицированная клетка) и CMV-TO. В присутствии Dox и отсутствии E2 наблюдаются высокие уровни транскрипции GOI (малинового цвета) (индуцированные TRE-AO).

[0036] На **Фиг. 3** изображен необязательный вариант реализации, в котором экспрессия регуляторного слитого белка, такого как rtTA, или белка-репрессора может регулироваться вторым RFP и связанными с ним элементами, такими как ArcER, AO и ОНТ.

[0037] На **Фиг. 4** изображен вариант реализации, в котором полинуклеотид, кодирующий GOI, малиновый флуоресцентный белок, находился под контролем rtTA и TetR. Элемент ответа Tet (TRE) и оператор Tet (TetO) расположены в тандемном порядке. Индукция транскрипции представляющего интерес гена (в данном примере полинуклеотида, кодирующего малиновый флуоресцентный белок) происходит в присутствии dox и отсутствии лиганда, такого как E2 или ОНТ, что позволяет экспрессировать слитый белок rtTA. См. фиг. 3 относительно необязательной регулируемой экспрессии регуляторного слитого белка, такого как rtTA.

[0038] На **Фиг. 5** показаны результаты транскрипции представляющего интерес гена (GOI) (в данном примере полинуклеотида, кодирующего малиновый флуоресцентный белок) в присутствии или в отсутствие лигандов. Транскрипция полинуклеотида, кодирующего малиновый флуоресцентный белок, находилась под контролем rtTA и TetR (TRE-TO). См. Фиг. 4. В присутствии E2 и отсутствии dox наблюдаются очень низкие уровни транскрипции GOI (малиновый флуоресцентный

белок) (TRE-TO репрессирован (+E2/-Dox)), практически идентичные уровням контроля (Отрицательный, немодифицированная клетка). В присутствии dox и отсутствии E2 наблюдаются высокие уровни транскрипции GOI (малиновый флуоресцентный белок) (индуцированные TRE-TO).

[0039] На **Фиг. 6** изображен контроль транскрипции представляющего интерес гена (на этой фигуре полинуклеотид, кодирующий цитотоксический ген) в отсутствие dox и присутствии ОНТ, что обеспечивает подавленное состояние.

[0040] На **Фиг. 7** изображен контроль транскрипции представляющего интерес гена (на этой фигуре полинуклеотид, кодирующий цитотоксический ген) в присутствии dox и отсутствии ОНТ, что обеспечивает индуцированное состояние.

[0041] На **Фиг. 8** изображен вестерн-блоттинг белков, продуцируемых клетками НЕК293, трансформированными генами Rep78 и Rep 52, под строгим контролем TRE-АО. Когда клетки НЕК293 находились в репрессированном состоянии (-) (без Dox и с E2), Rep78 и Rep52 не вырабатывались. В индуцированном состоянии (+) (с Dox и без E2) вырабатываются как Rep 78, так и Rep 52. В левом столбце вестерн-блота имеются маркеры размера.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0042] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют те же значения, которые обычно понятны специалисту в области техники, к которой относится данное изобретение.

Определения

[0043] Термин «около» в контексте числовых значений и диапазонов относится к значениям или диапазонам, которые приближаются или близки к указанным значениям или диапазонам, так что данное изобретение может работать, например, иметь искомую скорость, количество, степень, увеличение, уменьшение, степень транскрипции или степень экспрессии полипептида, концентрацию или время, как очевидно из идей, содержащихся в данном документе. Таким образом, этот термин охватывает значения, выходящие за рамки тех, которые просто возникают в результате систематической ошибки. Например, «около» может обозначать значения выше или ниже указанного значения в диапазоне прикл. +/- 10% или больше или меньше в зависимости от работоспособности.

[0044] «Эффективное количество» соединения относится к количеству соединения, необходимому для достижения желаемого результата, и обычно определяется в терминах молярной или массовой концентрации соединения, когда оно присутствует в среде. Лиганды являются примером соединений.

[0045] «Способность к связыванию» относится к способности молекулы, такой как регуляторный слитый белок или его часть, связываться с другой молекулой или ее частью, такими как лигандсвязывающие домены, нуклеиновые связывающие домены, операторы, элементы ответа и т.п. Обычно привязка может разрешить действие или функцию, или заблокировать действие или функцию.

[0046] «Фрагмент нуклеиновой кислоты» включает любое расположение одноцепочечных или двухцепочечных нуклеотидных последовательностей. Фрагменты нуклеиновой кислоты могут включать, помимо прочего, полинуклеотиды, промоторы, энхансеры, операторы, репрессоры, сигналы терминации транскрипции, сайты входа в рибосомы и сигналы полиаденилирования.

[0047] «ДНК-кассета» или «кассета» представляет собой тип фрагмента нуклеиновой кислоты, который содержит по меньшей мере промотор, по меньшей мере одну открытую рамку считывания и необязательно сигнал полиаденилирования. Один или более операторов также не являются обязательными. Таким образом, кассета ДНК представляет собой полинуклеотид, который содержит два или более коротких полинуклеотидов. Кассета может содержать один или более генов и промоторов, энхансеров, операторов, репрессоров, сигналов терминации транскрипции, сайтов входа в рибосомы, интронов и сигналов полиаденилирования.

[0048] «Функционально связанный» относится к одной или нескольким нуклеотидным последовательностям, находящимся в функциональных отношениях с одной или более другими нуклеотидными последовательностями. Такие функциональные отношения могут прямо или косвенно контролировать, что означает побуждение, вызывание, регулирование, усиление, облегчение, разрешение, влияние, ослабление, остановку, предотвращение, подавление и/или блокирование одного или более действий, или действий в соответствии с выбранным дизайном для выбранной цели. Примеры включают фрагменты одноцепочечной или двухцепочечной нуклеиновой кислоты и могут содержать две или более нуклеотидные последовательности, расположенные внутри данного фрагмента таким образом, что последовательность(и) может оказывать по меньшей мере одно функциональное воздействие на другой(ие) фрагмент(ы). Например, промотор, функционально связанный с кодирующей областью полинуклеотидной последовательности ДНК, может способствовать транскрипции кодирующей области. Другие элементы, такие как энхансеры, операторы, репрессоры, сигналы терминации транскрипции, сайты входа в рибосомы и сигналы полиаденилирования, также могут быть функционально связаны с представляющим интерес полинуклеотидом для контроля его транскрипции. Расположение и расстояние для достижения работоспособных связей можно определить с помощью подходов, доступных специалисту в данной области техники, таких как скрининг с использованием вестерн-блоттинга и RT-PCR.

[0049] «Оператор» обозначает последовательность ДНК, которая введена в полинуклеотидную последовательность или рядом с ней таким образом, что полинуклеотидная последовательность может регулироваться взаимодействием молекулы, способной связываться с оператором и, в результате, предотвращать или обеспечивать транскрипцию полинуклеотидную последовательность, в зависимости от обстоятельств. Специалист в данной области техники поймет, что оператор должен располагаться достаточно близко к промотору, чтобы он был способен контролировать транскрипцию с помощью промотора, что можно рассматривать как тип работоспособной связи. Оператор

может быть расположен либо ниже, либо выше промотора. К ним относятся, помимо прочего, операторная область гена *Lex A E. coli*, которая связывает пептид *Lex A* и лактозу, и 45 операторов триптофана, которые связывают репрессорные белки, кодируемые генами *Lad* и *trpR E. coli*. Бактериофаги-операторы из лямбда *Pi* и фага *P22 Mnt* и *Arc*. В альтернативном варианте реализации, когда домен блокировки транскрипции *RFP* представляет собой фермент рестрикции, оператором является последовательность узнавания этого фермента. Предпочтительными операторами являются оператор *Tet* и оператор *Arc*, примеры которых приведены в данном документе. Операторы могут иметь нативную последовательность или мутантную последовательность (например, синтетическую или полусинтетическую). Например, мутантные последовательности оператора *Tet* раскрыты в *Wissmann et al., Nucleic Acids Res.* 14: 4253-66 (1986). *TRE* также функционирует как оператор и может содержать нативные последовательности операторов, мутантные последовательности операторов или комбинации нативных и мутантных последовательностей операторов.

[0050] Фразы «процент идентичности» или «% идентичности» в их различных грамматических формах при описании последовательности подразумевают включение гомологичных последовательностей, которые демонстрируют заявленную идентичность вдоль областей смежной гомологии, но наличие пробелов, делеций или вставок, которые не имеющие гомолога в сравниваемой последовательности, не учитываются при расчете процента идентичности. В данном документе определение «процента идентичности» или «% идентичности» между гомологами не будет включать сравнение последовательностей, когда гомолог не имеет гомологичной последовательности для сравнения при выравнивании. Таким образом, «процент идентичности» и «% идентичности» не включают штрафы за пропуски, удаления и вставки.

[0051] «Гомологичная последовательность» в контексте последовательностей нуклеиновой кислоты относится к последовательности, которая по существу гомологична эталонной последовательности нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации две последовательности считаются по существу гомологичными, если по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более соответствующих им нуклеотидов идентичны на соответствующем участке остатков. В некоторых вариантах реализации соответствующий участок представляет собой полную (т.е. полную) последовательность.

[0052] «Полинуклеотид» включает последовательность ковалентно соединенных нуклеотидов и включает РНК, и ДНК. Олигонуклеотиды считаются более короткими полинуклеотидами. Гены представляют собой полинуклеотиды ДНК (полидезоксирибонуклеиновая кислота), которые в конечном итоге кодируют полипептиды, которые транслируются с РНК (полирибонуклеиновой кислоты), которая обычно транскрибируется с ДНК. Полинуклеотиды ДНК также могут кодировать полинуклеотиды РНК, которые не транслируются, а скорее функционируют как «продукты» РНК. Тип полинуклеотида (то есть ДНК или РНК) очевиден из контекста

использования этого термина. Полинуклеотид, упомянутый или идентифицированный полипептидом, который он кодирует, представляет собой и охватывает все подходящие последовательности в соответствии с вырожденностью кодонов. Полинуклеотиды, включая те, которые раскрыты в настоящем документе, включают последовательности с процентной идентичностью и гомологичные последовательности, если это указано.

[0053] «Полипептид» включает последовательность ковалентно соединенных аминокислот. Полипептиды включают природные, полусинтетические и синтетические белки и белковые фрагменты. «Полипептид» и «белок» могут использоваться взаимозаменяемо. Олигопептиды считаются более короткими полипептидами.

[0054] «Промотор» обозначает последовательность ДНК, которая вызывает транскрипцию последовательности ДНК, с которой она функционально связана, т.е. связана таким образом, чтобы обеспечить транскрипцию представляющей интерес нуклеотидной последовательности, когда присутствуют соответствующие сигналы и/или отсутствуют репрессоры. Транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида можно поставить под контроль любого промотора или энхансерного элемента, известного в данной области техники. Эукариотический промотор может быть функционально связан с ТАТА-боксом, и большинство эукариотических промоторов имеют ТАТА-боксы. ТАТА-бокс обычно расположен выше места начала транскрипции.

[0055] Полезные промоторы, которые можно использовать, включают, помимо прочего, область раннего промотора SV40, промотор SV40 E/L (ранний поздний), промотор, содержащийся в длинном 3'-концевом повторе вируса саркомы Рауса, регуляторные последовательности ген металлотioneина, главный промотор цитомегаловируса мыши или человека с немедленным ранним развитием (CMV-MIE) и другие промоторы CMV, включая промоторы CMVmin. Векторы экспрессии растений, содержащие промоторную область нопалинсинтетазы, промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты и промотор фотосинтетического фермента рибулозобифосфаткарбоксилазы; промоторные элементы дрожжей или других грибов, такие как промотор Gal 4, промотор ADC (алкогольдегидрогеназы), промотор PGK (фосфоглицеринкиназы), промотор щелочной фосфатазы и следующие области контроля транскрипции животных, которые проявляют тканеспецифичность и используются в трансгенные животные: эластаза I; инсулин; иммуноглобулин; вирус опухоли молочной железы мышей; альбумин; С.-фетопроtein; С.1-антитрипсин; 3-глобин и легкая цепь миозина-2. Предпочтительны различные формы промотора CMV, и в данном документе проиллюстрирован промотор CMVmin.

[0056] Минимальные промоторы, такие как промоторы CMVmin, обычно представляют собой укороченные или коровые промоторы и могут использоваться в системах контролируемой экспрессии. Минимальные промоторы более поддаются контролю. Минимальные промоторы и подходы к разработке широко известны и раскрыты, например, в Saxena *et al.*, *Methods Molec. Biol.* 1651:263-73 (2017); Ede *et al.*, *ACS Synth Biol.* 5:395-404 (2016); Brown *et al.*, *Biotech Bioeng.* 111:1638-47 (2014); Morita *et*

al., *Biotechniques* 0:1-5 (2012); Lagrange *et al.*, *Genes Dev.* 12:34-44 (1998). В данной области техники описано множество промоторов CMVmin. Также можно использовать последовательности ТАТА-боксов для выполнения роли промотора.

[0057] «Сайты узнавания рекомбиназы» (RRS), также известные как «сайты гетероспецифической рекомбинации», используются при опосредованной рекомбиназой замены кассеты (RMCE). Подходящими системами являются, например, Cre/Lox, Dre/Rox, Vre/Vlox, SCre/Slox и Flp/Frt. Подходящие RRS для использования согласно данным изобретениям включают Lox P, Lox 66, Lox 71, Lox 511, Lox 2272, Lox 2372, Lox 5171, Lox M2, Lox M3, Lox M7 и Lox M11. Эти сайты можно обозначать в общем как первый (1), второй (2), третий (3), четвертый (4), пятый (5), шестой (6), седьмой (7), восьмой (8), девятый (9), десятый (10) и т. д., как видно из контекста употребления.

[0058] «Регуляторный слитый белок» или «RFP» представляет собой белок, который содержит лиганд-связывающий домен и ДНК-связывающий домен, которые происходят из различных белков. Стероидсвязывающие домены ядерных рецепторов глюкокортикоидов или эстрогенов можно использовать в качестве лигандсвязывающих доменов. Обратный ДНК-связывающий домен Tet (rtTet) также полезен в качестве лигандсвязывающего домена и также может связывать ДНК. Типовыми RFP для применения в соответствии с описанными в данном документе изобретениями являются обратный трансаактиватор тетрациклина (rtTA) и слитый белок, содержащий домен, связывающий репрессор Arc (Arc), и домен, связывающий лиганд рецептора эстрогена (ArcER). Другие компоненты RFP включают ДНК-связывающий домен дрожжевого активатора GAL4, слитый с VP16 HSV; домен KRAB Kox1 человека, слитый с прокариотическим Tet-репрессором (TetR-KRAB); лиганд-связывающий домен эстрогенового рецептора (ER) к карбоксильному концу трансаактиватора tTA (TetR-VP16); и каталитически неактивную форму Cas9, слитую с повторами домена минимальной активации VP16 (dCas9-VP64). Другие слитые белки включают LexA-VP16 и LacI-VP16. Полинуклеотиды, кодирующие регуляторные слитые белки (например, rtTA и ArcEr), можно интегрировать в клеточный геном, как описано в данном документе.

[0059] «Белок-репрессор», также называемый «репрессором», представляет собой белок, который может связываться с ДНК для подавления транскрипции. Репрессоры имеют эукариотическое и прокариотическое происхождение. Прокариотические репрессоры являются предпочтительными. Примеры семейств репрессоров включают: Семейства TetR, LysR, LacI, ArsR, IcIR, MerR, AsnC, MarR, DeoR, GntR и Csr. Белки-репрессоры семейства TetR включают: белки ArcR, ActII, AmeR, AmrR, ArpR, BpeR, EnvR, EthR, HemR, HydR, IfeR, LanK, LfrR, LmrA, MtrR, Pip, PqrA, QacR, RifQ, RmrR, SimReg2, SmeT, SrpR, TcmR, TetR, TtgR, TrgW, UrdK, VarR YdeS, ArpA, BarA, Aur1B, CalR1, CprB, FarA, JadR*, JadR2, MphB, NonG, PhIF, TylQ, VanT, TarA, TylP, BM1P1, Bm3R1, ButR, CampR, CamR, DhaR, KstR, LexA-like, AcnR, PaaRR, PsbI, Th1R, UidR, YDH1, BetI, McbR, MphR, PhaD, Q9ZF45, TtK, Yhgd, YixD, CasR, IcaR, LitR, LuxR, LuxT, OpaR, Orf2, SmcR, NapR, Ef0113, HlyIIR, BarB, ScbR, MmfR, AmtR, PsrA и YjdC. См.

Ramos *et al.*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 69: 326-56 (2005). Другие репрессоры включают PurR, LacR, MetJ и PadR. Белки-репрессоры кодируются генами, называемыми «генами-репрессорами» или «генами белков-репрессоров».

[0060] Термин «репортерные белки», в контексте данного документа, относится к любому белку, способному прямо или косвенно генерировать обнаружимый сигнал. Репортерные белки обычно флуоресцируют или катализируют колориметрическую, или флуоресцентную реакцию, и их часто называют «флуоресцентными белками» или «цветными белками». Однако репортерный белок также может быть неферментативным и нефлуоресцентным, если его можно обнаружить с помощью другого белка или фрагмента, такого как белок клеточной поверхности, обнаруженный с помощью флуоресцентного лиганда. Репортерный белок также может представлять собой неактивный белок, который становится функциональным за счет взаимодействия с другим белком, который является флуоресцентным или катализирует реакцию. Соответственно, можно использовать любой подходящий репортерный белок, как это понимает специалист в данной области техники. В некоторых аспектах репортерный белок может быть выбран из флуоресцентного белка, люциферазы, щелочной фосфатазы, β -галактозидазы, β -лактамазы, дигидрофолатредуктазы, убиквитина и их вариантов. Флуоресцентные белки полезны для распознавания кассет генов, которые были или не были успешно вставлены и/или заменены, в зависимости от обстоятельств. Для обнаружения подходят жидкостная цитометрия и сортировка клеток, активируемая флуоресценцией. Примеры флуоресцентных белков хорошо известны в данной области техники, включая, помимо прочего, коралл *Discosoma* (DsRed), зеленый флуоресцентный белок (GFP), усиленный зеленый флуоресцентный белок (eGFP), цианофлуоресцентный белок (CFP), усиленный цианофлуоресцентный белок (eCFP), желтый флуоресцентный белок (YFP), усиленный желтый флуоресцентный белок (eYFP) и дальнекрасный флуоресцентный белок (например, mKate, mKate2, mPlum, mRaspberry или E2-crimson. См., например, патенты США № 9816110. Репортерные белки кодируются полинуклеотидами и называются в данном документе «генами-репортерами» или «генами репортерных белков». Репортерные гены и белки можно обозначать в общем как первый (1), второй (2), третий (3), четвертый (4), пятый (5), шестой (6), седьмой (7), восьмой (8), девятый (9), десятый (10) и т. д., как видно из контекста употребления. Репортеров можно рассматривать как своего рода маркер. «Цвет» или «флуоресцентный» в их различных грамматических формах также могут использоваться, более конкретно, для обозначения репортерного белка или гена.

[0061] «Селектируемые» или «селективные» маркерные белки включают белки, придающие определенные признаки, включая, помимо прочего, устойчивость к лекарственным средствам или другие селективные преимущества. Селективные маркеры могут придать клетке, получающей ген селектируемого маркера, устойчивость к определенному токсину, лекарству, антибиотику или другому соединению и позволить клетке продуцировать белок и размножаться в присутствии токсина, лекарства,

антибиотика или другого соединения, и их часто называют «положительными селективируемыми маркерами». Подходящие примеры маркеров устойчивости к антибиотикам включают, помимо прочего, белки, придающие устойчивость к различным антибиотикам, такие как канамицин, спектиномицин, неомицин, гентамицин (G418), ампициллин, тетрациклин, хлорамфеникол, пурамицин, гигромицин, зеоцин и/или бластицидин. Существуют и другие селективируемые маркеры, часто называемые «негативными селективируемыми маркерами», которые заставляют клетку прекращать размножение, останавливать выработку белка и/или являются летальными для клетки в присутствии отрицательных селективируемых маркерных белков. Тимидинкиназа и некоторые слитые белки могут служить отрицательными селективируемыми маркерами, включая, помимо прочего, GyrB-PKR. См. White *et al.*, *Biotechniques*, 50: 303-309 (May 2011). Селективируемые маркерные белки и соответствующие гены в общем можно обозначать как первый (1), второй (2), третий (3), четвертый (4), пятый (5), шестой (6), седьмой (7), восьмой (8), девятый (9), десятый (10) и т. д., как видно из контекста употребления.

[0062] «Стабильный сайт интеграции» или «SIS» представляет собой область сайт-специфической интеграции полинуклеотидов ДНК, включая кассеты, которые содержат гены и/или другие открытые рамки считывания, промоторы и, необязательно, другие элементы. Стабильные сайты интеграции могут быть созданы в соответствии со способами изобретений, описанными и изображенным в данном документе. Конструкции могут быть вставлены в SIS различными способами. Множественные сайты стабильной интеграции могут быть созданы и расположены на разных хромосомах, в разных областях одной и той же хромосомы или в разных положениях в одной и той же области хромосомы.

[0063] «Элемент ответа на тетрациклин» или «TRE» содержит семь копий 19-нуклеотидного TetO, разделенных спейсерами, содержащими 17-18 нуклеотидов, и коммерчески доступны. Последовательности TetO могут варьироваться, и известны нуклеотидные замены. Например, измененные последовательности на основе оператора Tet раскрыты в Wissmann *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 14: 4253-66 (1986). Спейсеры не являются специфичными для последовательности. Спейсеры могут быть одинаковыми, но не все должны быть идентичными. TRE считается типом оператора, используемого в данном документе.

[0064] Все числовые пределы и диапазоны, изложенные в данном документе, включают все числа или значения около них или между числами диапазона или предела. Описанные в данном документе диапазоны и пределы явно обозначают и устанавливают все целые, десятичные и дробные значения, определенные и охватываемые диапазоном или пределом. Описанные в данном документе диапазоны и пределы явно обозначают и устанавливают все целые, десятичные и дробные значения, определенные и охватываемые диапазоном или пределом. Таким образом, перечисление диапазонов значений в данном документе просто предназначено для использования в качестве сокращенного метода

индивидуальной ссылки на каждое отдельное значение, попадающее в этот диапазон, если иное не указано в данном документе, и каждое отдельное значение включено в спецификацию, как если бы оно было отдельно изложено в данном документе.

Подробное описание сущности изобретения

[0065] Данные изобретения обычно относятся к конструкциям, которые обеспечивают жесткий контроль транскрипции полинуклеотидной последовательности в клетке. Данные изобретения основаны на исследовании и определении возможности создания стабильных клеток, транскрибирующих полинуклеотидные последовательности, причем транскрипция полинуклеотидной последовательности контролируется контролируемой системой экспрессии. Клетки, экспрессирующие полинуклеотидные последовательности, причем транскрипция представляющей интерес полинуклеотидной последовательности контролируется управляемой системой экспрессии, описанной в данном документе, могут быть использованы в широком спектре применений. Представляющая интерес полинуклеотидная последовательность может кодировать представляющий интерес полипептид или представляющий интерес продукт. Описанная в данном документе система контролируемой экспрессии особенно полезна для контроля экспрессии представляющих интерес полипептидов и/или представляющих интерес продуктов, которые являются токсичными или ингибирующими для клетки-хозяина.

[0066] Описанные в данном документе клетки обладают особым преимуществом, заключающимся в их стабильности. Под «стабильным» подразумевается, что клетку можно использовать для создания клеточной линии, имеющей представляющие интерес области, функционально гомогенные в культуре. Представляющие интерес области могут включать, например, представляющие интерес полинуклеотиды и связанные с ними промоторы, операторы, внутренние сайты входа в рибосомы (IRES), сигналы полиаденилирования и нетранслируемые РНК, которые можно отслеживать.

[0067] Кроме того, клетки, описанные в данном документе, обеспечивают дополнительное преимущество, заключающееся в том, что транскрипция полинуклеотида, кодирующего представляющий интерес полипептид, строго контролируется, так что клетки способны дожить до стадии, позволяющей крупномасштабную экспрессию представляющего интерес полипептида. Под «жестким контролем» подразумевается, что в отсутствие первого лиганда (альтернативно также в присутствии первого лиганда) и присутствии второго лиганда транскрипция полинуклеотидной последовательности, кодирующей представляющий интерес полипептид, существенно снижается. Наиболее жесткий контроль достигается при отсутствии первого лиганда и присутствии второго лиганда. Например, в некоторых вариантах реализации в подавленном состоянии достигается по меньшей мере 10-кратное снижение транскрипции относительно уровня транскрипции, наблюдаемого в присутствии первого лиганда и отсутствии второго лиганда в индуцированном состоянии. В некоторых вариантах реализации в подавленном состоянии достигается по меньшей мере 20-кратное снижение транскрипции относительно уровня транскрипции, наблюдаемого в присутствии первого лиганда и

отсутствии второго лиганда в индуцированном состоянии. В некоторых вариантах реализации в подавленном состоянии достигается по меньшей мере 50-кратное снижение транскрипции относительно уровня транскрипции, наблюдаемого в присутствии первого лиганда и отсутствии второго лиганда в индуцированном состоянии. В некоторых вариантах реализации в подавленном состоянии достигается по меньшей мере 100-кратное снижение транскрипции относительно уровня транскрипции, наблюдаемого в присутствии первого лиганда и отсутствии второго лиганда в индуцированном состоянии. В некоторых вариантах реализации в подавленном состоянии достигается по меньшей мере 500-кратное снижение транскрипции относительно уровня транскрипции, наблюдаемого в присутствии первого лиганда и отсутствии второго лиганда в индуцированном состоянии.

[0068] Как следствие репрессированного состояния, степень индукции транскрипции представляющей интерес полинуклеотидной последовательности, наблюдаемая в присутствии первого лиганда и отсутствии второго лиганда, может быть по меньшей мере в 10 раз выше в некоторых вариантах реализации, чем в репрессированном состоянии. В некоторых вариантах реализации степень индукции транскрипции представляющей интерес полинуклеотидной последовательности, наблюдаемая в присутствии первого лиганда и в отсутствие второго лиганда, может быть по меньшей мере в 20 раз выше, чем в репрессированном состоянии. В некоторых вариантах реализации степень индукции транскрипции представляющей интерес полинуклеотидной последовательности, наблюдаемая в присутствии первого лиганда и в отсутствие второго лиганда, может быть по меньшей мере в 50 раз выше, чем в репрессированном состоянии. В некоторых вариантах реализации степень индукции транскрипции представляющей интерес полинуклеотидной последовательности, наблюдаемая в присутствии первого лиганда и в отсутствие второго лиганда, может быть по меньшей мере в 100 раз выше, чем в репрессированном состоянии. В некоторых вариантах реализации степень индукции транскрипции представляющей интерес полинуклеотидной последовательности, наблюдаемая в присутствии первого лиганда и в отсутствие второго лиганда, может быть по меньшей мере в 500 раз выше, чем в репрессированном состоянии.

[0069] Степень или количество транскрипции представляющей интерес полинуклеотидной последовательности можно определить способами, известными специалистам в данной области техники. Например, уровень экспрессии представляющего интерес полипептида в клетке-хозяине можно определить на основании количества соответствующей мРНК, присутствующей в клетке. Информационная РНК, транскрибированная с полинуклеотидной последовательности, может быть количественно определена различными методами, известными специалистам в данной области, включая, помимо прочего, нозерн-блот-гибридизацию, рибонуклеазную защиту РНК, гибридизацию *in situ* с клеточной РНК или ПЦР.

[0070] В качестве дополнительного примера уровень экспрессии представляющего

интерес полипептида в клетке-хозяине также можно определить на основании количества представляющего интерес полипептида, кодируемого выбранной последовательностью. Полипептиды, кодируемые полинуклеотидной последовательностью, можно количественно оценить различными методами, известными специалистам в данной области техники, включая, помимо прочего, ИФА, вестерн-блоттинг, радиоиммуноанализы, иммунопреципитацию, анализ биологической активности полипептида, иммуноокрашивание полипептида с последующим FACS-анализом или гомогенного флуоресцентного анализа с временным разрешением (HTRF).

Контролируемые системы транскрипции и экспрессии

[0071] Данные изобретения относятся к контролируемой системе транскрипции и экспрессии, которую можно использовать для контроля транскрипции любой представляющей интерес полинуклеотидной последовательности. Описанная управляемая система транскрипции и экспрессии содержит по меньшей мере две управляемые операторные системы. Одна из операторных систем может быть расположена на 5'-конце промотора, который функционально связан с представляющей интерес полинуклеотидной последовательностью, а вторая операторная система может быть расположена на 3'-конце промотора. Операторные системы могут содержать операторы, функционально связанные с промотором, который управляет транскрипцией представляющей интерес полинуклеотидной последовательности. Представляющий интерес полинуклеотид может кодировать представляющий интерес полипептид и/или продукт (например, РНК).

[0072] Контролируемая транскрипция, как описано в настоящем документе, позволяет осуществлять транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида в присутствии первого лиганда и в отсутствие второго лиганда. Кратко, когда он присутствует, первый лиганд связывается с сайтом связывания лиганда на первом регуляторном слитом белке (RFP), который содержит (1) домен, активирующий транскрипцию, слитый с ДНК-связывающим доменом; и (2) лигандсвязывающий домен. При связывании первого лиганда с лигандсвязывающим доменом первого RFP ДНК-связывающий домен первого RFP связывается с первым оператором, обеспечивая транскрипцию с промотора, но только в том случае, если транскрипция не ингибируется второй операторной системой. Вторая операторная система контролируется вторым лигандом. Кратко, когда он присутствует, второй лиганд связывается с сайтом связывания лиганда на втором регуляторном слитом белке (RFP), который содержит (1) домен, блокирующий транскрипцию, слитый с ДНК-связывающим доменом; и (2) лигандсвязывающий домен. При связывании второго лиганда с лигандсвязывающим доменом второго RFP ДНК-связывающий домен второго RFP связывается со вторым оператором, блокируя транскрипцию с промотора. Таким образом, в присутствии второго лиганда и отсутствии первого транскрипция подавляется; тогда как в отсутствие второго лиганда и присутствии первого лиганда транскрипция присутствует. На Фиг. 1, 4, 6 и 7 проиллюстрированы примеры контроля транскрипции с использованием этой системы.

[0073] Первая операторная система может содержать по меньшей мере один

оператор, функционально связанный с промотором, который управляет транскрипцией представляющей интерес полинуклеотидной последовательности. Оператор первой операторной системы может располагаться с 5'-конца к промотору, который функционально связан с представляющей интерес полинуклеотидной последовательностью. Примеры таких конфигураций показаны на Фиг. 1, 4, 6 и 7, причем первая операторная система содержит TRE.

[0074] Первая операторная система также может содержать регуляторный слитый белок (RFP), который содержит (1) домен, активирующий транскрипцию, слитый с ДНК-связывающим доменом; и (2) лигандсвязывающий домен. Первая операторная система может дополнительно содержать лиганд, который связывается с лигандсвязывающим доменом первого RFP. При связывании лиганда с лигандсвязывающим доменом первого RFP ДНК-связывающий домен RFP связывается с оператором, например, TRE, тем самым обеспечивая транскрипцию с промотора, но только в том случае, если транскрипция не ингибируется второй операторной системой, как обсуждается в данном документе. Другие компоненты системы известны специалистам в данной области техники и включают, например, тетрациклин в системах (Tet-On), тетрациклин в усовершенствованных системах (Tet-On Advanced), тетрациклин в системах 3G (Tet-On 3G), куматиндуцируемые системы, индуцируемые лактозой системы и их варианты.

[0075] Вторая операторная система может быть расположена со стороны 3'-конца от промотора, который функционально связан с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей представляющий интерес полипептид. Примеры таких конфигураций показаны на Фиг. 1, 4, 6 и 7. Второй регуляторный элемент содержит по меньшей мере один оператор, который функционально связан с промотором, который управляет транскрипцией представляющей интерес полинуклеотидной последовательности. Примеры таких конфигураций показаны на Фиг. 1, 4, 6 и 7, причем вторая система операторов содержит либо оператор тетрациклина (TetO), либо оператор Arc (ArcO). В некоторых вариантах реализации вторым оператором является TetO (Фиг. 4). В некоторых вариантах реализации вторым оператором является ArcO (Фиг. 1, 6 и 7).

[0076] В качестве неограничивающего примера подходящие управляемые компоненты оператора для второй операторной системы описаны в патенте США № 9469856.

[0077] Подходящие промоторы для применения с описанной системой известны и могут быть определены специалистами в данной области техники в комбинациях по выбору. В некоторых вариантах реализации промотор, функционально связанный с полинуклеотидными последовательностями, может быть выбран, помимо прочего, из области раннего промотора SV40, промотора E/L SV40, промотора, содержащегося в длинном 3'-концевом повторе вируса саркомы Рауса, регуляторных последовательностей гена металлотioneина, главного раннего промотора цитомегаловируса мыши или человека (MIE); промоторов CMVmin, растительных векторов экспрессии, содержащих промоторную область нопалинсинтетазы, промотора 35S РНК вируса мозаики цветной

капусты и промотора фотосинтетического фермента рибулозобифосфаткарбоксилазы; промоторных элементов дрожжей или других грибов, таких как промотор Gal 4, промотора ADC (алкогольдегидрогеназы), промотора PGK (фосфоглицеринкиназы), промотора щелочной фосфатазы и следующих областей контроля транскрипции животных, которые проявляют тканеспецифичность и используются в трансгенные животные: эластазы I; инсулина; иммуноглобулина; вируса опухоли молочной железы мышей; альбумина; α -фетопротеина; α 1-антитрипсина; β -глобина; и легкой цепи-2 миозина. В некоторых вариантах реализации промотор представляет собой CMV-MIEmin человека или другие промоторы CMVmin. Подходы к разработке минимальных промоторов описаны в Saxena *et al.*, *Methods Molec. Biol.* 1651:263-73 (2017); Ede *et al.*, *ACS Synth Biol.* 5:395-404 (2016); Brown *et al.*, *Biotech Bioeng.* 111:1638-47 (2014); Morita *et al.*, *Biotechniques* 0:1-5 (2012); Lagrange *et al.* *Genes Dev.* 12:34-44 (1998).

[0078] В некоторых вариантах реализации представляющая интерес полинуклеотидная последовательность кодирует представляющий интерес полипептид. Представляющий интерес полинуклеотид может представлять собой нативный ген, включая его варианты, или синтетическую, полусинтетическую или оптимизированную последовательность. В других вариантах реализации представляющая интерес полинуклеотидная последовательность кодирует представляющий интерес продукт (например, РНК). Более конкретно, представляющие интерес продукты могут представлять собой некодирующие РНК.

[0079] «Представляющий интерес белок» или «представляющий интерес полипептид» (POI) могут иметь любую аминокислотную последовательность и включают любой белок, полипептид или пептид, а также их производные, компоненты, домены, цепи и фрагменты. Включены, помимо прочего, вирусные белки, бактериальные белки, грибковые белки, растительные белки и животные (включая белки человека) белки. Типы белков могут включать, помимо прочего, антитела, биспецифические антитела, мультиспецифические антитела, цепи антител (включая тяжелые и легкие), фрагменты антител, фрагменты Fv, фрагменты Fc, Fc-содержащие белки, слитые с Fc белки, рецепторные Fc-слитые белки, рецепторы, рецепторные домены, белки-ловушки и мини-ловушки, ферменты, факторы, репрессоры, активаторы, лиганды, репортерные белки, селективные белки, белковые гормоны, белковые токсины, структурные белки, запасные белки, транспортные белки, нейротрансмиттеры и сократительные белки. Производные, компоненты, цепи и фрагменты вышеперечисленного также включены. Последовательности могут быть природными, полусинтетическими или синтетическими. Представляющие интерес белки и представляющие интерес полипептиды кодируются «представляющими интерес генами», которые также можно называть «представляющими интерес полинуклеотидами». Если интегрировано несколько генов (одинаковых или разных), их можно называть «первым», «вторым», «третьим», «четвертым», «пятым», «шестым», «седьмым», «восьмым», «девятым», «десятым» и т. д., как видно из контекста применения.

[0080] Представляющий интерес полипептид также может включать цитотоксические белки, такие как вирусные белки. Например, аденовирусы E1A, E1B, E2A и E4 используются для выполнения функций по производству аденоассоциированного вируса (AAV), но, как сообщается, они оказывают токсическое воздействие на определенные типы клеток. Сообщалось также, что AAV Rep обладает цитотоксичностью в отношении определенных типов клеток. Кроме того, белки, используемые при генетических изменениях, такие как рекомбиназа Cre, рекомбиназа Flp, белки и димеры цинковых пальцев (ZFN), TALEN, интегразы bxb 1, CRISPR-ассоциированные белки (типы I-VI; включая Cas1, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9, Cas10, Cas11, Cas12 и Cas13) и другие нуклеазы, и интегразы могут представлять собой POI и, таким образом, контролироваться в соответствии с данным изобретением.

Клетки, способные к контролируемой транскрипции и экспрессии

[0081] В одном аспекте предложена клетка, содержащая промотор, функционально связанный с представляющей интерес полинуклеотидной последовательностью, при этом промотор контролируется по меньшей мере двумя операторами, функционально связанными с промотором. Промотор, функционально связанный с представляющей интерес полинуклеотидной последовательностью, операторы, функционально связанные с промотором, могут быть интегрированы в геном клетки. Транскрипция представляющей интерес полинуклеотидной последовательности контролируется операторами, что позволяет разрешить или подавить транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида по своему усмотрению.

[0082] Клетки, подходящие для применения по данным изобретениям, могут быть легко выбраны специалистами в данной области техники. В некоторых вариантах реализации линия клеток представляет собой линию эукариотических клеток, такую как линия клеток дрожжей, линия клеток насекомых (например, клетки Sf9 и Sf21) или линия клеток млекопитающих. Предпочтительные клетки млекопитающих включают клетки приматов (включая человека), клетки собак и клетки грызунов. Клетки могут быть первичными клетками или иммортализованными клетками. Подходящие клетки могут быть выбраны из клеток Vero, клеток COS, клеток HEK293, клеток HeLa, клеток CHO, клеток ВНК, клеток Sp2/0, клеток MDCK, амниотических клеток (включая клетки человека), эмбриональных клеток, клеточных линий, трансфицированных вирусными генами, например, AD5 E1, включая, помимо прочего, иммортализованную клетку сетчатки человека, трансфицированную геном аденовируса, например, клетку PER.C6 или клетку NSO. В некоторых вариантах реализации клетка представляет собой линию клеток яичника китайского хомячка (CHO). Некоторые примеры клеток CHO включают, помимо прочего, CHO-ori, CHO-K1, CHO-s, CHO-DHB11, CHO-DXB11, CHO-K1SV, и их мутанты/варианты. В дополнительных предпочтительных вариантах реализации клетка CHO может представлять собой клеточную линию CHO, обозначенную K1. Примеры клеток HEK293 включают, помимо прочего, HEK293, HEK293A, HEK293E, HEK293F, HEK293FT, HEK293FTM, HEK293H, HEK293MSR, HEK293S, HEK293SG, HEK293SGGD,

НЕК293Т и их мутанты, и варианты.

[0083] Иллюстрация конструкций, используемых при создании клеток, экспрессирующих полинуклеотидные последовательности, кодирующие малиновый флуоресцентный белок, показана на Фиг. 1. Конструкция содержит кассету экспрессии, содержащую полинуклеотидные последовательности, кодирующие представляющий интерес ген (например, малинового флуоресцентного белка), по меньшей мере один промотор и по меньшей мере два оператора. Вкратце, как показано на Фиг. 1, транскрипция полинуклеотидных последовательностей, кодирующих малиновый флуоресцентный белок, с промотора CMV_{min} контролируется оператором тетрациклина (TetO) и оператором Arc (AO или ArcO).

[0084] В некоторых вариантах реализации клетка дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую один или более регуляторных слитых белков (RFP). RFP может содержать (а) домен, активирующий транскрипцию, слитый с ДНК-связывающим доменом, и (b) лигандсвязывающий домен. Лиганд способен связываться с лигандсвязывающим доменом RFP.

[0085] В некоторых вариантах реализации клетка дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую один или более регуляторных слитых белков (RFP), регуляторных белков или белков-репрессоров. RFP может содержать (а) домен, блокирующий транскрипцию, слитый с ДНК-связывающим доменом, и (b) лигандсвязывающий домен. Домен, блокирующий транскрипцию, может содержать ДНК-связывающий домен Arc-репрессора. Регуляторным белком может быть TetR. Ингибирование транскрипции представляющего интерес полинуклеотида путем связывания с оператором Tet или Arc. В некоторых вариантах реализации оператор представляет собой Tet, и домен, блокирующий транскрипцию, представляет собой репрессор Tet. В других вариантах реализации оператор представляет собой Arc, и домен, блокирующий транскрипцию, представляет собой ДНК-связывающий домен репрессора Arc.

[0086] Клетки могут дополнительно содержать элементы, которые регулируют транскрипцию полинуклеотидной последовательности(й), кодирующей один или более регуляторных слитых белков (RFP). В качестве неограничивающего примера, транскрипция полинуклеотидной последовательности(ей), кодирующей один или более регуляторных слитых белков (RFP), может контролироваться системой Tet-On, так что полинуклеотидная последовательность(и), кодирующая один или более регуляторных слитых белков (RFP), транскрибируется только в присутствии Dox. В другом варианте транскрипция rTA (RFP) необязательно может находиться под контролем ArcER и AO.

[0087] В некоторых случаях представляющая интерес полинуклеотидная последовательность, а также функционально связанные промотор и операторы могут быть введены в клетку путем трансфекции плазмиды, содержащей указанные полинуклеотидные последовательности и элементы. Соответственно, изобретения включают получение описанных клеток и клеток, содержащих описанную плазмидную

конструкцию.

[0088] Подходящие плазмидные конструкции могут быть созданы специалистами в данной области техники. Полезные регуляторные элементы, описанные ранее или известные в данной области техники, также могут быть включены в плазмидные конструкции, используемые для трансфекции клеток. Некоторые неограничивающие примеры полезных регуляторных элементов включают, помимо прочего, промоторы, энхансеры, последовательности, кодирующие подходящие сайты связывания рибосом мРНК, и последовательности, которые контролируют терминацию транскрипции и трансляции. Подходящие плазмидные конструкции также могут содержать нетранскрибируемые элементы, такие как точка начала репликации, другие 5'- или 3'-фланкирующие нетранскрибируемые последовательности и 5'- или 3'-нетранслируемые последовательности, такие как донорные и акцепторные сайты сплайсинга. Также могут быть включены один или более маркерных генов. Маркеры, полезные для использования в данном изобретении, известны и могут быть легко идентифицированы специалистами в данной области техники.

[0089] Плазмидная конструкция, кодирующая представляющий интерес ген, может быть доставлена в клетку с использованием вирусного вектора или невирусного метода переноса.

[0090] Невирусные методы переноса нуклеиновой кислоты включают голую нуклеиновую кислоту, липосомы и конъюгаты белок/нуклеиновая кислота. Плазмидная конструкция, которую вводят в клетку, может быть линейной или кольцевой, может быть одноцепочечной или двухцепочечной и может представлять собой ДНК, РНК или любую их модификацию или комбинацию.

[0091] Плазмидную конструкцию можно ввести в клетку путем трансфекции. Специалисты в данной области знают множество различных протоколов трансфекции и могут выбрать подходящую систему для использования при трансфекции клеток. Как правило, методы трансфекции включают, помимо прочего, вирусную трансдукцию, катионную трансфекцию, трансфекцию липосомами, трансфекцию дендримерами, электропорацию, тепловой шок, трансфекцию нуклеофекцией, магнитофекцию, наночастицы, доставку биолистическими частицами (генная пушка) и запатентованные реагенты для трансфекции, такие как Липофектамин, Dojindo Hilymax, Fugene, jetPEI, Effectene или DreamFect.

[0092] При введении в клетку некоторые полинуклеотидные последовательности из плазмидной конструкции могут быть интегрированы в геном клетки, например, в хромосому. В некоторых случаях интеграция полинуклеотидной последовательности в геном может быть достигнута с помощью lox-сайтов.

[0093] В одном из вариантов промотор, функционально связанный с представляющими интерес полинуклеотидными последовательностями, первый оператор, функционально связанный с промотором, и второй оператор интегрированы в геном клетки. Другие полинуклеотиды, такие как полинуклеотиды, кодирующие регуляторные

слитые белки (например, rtTA и ArcEr) и белки-репрессоры (например, TetR), также можно интегрировать в клеточный геном, как описано в данном документе.

[0094] В некоторых вариантах реализации геномная интеграция является случайной. Способы достижения случайной геномной интеграции известны специалистам в данной области техники, и подходящие средства могут быть идентифицированы специалистами. Например, линеаризованную плазмиду с маркером селекции можно использовать для геномной интеграции в случайных местах.

[0095] В некоторых вариантах реализации геномная интеграция является сайт-специфичной. Сайт-специфическая интеграция относится к интеграции в определенном сайте хромосомы. Способы достижения сайт-специфической интеграции известны специалистам в данной области техники, и подходящие подходы могут быть идентифицированы специалистами в данной области. В качестве неограничивающего примера один из подходов к сайт-специфической интеграции в клетках CHO описан в патенте США № 7771997 («Стабильный сайт 1»), который включен в данный документ посредством ссылки, включая информацию о последовательности. В патенте США № 7771997 описаны сайты интеграции, расположенные в областях повышенной экспрессии и стабильности. Другой подходящий сайт интеграции описан в патенте США № 9816110 («Стабильный сайт 2»), который включен в данный документ посредством ссылки, включая информацию о последовательности. Regeneron предоставляет набор товаров и услуг под названием EESYR®. Клетки CHO с интегрированными последовательностями в стабильном сайте 1 и стабильном сайте 2 раскрыты в патенте США 2019/0233544 A1, который включен в настоящий документ посредством ссылки, включая информацию о последовательностях. Последовательности, представленные в этих патентах и Примерах 6 и 7, можно использовать согласно изобретениям, описанным и изображенным в данном документе. Кроме того, согласно данным изобретениям можно применять AAVS1-подобную область и локус COSMC в клетках хомячка.

[0096] Для клеток человека, таких как клетки HEK293, интеграция может быть достигнута с использованием сайта интеграции аденоассоциированного вируса 1 (AAVS1) посредством соответствующих плазмид. См. Lou *et al.*, *Human Gene Therapy Methods*, 28: 124-38 (2017); Liu *et al.*, *BMC Research Note*, 7:626 (2014). Сообщается, что AAVS1 расположен в хромосоме 19. Дополнительные сайты включают CCR5 и Rosa26.

[0097] Модификацию клеточных геномов можно проводить с помощью известных подходов, таких как Cre/Lox, Flp/Frt, эффекторная нуклеаза, подобная активатору транскрипции (TALEN), слитый белок эффекторного домена TAL, нуклеаза с цинковым пальцем (ZFN), димер ZFN или эндонуклеазная система ДНК, управляемая РНК, такая как CRISPR/Cas9. См. патент США № 9816110 в столбцах 17-18; Sajgo *et al.*, *PLoS ONE* 9: e91435 (2014); Suzuki *et al.*, *Nucl. Acids. Res.* 39: e49 (2011). Также можно провести модификацию с использованием интегразы Vxb1 в клетках человека, мыши и крысы. Russell *et al.*, *Biotechniques* 40: 460-64 (2006).

[0098] Чтобы максимизировать стабильность и эффективность, а также облегчить

интеграцию и контроль над изобретениями, можно создать стабильные места интеграции (SIS) с использованием геномных безопасных гаваней и т.п. в широком диапазоне типов и линий клеток в соответствии с указаниями патента номера США 63/256675. Описания (включая примеры) и фигуры, показывающие способы и клетки, полученные на основе способов патента США 63/256675, включены в настоящее описание посредством ссылки.

[0099] Соответственно, в клетке можно использовать подходы к сайт-специфическому и случайному интегрированию. Наконец, полинуклеотиды могут быть интегрированы в нехромосомные места, известные специалисту в данной области техники, такие как эписомы.

[00100] В некоторых вариантах реализации клетки, описанные в данном документе, могут содержать полинуклеотидную последовательность, кодирующую маркер. В одном из вариантов реализации полинуклеотидная последовательность, кодирующая маркер, связана с полинуклеотидными последовательностями, кодирующими представляющий интерес полинуклеотид. Полинуклеотидная последовательность, кодирующая маркер, может быть связана с представляющими интерес полинуклеотидными последовательностями, так что если представляющая интерес полинуклеотидная последовательность интегрирована, то и маркерная полинуклеотидная последовательность также интегрируется. Маркеры, полезные для использования в данном изобретении, известны и могут быть легко идентифицированы специалистами в данной области и включают, помимо прочего, селективируемые маркеры (такие как маркеры лекарственной устойчивости) и репортерные белки, такие как колориметрические/флуоресцентные маркеры.

Способы контроля экспрессии полипептидов

[00101] В другом аспекте данного изобретения предложены способы контроля транскрипции представляющего интерес гена в клетке, как описано. Данный способ находит применение в широком спектре применений, включая, в качестве неограничивающих примеров, получение белков/продуктов, представляющих интерес для терапевтических целей.

[00102] Данные изобретения предлагают способы контроля экспрессии представляющего интерес полипептида в клетке. В некоторых вариантах реализации представляющий интерес полипептид является токсичным или ингибирующим для клетки, например, вирусный ген.

[00103] Производство представляющего интерес белка или продукта начинается с рабочего банка клеток (WCB), который обычно хранится в замороженном виде. WCB будет содержать клетки в отсутствие или в присутствии первого лиганда (например, dox) и в присутствии второго лиганда (например, ОНТ), как определит специалист в данной области техники. WCB размораживают и используют для создания семенной культуры (также известной как «посевной поезд»). На стадии посевной культуры клетки можно размножить в отсутствие или в присутствии первого лиганда и в отсутствие второго лиганда, как определяет специалист в данной области техники. По мере снижения

эффективности ингибирования транскрипции вторым лигандом, обычно через около 4-14 дней после посева (хотя временной ход можно изменить, например, добавив дополнительный второй лиганд в среду для культивирования клеток, чтобы задержать потерю эффективности). После стадии культивирования посевной культуры может начаться производство представляющего интерес белка или продукта. Неограничивающие примеры вариантов реализации обсуждаются ниже для дополнительной иллюстрации аспектов изобретений.

[00104] Предложены способы и композиции для облегчения контроля транскрипции представляющей интерес полинуклеотидной последовательности в культуре клеток в различных масштабах (например, от настольного до биореактора). Кроме того, также предложены способы и композиции для достижения отсроченной транскрипции представляющего интерес полинуклеотида в клетках в культуре, которые основаны на переходе от присутствия второго лиганда к присутствию первого лиганда и отсутствию второго лиганда. Отложенная транскрипция включает транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида только после или в момент времени, после которого клетки выросли до желаемой плотности. В общем, при некоторых обстоятельствах желательно позволить клеткам достичь желаемой плотности, например, около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% (т.е. около от 10 до 100%) от максимально достижимой плотности в культуре, прежде чем произойдет желаемый объем транскрипции представляющей интерес полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах реализации желательна плотность клеток от около 90 до около 100% до полной транскрипции представляющей интерес полинуклеотидной последовательности.

[00105] В некоторых вариантах реализации желательна плотность клеток по меньшей мере 400000 жизнеспособных клеток на мл до полной транскрипции представляющей интерес полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах реализации желательна плотность клеток по меньшей мере 500000 жизнеспособных клеток на мл до полной транскрипции представляющей интерес полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах реализации желательна плотность клеток по меньшей мере 600000 жизнеспособных клеток на мл до полной транскрипции представляющей интерес полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах реализации желательна плотность клеток по меньшей мере 700000 жизнеспособных клеток на мл до полной транскрипции представляющей интерес полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах реализации желательна плотность клеток по меньшей мере 800000 жизнеспособных клеток на мл до полной транскрипции представляющей интерес полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах реализации желательна плотность клеток по меньшей мере 900000 жизнеспособных клеток на мл до полной транскрипции представляющей интерес полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах реализации желательна плотность клеток по меньшей мере один миллион жизнеспособных клеток на мл до полной транскрипции

представляющей интерес полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах реализации желателна плотность клеток по меньшей мере два миллиона жизнеспособных клеток на мл до полной транскрипции представляющей интерес полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах реализации желателна плотность клеток по меньшей мере три миллиона жизнеспособных клеток на мл до полной транскрипции представляющей интерес полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах реализации желателна плотность клеток по меньшей мере четыре миллиона жизнеспособных клеток на мл до полной транскрипции представляющей интерес полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах реализации желателна плотность клеток по меньшей мере пять миллионов жизнеспособных клеток на мл до полной транскрипции представляющей интерес полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах реализации желателна плотность клеток по меньшей мере шесть миллионов жизнеспособных клеток на мл до полной транскрипции представляющей интерес полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах реализации желателна плотность клеток по меньшей мере семь миллионов жизнеспособных клеток на мл до полной транскрипции представляющей интерес полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах реализации желателна плотность клеток по меньшей мере восемь миллионов жизнеспособных клеток на мл до полной транскрипции представляющей интерес полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах реализации желателна плотность клеток по меньшей мере девять миллионов жизнеспособных клеток на мл до полной транскрипции представляющей интерес полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах реализации желателна плотность клеток по меньшей мере десять миллионов жизнеспособных клеток на мл до полной транскрипции представляющей интерес полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах реализации желателна плотность клеток по меньшей мере двенадцать миллионов жизнеспособных клеток на мл до полной транскрипции представляющей интерес полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах реализации желателна плотность клеток по меньшей мере пятнадцать миллионов жизнеспособных клеток на мл до полной транскрипции представляющей интерес полинуклеотидной последовательности. Типичные диапазоны могут составлять от 400000 до 3 миллионов. Другие приемлемые диапазоны включают от 1 до 15 миллионов, от 2 до 12 миллионов, от 3 до 10 миллионов, от 4 до 9 миллионов, от 5 до 8 миллионов и от 6 до 7 миллионов, а также любой поддиапазон в пределах любого из этих диапазонов. как это очевидно для специалиста в данной области техники с учетом этого документа.

[00106] Отсроченная индукция транскрипции может быть достигнута с помощью любой подходящей методики, описанной в данном документе. В различных вариантах реализации отсроченная индукция может быть достигнута путем выращивания клеток до желаемой плотности клеток в присутствии эффективного количества второго лиганда. Принимая во внимание идеи, содержащиеся в данном документе, временной ход ингибирования можно определить путем выбора временного периода для поддержания

эффективного количества второго лиганда в клеточной культуре. Удаление второго лиганда может быть достигнуто, например, путем (i) отделения клеток от среды, содержащей второй лиганд, (ii) разведения культуры клеток средой, которая не содержит второй лиганд, и/или (iii) расщепление смеси клеток и среды так, что второй лиганд затем присутствует на уровне ниже эффективного количества (например, количество второго лиганда, которое существенно не ингибирует или не ингибирует транскрипцию представляющей интерес полинуклеотидной последовательности), иногда называемое клирингом. В различных вариантах реализации клетки первоначально выращивают и/или хранят (например, в рабочем банке клеток (WCB)) с эффективным количеством второго лиганда.

[00107] В различных вариантах реализации культуры клеток можно размножить в среде, в которой отсутствует эффективное количество второго лиганда. Более конкретно, во время размножения культура клеток имеет эффективное количество первого лиганда и не имеет эффективного количества второго лиганда в течение периода времени, достаточного для того, чтобы позволить второму лиганду очиститься, обычно от 4 до 14 дней, в зависимости от второго лиганда и условий культивирования.

[00108] В других вариантах реализации, как только желаемый размер культуры достигнут и второй лиганд больше не ингибирует эффективно транскрипцию клеточной культуры, представляющий интерес полинуклеотид можно транскрибировать в присутствии эффективного количества первого лиганда. Эффективное количество первого лиганда можно добавить к клеточной культуре в любое подходящее время. Например, эффективное количество первого лиганда можно добавить во время посева. В другом примере эффективное количество первого лиганда можно добавить в более поздний момент времени, например, когда второй лиганд удаляется или уже удален.

[00109] Специалист в данной области техники сможет определить подходящую концентрацию первого и второго лигандов для достижения эффективных количеств на протяжении всего процесса. Примеры концентраций лиганда могут включать от около 100 до около 1000 нМ, от около 100 до 900 нМ, от 100 до 800 нМ, от около 100 до 700 нМ, от 100 до 600 нМ, от 100 до 500 нМ, от 100 до 400 нМ, от 100 до 300 нМ, в конкретном варианте от около 200 до около 500 нМ, в другом конкретном варианте реализации - около 400 нМ. Могут быть использованы и другие концентрации.

[00110] Все способы, описанные в данном документе, могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если иное не указано в данном документе или иное явно не противоречит контексту. Применение любых и всех примеров или примерных формулировок (например, «таких как»), представленных в данном документе, предназначено просто для лучшего освещения изобретений и не накладывает ограничения на объем изобретений, если не заявлено иное. Никакие формулировки в описании не должны быть истолкованы как указывающие на какой-либо не заявленный элемент как существенный для практического применения изобретений. Поскольку различные изменения могут быть внесены в описанные выше композиции и способы без отклонения

от объема изобретений, предполагается, что весь материал, содержащийся в приведенном выше описании и в примерах, приведенных ниже, должны интерпретироваться как иллюстративные, а не ограничивающие.

ПРИМЕРЫ

[00111] Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники способы получения и применения клеток, способов и композиций, описанных в данном документе, и не предназначены для ограничения объема того, что изобретатели считают своими изобретениями.

Пример 1

Два регуляторных слитых белка (rtTA и ArcER) обеспечивают жесткий контроль

[00112] Были сконструированы клетки CHO-K1, которые стабильно экспрессируют малиновый флуоресцентный белок под контролем как TRE, так и ArcO. Как показано на Фиг. 1, транскрипция малинового флуоресцентного белка осуществляется с промотора CMVmin с ТАТА-боксом. Промотор CMVmin фланкирован на 5'-конце TRE и на 3'-конце ArcO (AO). Обратный тетрациклиновый активатор транскрипции (rtTA) представляет собой RFP, состоящий из обратного ДНК-связывающего домена Tet (rTet) и домена трансаактивации VP16 (VP16 AD). Фрагмент rTet может связывать лиганд тетрациклин, доксициклин (dox) и их производные. ArcER представляет собой RFP, в котором домен связывания репрессора Arc (Arc) слит с доменом связывания лиганда рецептора эстрогена (ER). Фрагмент ER может связывать эстроген, эстрадиол (E2), тамоксифен, 4-гидрокситамоксифен (ОНТ) и другие их производные.

[00113] На Фиг. 1 изображен представляющий интерес репрессированный ген и представляющий интерес индуцированный ген. В репрессированном состоянии первый лиганд, в данном случае dox, отсутствует, что означает, что rtTA не способна связывать TRE, чтобы продолжить транскрипцию (trx). Кроме того, присутствует второй лиганд, в данном случае ОНТ, который связывается с регуляторным слитым белком ArcER (RFP), что приводит к ингибированию транскрипции малинового флуоресцентного белка.

[00114] В индуцированном состоянии первый лиганд, в данном документе dox, связывается с rtTA и позволяет ему связывать TRE, который является пермиссивным для транскрипции (trx). Когда второй лиганд отсутствует, в данном документе ОНТ, ArcER не ингибирует транскрипцию малинового флуоресцентного белка. Считается, что ArcER не транспортируется в ядро в отсутствие лиганда рецептора эстрогена, такого как ОНТ или E2. Таким образом, транскрипция может происходить там, где присутствует первый лиганд и отсутствует второй лиганд.

[00115] Например, клетки CHO-K1, экспрессирующие малиновый флуоресцентный белок (TRE-AO), можно получить путем вставки ДНК-кассеты, кодирующей селективируемые маркеры и репортерные белки, и полинуклеотиды, кодирующие rtTA и ArcER, в геном клетки в стабильном сайте 1 в соответствии с патентом США № 7771997. Кассета, содержащая полинуклеотид, кодирующий малиновый флуоресцентный белок с

промотором CMVmin, может быть вставлена в клеточный геном в сайте 2, например, в соответствии с указаниями патента США № 9816110. Репортерный белок был включен для подтверждения интеграции экспрессирующей кассеты в клеточный геном.

[00116] Стабильная интеграция двух экспрессионных кассет была подтверждена с использованием включенных селектируемых маркеров.

[00117] Затем тестировали способность строго контролировать транскрипцию малинового флуоресцентного белка в клетках TRE-AO CHO-K1 и сравнивали ее с отрицательным контролем (немодифицированной клеткой). Как и ожидалось, когда лиганд ArcER, в данном документе E2, присутствовал, а лиганд rtTA, в данном документе Dox, отсутствовал, экспрессия малинового флуоресцентного белка была сильно подавлена. Как показано на Фиг. 2, уровни экспрессии малинового флуоресцентного белка были близки к уровням отрицательного контроля. Кроме того, уровни экспрессии малинового флуоресцентного белка в клетках TRE-AO CHO-K1 были ниже, чем в контрольной клетке (стандартный CMV-TO), которая была способна экспрессировать малиновый флуоресцентный белок в присутствии Dox. Это демонстрирует, что система TRE-AO обеспечивает более жесткий контроль транскрипции по сравнению с одной TetO. Кроме того, при использовании +dox и -E2 наблюдались высокие уровни экспрессии малинового флуоресцентного белка (Фиг. 2, индуцированный TRE-AO).

[00118] Таким образом, система TRE-AO обеспечивает средства жесткого контроля транскрипции интересующих полинуклеотидов.

Пример 2

Контроль производства регуляторного слияния

Белок или белок-репрессор

[00119] Необязательно, производство регуляторного слитого белка, такого как rtTA, или белка-репрессора, можно контролировать с помощью другого регуляторного слитого белка и лиганда, такого как ArcER и AO, как показано на Фиг. 3. Типичная конструкция имеет промотор CMV, TATA-бокс и AO, за которым следует ген, кодирующий rtTA. ArcER в присутствии лиганда ОНТ может связываться с AO и блокировать транскрипцию (trx). В отсутствие лиганда, такого как ОНТ, ArcER больше не может связывать AO, что способствует транскрипции (trx) гена, кодирующего rtTA.

[00120] Использование RFP, такого как ArcER, для контроля уровня экспрессии другого RFP, такого как rtTA, является еще одним дополнительным подходом для контроля транскрипции представляющего интерес полинуклеотида, который находится под контролем этого RFP (в данном случае rtTA) согласно изобретения, описанные в данном документе.

Пример 3

Регуляторный слитый белок (rtTA) с белком-репрессором (TetR)

Позволяет осуществлять жесткий контроль

[00121] Были сконструированы клетки CHO-K1, которые стабильно экспрессируют малиновый флуоресцентный белок под контролем TRE и отдельного TetO. Как показано

на Фиг. 4, транскрипция малинового флуоресцентного белка осуществляется с промотора CMVmin с ТАТА-боксом. Промотор CMVmin фланкирован с 5'-конца TRE и с 3'-конца TetO (ТО). В отсутствие лиганда dox rtTA не может связываться с TRE, что предотвращает транскрипцию. Кроме того, белок Tet-репрессор (TetR) связывается с оператором тетрациклина (ТО) в отсутствие лиганда dox, который также блокирует транскрипцию.

[00122] Когда присутствует лиганд TetR, в данном случае dox, он связывается с rtTA и, таким образом, обеспечивает транскрипцию. Кроме того, лиганд dox связывается с TetR, что снижает сродство репрессора Tet к ТО и обеспечивает транскрипцию. Полинуклеотид, кодирующий белок-репрессор, такой как TetR, может быть вставлен в геном случайным образом или сайт-специфично в геном.

[00123] Как показано на Фиг. 5, транскрипция полинуклеотида, кодирующего малиновый флуоресцентный белок, находилась под контролем rtTA и TetR (TRE-ТО). См. Фиг. 4. В присутствии E2 и отсутствии dox наблюдаются очень низкие уровни транскрипции GOI (малиновый флуоресцентный белок) (TRE-ТО репрессирован (+E2/-Dox)), практически идентичные уровням контроля (Отрицательный, немодифицированная клетка). В присутствии dox и отсутствии E2 наблюдаются высокие уровни транскрипции GOI (малиновый флуоресцентный белок) (индуцированные TRE-ТО).

Пример 4

Два регуляторных слитых белка (rtTA и ArcER) позволяют жестко контролировать цитотоксический ген

[00124] На Фиг. 6 и 7 изображены rtTA в сочетании с ArcER для обеспечения жесткого контроля над транскрипцией цитотоксического гена. На Фиг. 6 изображено подавленное состояние, в котором dox (тип первого лиганда) отсутствует (-dox) и присутствует ОНТ (тип второго лиганда) (+ОНТ). Отсутствие dox означает, что rtTA не может связываться с TRE, обеспечивая начало транскрипции. Присутствие ОНТ позволяет ArcER связываться с АО, что блокирует транскрипцию. Присутствие ОНТ также предотвращает транскрипцию полинуклеотида rtTA, где используется вариант реализации Примера 2 и Фиг. 3.

[00125] На Фиг. 7 изображено индуцированное состояние. Присутствует Dox (+dox), что позволяет rtTA связываться с TRE и начинать транскрипцию (trx). ОНТ отсутствует (-ОНТ), что приводит к тому, что ArcER больше не может связывать АО, что означает, что ArcER не блокирует транскрипцию цитотоксического гена и в некоторых вариантах реализации обеспечивает транскрипцию rtTA, как описано в Примере 2 и изображено на Фиг. 3.

Пример 5

Токсичные Rep-гены AAV можно регулировать жестким контролем и экспрессировать

[00126] Клеточная линия НЕК293 была сконструирована с использованием TRE и АО в соответствии с изложенными в данном документе идеями, контролирующими гены

Rep78 и Rep52 AAV. См. Примеры 1 и 4 и Фиг. 1, 6 и 7. В варианте реализации, показанном на Фиг. 6 и 7, ген цвета, показанный на Фиг. 1, заменяется геном, кодирующим цитотоксин, таким как гены Rep. AAV Rep 78 и усеченная версия Rep 52 известны своей токсичностью для клеток человека. Schmidt *et al*, *J. Virol.* 9441-50 (2000).

[00127] В репрессированном состоянии rtTA находится без своего лиганда (например, dox), а ArcER находится в присутствии своего лиганда (например, ОНТ). См. Фиг. 6. В индуцированном состоянии rtTA находится в присутствии своего лиганда, а ArcEg - в отсутствии своего лиганда, что позволяет осуществлять транскрипцию (trx) цитотоксического гена. См. Фиг. 7.

[00128] В этом примере клетки НЕК293 были трансформированы Rep78 и Rep 52, и оба гена находились под контролем системы TRE-AO. В качестве лигандов использовались dox и E2 (вместо ОНТ).

[00129] На Фиг. 8 показаны результаты. Когда клетки НЕК293 находились в репрессированном состоянии (-), Rep78 и Rep52 не вырабатывались. В индуцированном состоянии (+) вырабатываются как Rep 78, так и Rep 52.

Пример 6

Типичные последовательности представлены ниже, а другие последовательности (включая гомологи и варианты) доступны специалистам в данной области техники.

Нуклеиновая кислота и аминокислотные последовательности

Нуклеотидная последовательность rtTA

(SEQ ID NO: 1)

ATGTCTAGACTGGATAAGTCTAAGGTGATCAATGGAGCTCTGGAACTGCTGA
 ATGGAGTGGGAATCGAAGGACTGACAACAAGAAAGCTGGCTCAGAAGCTGGGAGT
 GGAACAGCCTACACTGTATTGGCATGTGAAGAATAAGAGAGCTCTGCTGGATGCTC
 TGCCTATCGAAATGCTGGATAGACATCATACACATTTTTGTCCTCTGGAAGGAGAAT
 CTTGGCAGGATTTTCTGAGAAATAATGCTAAGTCTTTTAGATGTGCTCTGCTGTCTCA
 TAGAGATGGAGCTAAGGTGCATCTGGGAACAAGACCTACAGAAAAGCAGTATGAA
 ACACTGGAAAATCAGCTGGCTTTTCTGTGTCAGCAGGGATTTTCTCTGGAAAATGCT
 CTGTATGCTCTGTCTGCTGTGGGACATTTTACACTGGGATGTGTGCTGGAAGAACAG
 GAACATCAGGTGGCTAAGGAAGAAAGAGAAACACCTACAACAGATTCTATGCCTCC
 TCTGCTGAGACAGGCTATCGAACTGTTTGATAGACAGGGAGCTGAACCTGCTTTTCT
 GTTTGGACTGGAACTGATCATCTGTGGACTGGAAAAGCAGCTGAAGTGTGAATCTG
 GATCTGCTTATTCTAGAGCTAGAACAAGAATAATTATGGATCTACAATCGAAGGA
 CTGCTGGATCTGCCTGATGATGATGCTCCTGAAGAAGCTGGACTGGCTGCTCCTAGA
 CTGTCTTTTCTGCCTGCTGGACATAACAAGAAGACTGTCTACAGCTCCTCCTACAGAT
 GTGTCTCTGGGAGATGAACTGCATCTGGATGGAGAAGATGTGGCTATGGCTCATGCT
 GATGCTCTGGATGATTTTGATCTGGATATGCTGGGAGATGGAGATTCTCCTGGACCT
 GGATTTACACCTCATGATTCTGCTCCTTATGGAGCTCTGGATATGGCTGATTTTGAAT
 TTGAACAGATGTTTACAGATGCTCTGGGAATCGATGAATATGGAGGATAA

Аминокислотная последовательность rtTA

(SEQ ID NO: 2)

MSRLDKSKVINGALELLNGVGIEGLTTRKLAQKLGVEQPTLYWHVKNKRALLD
ALPIEMLDRRHHTHFCPLEGESWQDFLRNNAKSFRCALLSHRDGAKVHLGTRPTEKQYET
LENQLAFLCQQGFSLENALYALSAVGHFTLGCVLEEQEHQVAKEERETPTTDSMPPLLR
QAIELFDRQGAEP AFLFGLELIICGLEKQLKCESGSAYSRRARTKNNYGSTIEGLLDLPDD
APEEAGLAAPRLSFLPAGHTRRLSTAPPTD VSLGDELHLDGEDVAMAHADALDDFDLD
MLGDGDSPPGPGFTPHDSAPYGALDMADFEFEQMFTDALGIDEYGG*

Нуклеотидная последовательность ArcER

(SEQ ID NO: 3)

ATGAAGGGCATGTCCAAGATGCCTCAGTTCAACCTGCGCTGGCCTCGCGAGG
TGCTGGACCTGGTGCGCAAGGTGGCCGAGGAGAACGGCCGCTCCGTGAACTCCGAA
ATCTACCAGCGCGTGATGGAGTCCTTCAAGAAGGAGGGCCGCATCGGAGCCGGAGG
TGGCTCCGGAGGTGGCACCGGTGGAGGCTCTGGAGGAGGCATGAAAGGAATGTCTA
AAATGCCCAATTTAATCTCCGGTGGCCCCGCGAAGTCCTCGATCTCGTGCGGAAAG
TCGCTGAAGAAAATGGACGGTCTGTCAATTCTGAAATTTATCAACGGGTCATGGAAT
CTTTTAAAAAGAAGGACGGATTGGAGCTGCTTATTCTGGATCCCGGGAATTAATTC
GGCTTTCTGCTGGAGACATGAGAGCTGCCAACCTTTGGCCAAGCCCGCTCATGATCA
AACGCTCTAAGAAGAACAGCCTGGCCTTGTCCTGACGGCCGACCAGATGGTCAGT
GCCTTGTTGGATGCTGAGCCCCCATACTCTATTCCGAGTATGATCCTACCAGACCC
TTCAGTGAAGCTTCGATGATGGGCTTACTGACCAACCTGGCAGACAGGGAGCTGGTT
CACATGATCAACTGGGCGAAGAGGGTGCCAGGCTTTGTGGATTTGACCCTCCATGAT
CAGGTCCACCTTCTAGAATGTGCCTGGCTAGAGATCCTGATGATTGGTCTCGTCTGG
CGCTCCATGGAGACCCAGTGAAGCTACTGTTTGCTCCTAACTTGCTCTTGGACAGG
AACCAGGGAAAATGTGTAGAGGGCATGGTGGAGATCTTCGACATGCTGCTGGCTAC
ATCATCTCGGTTCCGCATGATGAATCTGCAGGGAGAGGAGTTTGTGTGCCTCAAATC
TATTATTTTGCTTAATTCTGGAGTGTACACATTTCTGTCCAGCACCCCTGAAGTCTCTG
GAAGAGAAGGACCATATCCACCGAGTCCTGGACAAGATCACAGACACTTTGATCCA
CCTGATGGCCAAGGCAGGCCTGACCCTGCAGCAGCAGCACCAGCGGCTGGCCCAGC
TCCTCCTCATCCTCTCCACATCAGGCACATGAGTAACAAAGGCATGGAGCATCTGT
ACAGCATGAAGTGCAAGAACGTGGTGGCCCTCTATGACCTGCTGCTGGAGGGCGGCG
GACGCCACCGCCTACATGCGCCCACTAGCCGTGGAGGGGCATCCGTGGAGGAGAC
GGACCAAAGCCACTTGGCCACTGCGGGCTCTACTTCATCGCATTCCTTGCAAAAGTA
TTACATCACGGGGGAGGCAGAGGGTTTCCCTGCCACAGTCTGA

Аминокислотная последовательность ArcER

(SEQ ID NO:4)

MKGMSKMPQFNLRWPREVLDLVRKVAEENGRSVNSEIYQRMESFKKEGRIGA
GGGSGGGTGGGSGGGMKGMSKMPQFNLRWPREVLDLVRKVAEENGRSVNSEIYQRV
MESFKKEGRIGAA YSGSRELIRLSAGDMRAANLWPSPLMIKRSKKNLALSLTADQMVS
ALLDAEPPILYSEYDPTRPFSEASMMGLLTNLADRELVHMINWAKRVPGFVDLTLHDQV
HLLCAWLEILMIGLVWRSMEHPVKLLFAPNLLLDRNQGKCVEGMVEIFDMLLATSSRF

RMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGVYTFLSSTLKSLEEKDHIHRVLDKITDTLIHLMAKAGL
 TLQQQHQRLAQLLLILSHIRHMSNKGMEHLYSMKCKNVVPLYDLLLEAADAHRLHAPT
 SRGGASVEETDQSHLATAGSTSSHSLQKYIITGEAEGFPATV*

Нуклеотидная последовательность TetR

(SEQ ID NO: 5)

ATGTCTAGATTAGATAAAAAGTAAAGTGATTAACAGCGCATTAGAGCTGCTTA
 ATGAGGTCGGAATCGAAGGTTTAAACAACCCGTAAACTCGCCCAGAAGCTAGGTGTA
 GAGCAGCCTACATTGTATTGGCATGTAAAAAATAAGCGGGCTTTGCTCGACGCCTTA
 GCCATTGAGATGTTAGATAGGCACCATACTCACTTTTGCCTTTAGAAAGGGGAAAGC
 TGGCAAGATTTTTTACGTAATAACGCTAAAAGTTTTAGATGTGCTTTACTAAGTCAT
 CGCGATGGAGCAAAAAGTACATTTAGGTACACGGCCTACAGAAAAACAGTATGAAAC
 TCTCGAAAATCAATTAGCCTTTTTATGCCAACAAGGTTTTTCACTAGAGAATGCATT
 ATATGCACTCAGCGCTGTGGGGCATTTTACTTTAGGTTGCGTATTGGAAGATCAAGA
 GCATCAAGTCGCTAAAGAAGAAAGGGAAACACCTACTACTGATAGTATGCCGCCAT
 TATTACGACAAGCTATCGAATTATTTGATCACCAAGGTGCAGAGCCAGCCTTCTTAT
 TCGGCCTTGAATTGATCATATGCGGATTAGAAAAACAACCTTAAATGTGAAAGTGGG
 TCCGCGTACAGCGGATCCCGGGAATTCAGATCTTATTA

Аминокислотная последовательность TetR

(SEQ ID NO:6)

MSRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLAQKLGVEQPTLYWHVKNKRALLDA
 LAIEMLDRHHTHFCPLEGESWQDFLRNNAKSFRCALLSHRDGAKVHLGTRPTEKQYET
 LENQLAFLCQQGFSLENALYALSAVGHFTLGCVLEDQEHQVAKEERETPTTDSMPPLLR
 QAIELFDHQGAEPFLFGLELIICGLEKQLKCESGSAYSXSGSREFRSY

Тет Оператор

(SEQ ID NO:7)

TCCCTATCAGTGATAGAGA

Элемент ответа Тет

(SEQ ID NO: 8)

TCCCTATCAGTGATAGAGAACGTATGAAGAGTTTACTCCCTATCAGTGATAG
 AGAACGTATGCAGACTTTACTCCCTATCAGTGATAGGGAACGTATAAGGAGTTTACT
 CCCTATCAGTGATAGAGAACGTATGACCAGTTTACTCCCTATCAGTGATAGAGAACG
 TATCTACAGTTTACTCCCTATCAGTGATAGAGAACGTATATCCAGTTTACTCCCTATC
 AGTGATAGAGA

Оператор Arc

(SEQ ID NO: 9)

ATGATAGAAGCACTCTACTATTC

промотор hCMVmin

(SEQ ID NO: 10)

GCGTATAAGCTTTAGGCGTGTACGGTGGGAGGCCTATATAAGCAGAGCTC

СНО и последовательности стабильного сайта 1 мыши - патент США №

7771997

211> 6473

<212> ДНК

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 1

(SEQ ID NO:11)

tctagaaaca aaaccaaaaa tattaagtca ggcttgctt caggtgctgg ggtggagtgc 60
tgacaaaaat acacaaatc ctggctttct aaggctttt cggggattca ggtattgggt 120
gatgtagaa faaaaatctg aaacataggt gatgtatctg ccatactgca tgggtgtgta 180
tgtgtgtgta tgtgtgtctg tgtgtgtgcc cagacagaaa taccatgaag gaaaaaaca 240
cttcaagac aggagagaag agtgacctgg gaaggactcc ccaatgagat gagaactgag 300
cacatgccag aggaggtgag gactgaacca tcaacacaa gtggtgaata gtctgcaga 360
cacagagagg gccagaagca ctcagaactc cagggggctca ggagtggttc tctggaggct 420
tctgcccttg gaggttctg aggaggaggc ttccatttg aaaatgtagt tagtggccgt 480
ttccattagt acagtgacta gagagagctg aggaccact ggactgaggc ctagatgctc 540
agtcagatgg ccatgaaagc ctagacaagc acttccgggt ggaaaggaaa cagcaggtgt 600
gaggggtcag gggcaagtta gtgggagagg tcttccagat gaagtagcag gaacggagac 660
gcactggatg gccccactg tcaaccagca aaagcttggg tcttgttcta agaggccagg 720
gacatgacaa gggatgctc ggtttttaa aggctttgtg ttacctaac acttctatta 780
gtcagatact ttgtaacaca aatgagtact tggcctgtat tttagaaact tctgggatcc 840
tgaaaaaaca caatgacatt ctggctgcaa cacctggaga ctcccagcca ggcctggac 900
ccgggtccat tcatgcaaat actcaggac agattcttca ctaggactg atgagctgc 960
ttgatgcaa atgtggcctc ttcatttac tacaagtcac catgagtcag gaggtgctgt 1020
ttgcacagtg tgactaagtg atggagtgtt gactgcagcc attcccggcc ccagcttctg 1080
agagagatcc ttttaaatg aaagtaagct caaagttacc acgaagccac acatgtataa 1140
actgtgtgaa taatctgtgc acatacaca accatgtgaa taatctgtgt acatgtataa 1200
actgtgtgaa taatctgtgt gcagccttc cttactact acctccagt gatcaggttt 1260
ggactgectg tgtgctactg gacctgaat gtccccacc ctgtcccctg tcttttaca 1320
ttctgacatt ttttaataat tcagcggctt cccctctgct ctgtgcctag ctatacctg 1380
gtactctgca ttttggttc tgtgacattt ctctgtgact ctgctacatt ctcagatgac 1440
atgtgacaca gaaggtgttc cctctggaga catgtgatgt cctgtcatt agtggaatca 1500
gatgccccca aactgttgc cagtgtttgg gaaagtgaca cgtgaaggag gatcaggaaa 1560
agaggggtgg aaatcaagat gtgtctgagt atctcatgct cctgagtggg ccaggctgct 1620
gacttcactc cccaagtga gggaggccat ggtgagtaca cacacctcac acatactata 1680
tcaacacac acacacacac acacacacac acgcacgac gcacgcacgc acgcacacat 1740
gcacacacac gaactacatt tcacaaacca catacgata ttacaccca aacgtatcac 1800
ctatacatac cacacataca caccctcca cacatcacac acataccaca cccacacaca 1860
gcacacacat acataggeac acattcacac accacacata tacatttctg tatgcataca 1920
tgcatacaca cacaggcaca cagacaccac acacatgcat tgtgtacgca cacatgcata 1980
cacacacata ggcacacatt gagcacacac atacatttct gtacgcacac tacatagaca 2040

tatatgcatt tgtatatgca cacatgcatg cacacataca taggcacaca tagagcacac 2100
 acatacattt gtgtatgcac acatgcacac accaatcaca tgggaagact caggttcttc 2160
 actaagggtc acatgaactt agcagttcct ggttatctcg tgaacttgg aagattgctg 2220
 tggagaagag gaagcgttgg cttagaccct ggcagcaatt aaccccgcc agagaagta 2280
 ggtttaaaaa tgagagggtc tcaatgtgga acccgaggcg gccagttca gagaagagac 2340
 ctaccaagc caactgagag caaaggcaga gggatgaacc tgggatgtag tttgaacctc 2400
 tgtaccagct gggtctcatg ctatcttctt atatctttat taaatattct tttagtttta 2460
 tgtgcgtgaa taccttgctt gcataaatgt atgggcaactg tatgtgttct tgggtcccgt 2520
 ggaggccagg agagggcatg gatcctccgg agctggcgtt tgagacagtt gtgaccaca 2580
 gtgtggggtc tgggaactgg gtcttagtgt tccgcaagtg cagctggggc tcttaacctc 2640
 tgaccatcc ctccagcttc aagaaactta tttcttagg acatggggga agggatccag 2700
 ggcttaggc ttgtttgtc agcaaaact ctttctgtgt atttgaatt ttatcttatt 2760
 ttactttttt gggatagaat cacattctgc agctcaggtt gggcctgaac tcatcaaat 2820
 cctctgtct cagtctacca ggtgataaga ttactgatgt gagcctggct ttgacaagca 2880
 cttagagtc cccagccctt ctggacactt gtccaagta taatataat atatataat 2940
 atatataat atatataat atatatttg tgtgtgtgt tgtgtgtgta tgagacactt 3000
 gctctaaggg tatcatatat atcttgatt tcttttaat ttatctttta attaaaaatg 3060
 attagctaca tgtcacctgt atgctctgt atcatctata tctcttct tcttctctc 3120
 tcttctctc ttcttctct caccccaag catctatttt caaatcctt tgcggaggag 3180
 atgccaagag tctcgttggg ggagatgggt agggggcgat acaggggaag agcaggagga 3240
 aagggggaca gactgggtgt ggtctttgga gagctcagga gaatagcagc gatcttccct 3300
 gtccctgggt tcaccttta cagccaacac cttttgtgg cctggcagaa gagttgtcaa 3360
 gctggtgca ggtctgccac acaaccccaa tctggccca agaaaaggca cctgtgtgtg 3420
 actctggggt taaaggcgtt gcctggctgt ctccagctgg actgaaact cccgtttaat 3480
 aaagagtctt gcaaaataat acccgagag tcacagtgc aggttccctt gcttctctga 3540
 agcggcaggc acgggttccc taggaaatgg ggccttgctt gccaaagctc cacggcttgc 3600
 cctgcaaacg gctgaaatga tctggcactc tgcgttcca ctgggatgaa atggaaaaaa 3660
 gaaaaagaag aagtgtctct ggaagcgggc gcgctcacac aaaccgcaa cgattgtgta 3720
 aacactctcc atfgagaatc tggagtgcgg ttgccctcta ctggggagct gaagacagct 3780
 agtggggggc gggggaggac cgtgctagca tcttccacg gtgctcgtg gctgtgtgct 3840
 atccgggaa ccgaaacgcg gaactaaagt caagtcttgc tttgttgaa ctgacaatca 3900
 acgaaatcac ttcgattgtt ttctctttt tactggaatt ctggatttg atagatgggg 3960
 gaggatcaga gggggagggg aggggcgggg agacggaggg aggaggggag gaggggagga 4020
 ggggaggagg ggaggagggg aagggatgga ggaaaactt aactttctt attcaacatg 4080
 acaaagattc ggagaaagt caccgctagt gaccgggagg aggaatgccc tattggcat 4140
 tatattcctt gctgctaat ggaatcaaac tcttggttcc agcacciaag attctgagcc 4200
 tctctatc aagacagtaa ctacagcca cacggaagag gctataaac tgaagaata 4260
 aaatttcaac tttatttcat ttctgtgact gcatgttca atgtagagag ccacctgtgt 4320
 ctaggggctg atgtgctggg cagtagagtt ctgagcccgt taactggaac aaccagaac 4380
 tcccaccaca gttagagctt gctgagagag ggaggccctt ggtgagattt ctttgtgtat 4440

ttatttagag acaggtctc atactgtagt ccaagctagc ctccagctca cagaaattct 4500
 cctgttccgg tttccaaagt actggagfta tgagtgtgtg ttaattgaac gctaagaatt 4560
 tgetgattga agaaaacctc aagtgggttt ggctaatecc cagacacca gaggetgagg 4620
 caggaggaat gagagaatc aaggtttgcc agagccacag ggtgagctca atgtggagac 4680
 tgtgagggtg agctcaatgt ggagactgtg aggggtgagct caatgtggag actgtgaggg 4740
 tgagctcaat tgggagactg tgagggtgag ctcaatgtgg agactgtgag ggtgagctca 4800
 atgtggagac ctgtatcaag ataataatag tagtagtaac aatgcaggcg aggggtgtgtg 4860
 tgagtgttag agcagftagt tgattgaca tgettgaggt ctcccggtcc atctgtggcc 4920
 ctgcaacagg aaggggagga ggaagggggg gaacgagaga gaggaaagag agacagaagc 4980
 taagataggg aatgagagag gaaggaagaa acgggaagaa attcagactc ctctctgagt 5040
 tccccaacg cctagtgaca tctgtgcaac acctaaagt ggctttgtg tggcactggc 5100
 ttgggtggtc gggaaaggca tttcagctt gttgcagaac tgccacagta gcatgctggg 5160
 tccgtgaaag tttctcccc ttaacaagaa gtcttacta cttgtgacct caccagtga 5220
 aatttttta atgtctcct ggtgttctg gttttgcatt ttttttcta aggatacatt 5280
 cctgggtgat gcatgaagt ccccaaagac acagtggggc tgtgttgat tgggaaagat 5340
 gatttatctg ggggtcaaa aggaaaagaa gggaaacagg cacttgggaa aatgtcctcc 5400
 cgccccccg aattttggct tggcaaccgt ggtggaggag caagaaacac gtggacgttt 5460
 gaggaggcat ggggtcctag gaggacagga agcagaagga gagagctggg ctgacagcct 5520
 gcaggcattg cacagttca gaaggagatt acagcatgac tgagtttta gggatccaac 5580
 agggacctgg gtagagattc tgtggctct gaggcaactt gacctcagcc agatggtatt 5640
 tgaataacct gctcttagag gaaaacaga catagcaaac agagccacgt ttagtgatga 5700
 aactctact ttgctgagt catgtgcggc catgccagg ggtcaggctg aactcaact 5760
 caaaaacaag tgagaaattg aagacaatcc tgggtggcag ctactggaag ggccaccaca 5820
 tccccagaaa gagtggagct gctaaaaagc cattttgat aggcacagtt atcttgaatg 5880
 catggagcag agattacgga aaaatcgaga atgttaatga ggcaacattc gagttgagtc 5940
 attcagtgtg ggaaaccag acgttccat ccctaaaag gaacatcttg ctctcagtea 6000
 aaatgaaat aaaaattggg gcttgaattt ggcaaatgat tcagaactct gtgtaggtat 6060
 tttcacacgc acagtggata atttcatgt tggagttat ttgtgctaaa aggcagaaaa 6120
 gggtaaaaag cacatctaa gagttatgag gttctacgaa taaaataat gttacttaca 6180
 gctattcctt aattagtacc ccttccacc tgtgtaatt tctgagata gtcagtgggg 6240
 aaaagatctc tcttctctt cttctcccc ctccctctct ctccctctct cctctctctc 6300
 ctccctctc tctctctc ccccttctct tcttttttg ctctctctc tetgctctct 6360
 tctctcttc tcttctctt attctaagta gcttttaaca gcacaccaat tacctgtgta 6420
 taacgggaaa acacaggctc aagcagctta gagaagattg atctgtgttc act 6473

<211> 7045

<212> ДНК

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 2

(SEQ ID NO: 12)

actagcgtgc aattcagagg tgggtgaaga taaaaggcaa acatttgagg ccatttcctt 60
 atttggcagc gcacttagga agtggacaat gcctaatacta ctggtttgta ccaccttcc 120
 ctataatgga ctgtttggga agctcctggg caaccgattc tggcatctca ttggtcagag 180
 gcctgttaaa tggfactctt atttgcaaag aaggctgtaa cttgtagctt taaaagcctc 240
 tectcaagaa agaagggaga aaggatatgg ctagacatat ctaatagact taaccactgt 300
 gaaaagcctt agtatgaatc agatagaacc tatttttaac tcagtttga aaaaaataat 360
 ctttatattt atttgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt 420
 gaaccacatg tagcaggtgc tggaggaggc cagaagaggg caccagatct cctggaactg 480
 acaccacaca tggttatgag ctgcctgatg tgggtgctgg gaactgaact ctcgtgttct 540
 gcaagagcag caactgttct cttactgat gagccatctc tccagccccc ccataattt 600
 taattgttca ttttagtaaa ttttattcat aatcaattat cacagtataa acaatgatt 660
 ttatataat catatacata tcaaggatga cagtgagggg gatagtgtgt tgtgtgtgtg 720
 tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgttatt gtgtgtgtgc ttttaagaa ggtgccatag 780
 tcaactgact tctctgaagg atttcaaagg aatgagacat gtctgtctgc caggaacct 840
 atcttctct tgggaatct gacccaaatg aggtattctg aggaactgaa tgaagagctc 900
 aagtagcagt gtcttaaac caaatgtct gtctagagaa agtcaacgct atcagtgagc 960
 tgaggagaga tttactgagc ggaagacaag cgctcttga ttttaagggc tgaacagtc 1020
 acggctgtgg agtggagcct gtgctcaggt ctgaggcagt ctttctagc cagctgtgat 1080
 gagcagtga gaaaggggtg agatggaggc aggggtgggag cagggctatg gttcagacta 1140
 ggtatcgtga gcacaccagc tggttgactt gtggtctgtg ggtcagcgt tgaaacgcc 1200
 ctcagggtca ggcagtcaca ttgcttgaag ctgaatgggt gaggcaacac agagagtga 1260
 aagaaggcaa agtaccacct ctccccgac ccaggctact tctgggttat agctgagact 1320
 ccggacagca tgaaccagc tggttagagc ttcagggaaa acttgatgct tgcattgtgc 1380
 tatgaaatgt gattcggtag atctggagaa aatttataat gctggctcag tcaagcactg 1440
 aacaaaggta ccttggcttt gggagctaca tgacattgac ttgtaggcag acttttttt 1500
 ttctgcccgc caattccag ataaccaata tggaggctca atattaatta taaatgctc 1560
 gctgatagct caggcttgtt actagctaac tctccaact taaatgaacc catttctatt 1620
 atctacattc tggcactga ctttactgt tacttctctt tctctctct tctctgactc 1680
 tgccttctg ctccccagag tcttagtct ggttctctg ctaacctta tctgcccag 1740
 ctgctgacca agcattfata attaatatta agtctcccag tgagactctc atccaggag 1800
 gacttgggtg ctccccctc ctactgcca tccgtgtctt cctcttccct cgttcccc 1860
 tctcttctt gctcttctc ctccccct ctttcatag tattgatggc aagggtgttc 1920
 tagaatggag gagtgccat aggcacgaa agaaaccagt taggatgctc tgtgaggggt 1980
 tghtaatata agcagatggac acaattcaag ccacagagtg aagacggaag gatgactgt 2040
 gctctagagc aacttctggg gcagaatcac aggggtgagtt tctgacttga gggcgaagag 2100
 gccacgagga agggagtgag tttgtctgag ctagaagcta cggcccacct cttggtagca 2160
 gacctgccc aagcatgct ttgttaatca tgtgggatct gatttctc taaatctatg 2220
 ttcaactctt aagaaatgt gaattctcac attaaaattt agatatacgt ctttgggtgg 2280
 ggggggtgta aaaaatctc aagaatatgg atttctgggg gccggagaga tggctcagag 2340

gftaagagaa ctggttctc ttctagacat tctgagttca attcccagca accacatggt 2400
 ggctcacaac catctgtaat gcgacctggt gccatcttct gacatgcatg gatacatgca 2460
 ggcagaaaagc tgtatacata gtaaattgat aaatcttttt ttaaaaagag tatggattct 2520
 gccgggtgtt ggtggcgcac gcctttaatc ccagcactct ggaggcagag gcaggtggat 2580
 ctctgtgagt tcgagaccag cctggctctat aagagctagt tccaggacag cctccaaagc 2640
 cacagagaaa cctgtctcgc aaaaacccaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaga 2700
 gtatggattc taagaaagcc gtaacagctg gagctgtgta cggagttcag cgtggtacta 2760
 gaagaacaga cattcatgat gaaacacccc aggattttta cttagtatct agtttccatt 2820
 gttgttttga gaccggctct tatgtctctc aggctggcct caaactgctg atcttcccgc 2880
 ctctacctct caagtctctgg gactacttgg ctataaaaac agtttttctc gggctccctg 2940
 aagttatggt tgtacaaacc gtgggggtca atatactcac ttgggcagag agagaaggtc 3000
 tgaatcccag acaatgactg catctcagga cagttgggaa gaggacaatg gcagaaggac 3060
 ttgaaaaaga tagactggag ggtggaaaag cagcaggaac agagaaacaa aacaggaagc 3120
 ttgctatcca gggccactct ggagtcctgt ggcaagatgg aagcgggcta ggggaataca 3180
 tttgtctac tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgat caatgcctat 3240
 caatgttgaa ggggaaatata gtataccaca ttgattctgg gagcaattct cagtatctgg 3300
 cctagagaaa ggaatggccc ctgcagaata gacagagtga atgggtccct ttatcatttg 3360
 ctaaagtga gggagaaata acatccttcc atagagtffc aggtaaatga accccacagt 3420
 tcactgtgc cgtggtggag gcttgccca cagttaaaaa gattagacac ggacaaagtc 3480
 tgaaggaaac acctcgaata ggaagaggag agccacctca ttctgtaact ttctcaagg 3540
 ggaagatgtt ccaagagtgg gaataaatgg tcaaaaggggg gatttttaat taggaaaacg 3600
 atttctgta tcactgtga aactggaggt tgatttgggg cataggacaa tagatttgat 3660
 gctttgcaaa aagctgttcc aaagcagaga aatggaatag agacaattat gtagcgagga 3720
 gggaggggtg ggcaagatg gagacagaga agtggaaagct gactttaggg aagaggaaca 3780
 tagaccacag gggcgggggcg gggggcaggg gcggggggcg gggctcaaag gaggcagtgg 3840
 gaacgttctc agtcttcgca gcgtaagcgt gaatgtgcaa gcgtctttgt ggtgtgtgac 3900
 caggagtgc gtggctggct tgtgtctctc ttgtaatccc agtctttgag gtttccacac 3960
 tgttccacag tgggtgtgat ttccctcgg agagcatgag ggctctgctt tccccacac 4020
 ctccccagcg ttctttgta ttgtttcca agatgttagt gggtagaca aagcctctct 4080
 gttgatttgc cttaacagg tgacaaaaaa agctcaacca ggagacattt ttgccttctt 4140
 ggaaggtaat gctcccatgt agagcaatgg gacctctc taagtgagg ctactcttgc 4200
 agtttgcacc cagctcttct gatgcaggaa ggaagttggt gggcaagcaa gactgttgc 4260
 ttcttgcgat ggacacattc tgcacacaaa ggctcaggag gggagaagge tgtttgatgt 4320
 ttgactca ggaaggeccc tgatgcatct gtgattagct gctccatct gtggagcaga 4380
 cacggactaa ctaaaaacca gtgtttttaa attgtcaagc cttaaggtg aggaaattga 4440
 ctattgtgc tgggccatac gtagagcaag tgctctgcat tgggccaacc cccgctctg 4500
 gtttctagge accagaatgg cctagaacta actcacaatc ctccattcc aggtctcagg 4560
 tgctagaatg aaccactata ccagctgccc tgctgccta cctgccttcc taaattttaa 4620
 atcatgggga gtaggggaga atacacttat cttagttagg gtttctattg ctgtgaagag 4680
 acacatgag catggcaact ctataaagg aaaacattta gttgggtggc agtttcagag 4740

gttttagtac attgtcatca tggctgggaa catgatggca tgcagacaga catggtgctg 4800
 gagaaaggga tgagagtcct acatcttga ggcaacagga cctcagctga gacactggct 4860
 ggtaccctga gcatagaaa cctcacagcc caccctaca gtgacatatt tcttcaaca 4920
 aagccatacc tctaatagt gccactcct atgagatgac agggccaatt acattcaaac 4980
 tgctataaca ctftaaagta tttttttt attattgtaa attatgatg tagctgggtg 5040
 gtggcagccg aggtgcacgc ctftaatccc agcacttggg aggcagagge agatggatct 5100
 ctgtgagttc aagaccagcc tggctataa gagctagtgt caaggaagga tatacaaga 5160
 acagttctag gatagccttc aaagccacag agaagtgtg tcttgaaac caaaaattgt 5220
 gctgggacct gtctctgctt tggttgcttc ccactcccc agagctggac tcttggtaaa 5280
 cactgaatca gctgcaaat aaactcctgg attcctctct tgtaacagga gcccgaaatc 5340
 aggcgcccac ttgtcttc gcaggattgc catagacttt ttctgtgtgc ccaccattcc 5400
 agactgaagt agagatggca gtggcagaga ctgggaagge tgcaacgaaa acaggaagtt 5460
 attgcacct gggaatagtc tggaaatgaa gcttcaaac ttgctcatg ttcagttgta 5520
 cacagactca ctcccagggt gactcacag tgtaaatatt cctgactatg tctgactgc 5580
 ttttatctga tcttcttc ccaaatgcc aagtgtaca ggtgaggaa tcaccttgg 5640
 attcagagcc cagggtctc ctcttaacc tggactgtc tttctcggc agcctctgac 5700
 accctccc cctttctc tctcagaagg tctgagcaga gttggggcac gctcatgctc 5760
 tgataactc cttgtctcc tgaagatcta acttctgacc cagaaagatg gctaaggtgg 5820
 tgaagtgttt gacatgaaga cttgtctta agaactggag caggggaaaa aagtcggatg 5880
 tggcagcatg taccgaaat cccagaactg gggaggtaga gacggatgag tgcccggggc 5940
 tagctggctg ctacccagc ctagtgaat tgccaaatc caactctat tgaaaaacct 6000
 ttaccaaca aacaacaaa caaataataa caacaacaac aacaacaaac taccatac 6060
 aagtgggcg gctctggct cttgaggaat gactacca aacccaaage ttgccacagc 6120
 tttctctgg cctaatggg gtgggggtgg ggcagagaca gagacagaga gagacatgac 6180
 ttctgggct gggctgtgt ctctagcca ccaggaactt tctgtctt ctctctct 6240
 ggcacagcca gagcaccagc acccagcagg tgcacacacc tccctcctg cttctgagc 6300
 aaacacaggt gccctgtct gtctattgaa cggagtaag tcttgcaga tctatgcatg 6360
 gaaacaacat tctctggtt ttattctac tttgtgata aaaaccgggg aactccagga 6420
 agcagctgag gcagaggcaa atgcaaggaa tctgctctc tagcttctc cccatggctt 6480
 gccgggctg cttctgcaa gccctctct cccattggc atgctgaca tgaacagcgt 6540
 ttgaaatgct ctcaaatgc acttcaag aagctctc tgatcttct aactaatca 6600
 gacctgttt caccgtgcat tatctctg ctgtctgt gtctgtct ctgtctat 6660
 gtctatcacc tacaatcat ctctctat atctctatt tatctaccta tcttcaate 6720
 atctatctc taactagtt tctttatt atttgttac ttacttttt tatttgagac 6780
 agtattctc tgagtacag cttggctgt cctggaacc attctgtaac cagctgtctc 6840
 tcaactcac agagatcaa ctgctctgc ctctctgtg ctggggttaa agactgcaac 6900
 caccaagcc ccctctat atctttat gtacttata ttcagctatt atctatctc 6960
 taactatca tctctgtct atccatcacc tatctatc tctatctc tatctatc 7020
 tctatcacc atctataac aattg 7045

<211> 6473

<212> ДНК

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 3

(SEQ ID NO: 13)

agtgaacaca gatcaatctt ctctaagctg cttgagcctg tgttttcccg ttatacacag 60
 gtaattggtg tgctgttaaa agctacttag aataaatgaa gaagaaaggg agaaggaggc 120
 agaggagaag gagcaaagaa agaaggaaag ggggagggag ggagaggagg gagggaggga 180
 gggagggagg gagaggaggg gagggggaga aagaagagaa ggagagatct tttcccact 240
 gactatctca gaaaffacc acagggtgaa gggggacta attaaggaat agctgtaagt 300
 aacattatft ttattcgtag aacctataa ctcttaagat gtgctttta cctttttctg 360
 ctttttagca caaataaact ccaacatgaa aattatccac tgtgcgtgtg aaaataccta 420
 cacagagtc tgaatcattf gccaaattca agecccaatt tttatttcca ttttactga 480
 gagcaagatg ttcttttag gggatggaag cgtctgggtt tcccactg aatgactcaa 540
 ctgaaatgtt gcctcattaa cattctcgat ttttcgtaa tctctgctcc atgcattcaa 600
 gataactgtg cctatcacia atggcttttt agcagctcca ctctttctgg ggatgtggtg 660
 gccctccag tagctgccac cacggattgt ctcaatttc tcaactgttt ttgagttgag 720
 tgtcagcctg accctgggc atggccgac atgactcagg caaagtgaga gtttcatcac 780
 taaacgtggc tctgtttgt atgtctgttt tccctctaa agcaggttat tcaaatacca 840
 tctggctgag gtcaagttgc ctgagagccc acagaatctc taccaggtc cctgttggat 900
 cctaaaaac tcagtcatgc tgtaatctcc ttctgaaact gtgcaatgcc tgcaggetgt 960
 cagcccaget ctctctctf gttctctgc ctctaggac cccatgctc ctcaaagtc 1020
 cacgtgttfc ttgctctcc accacggttg ccaagccaaa attcgggtgg gcgggaggac 1080
 attttccaa gtgectgttt ccttttttt cttttgaca cccagataa atcatcttc 1140
 ccaatccaac acagcccac tgtgtcttg gggacttcat gacatcacc agaatgtat 1200
 ccttagaac aaaaatgcaa aaccagaac accaggagac aattaaagaa attttactg 1260
 gtgaggtcac aagtagtaga gactcttctg taacgggcag aaactttcac ggaccagca 1320
 tgctactgtg gcagttctgc aacaagetga aatgccttt cccgaccacc caagccagt 1380
 ccacacaaag gccaccttag ggtgtgcaca ggatgtcact aggcgttggc ggaactcagg 1440
 aaggagtctg aattttctcc cgtttctcc ttctctctc attcctate ttagcttctg 1500
 tctctcttc ctctctctg tccccccct tctctctcc ctctctgtg cagggccaca 1560
 gatggaccgg gagacctcaa gcatgtcaaa tcaactaact gctctaccac tcaaccacac 1620
 cctgcctgc atgttacta ctactattat tatcttgata caggcttcca cattgagctc 1680
 acctcagag tctccactf gagctcacc tcaagtctc cacattgagc tcaacctcac 1740
 agtctccaca ttgagctcac cctcagctc tccacattga gctcaccctc acagtctcca 1800
 cattgagctc acctgtggtc tetggcaaac ctggaattct ctactctc ctgctcagc 1860
 ctctggggtc gtggggatta gccaaacca ctgagggttt tcttcaatca gcaattctt 1920
 agcgttcaat taacacacac tcaactctc agtactttgg aaaccggaac aggagaattt 1980
 ctgtgagctg gaggttagct tggactacag tatgagacc tctctctaaa taaatacaca 2040
 aagaaatctc accaagggcc tccctctctc agcaagctct aactgtggtg ggagttctgg 2100

gttgttccag ttaacgggct cagaactcta ctgccagca catcagcccc tagacacagg 2160
 tggctctcta catgtgaaca tgcagtcaca gaaatgaaat aaagtgaaaa ttttattct 2220
 tcagttgat agcctcttcc gtgtgggctg tagttactgt cttgaaatagg ataggctcag 2280
 aatccttggg gctggaacca agagtttgat tccattagac gacagggaat ataatgcccc 2340
 atagggcatt cctctccccg gtcactagcg gtgcacttcc tccgaatctt tgcattgtg 2400
 aattgaaaa gttagtattt tctccatcc ctccccctcc tccccctc cctctctccc 2460
 ctctcccc cctccccg tctccccg cctccccctc cctctctc cctccccctc 2520
 tatcaaatcc aagaattcca gtaaaaagag gaaaacaatc gaagtgattt cgttgattgt 2580
 cagttccacc aaagcaagac ttgactttag ttccgcgttt cggttccccg catgcaccac 2640
 agccagcgag caccgtggaa ggatgctagc acggctctcc ccccccccc actagctgtc 2700
 ttcagctccc cagtagaggg caaccgcaat ccagattctc aatggagagt gtttacaca 2760
 tcgttgcggg tttgtgtgag cgcgccccgt tccagagaca ctctctctt ttctttttc 2820
 catttcatcc cagtggcaac gcagagtgc agatcattca ggcctgttgc agggcaagcc 2880
 gtgggagctt ggcaagcaag gccccattc ctagggaacc cgtgcttggc gcttcaggaa 2940
 agcacgggaa cctggcactg tgactctgcg ggtattattt tgcagaactc ttattaaac 3000
 gggagtttca agtccagctg gagacgacca ggcagcgcct ttaaccccag agtcacacac 3060
 aggtgccttt tctggggccc agattggggg tgtgtggcag acctgcgacc agcttgacaa 3120
 ctctctgcc agccacaaa atggtgttgg ctgtaagagg tgaccagg gacagggaag 3180
 atcgtgcta ttctctgag ctctccaaag accacacca gtctgtcccc ctctctctc 3240
 gctctcccc tgtatgccc cctcaccatc tcccccaag agactcttgg catctctcg 3300
 gcacaaggat ttgaaaatag atgcttgggg gtgagaagaa gaagagagaa agagagagaa 3360
 ggaaggaagg atatatagat gatacagacg catacaggtg acatgtagct aatcatttt 3420
 aattaaaaaa taaattaaaa gcaaatcaag gatataatg atacccttag agcaagtgc 3480
 tcatacacac acaaacacac acacacaata tatatatata tatatatata 3540
 tatatatata ttacttgg aacaagtgc cagaagggt ggggactcta aagtgttgt 3600
 caaagccagg ctacatcag taatttacc acctgttaga ctgagacagg aggttttga 3660
 tgagttcagg cccagctga gctgcagaat gtgattctat ccaaaaaag taaaataaaa 3720
 taaaattcaa aatacagaa aagagtattt gctgaacaaa caagcctaaa gcctggatc 3780
 cttccccca tctctaaga aaataagttt cttgaagctg gagggatggc tcagaggtta 3840
 agagccccag ctgcacttgc ggaactacta gaccagttc ccagaccca cactgtgggt 3900
 cacaactgtc tcaaacgcca gctccggagg atccatgccc tctctggcc tccaccgca 3960
 ccaagaacac atacagtccc catacattta tgcaagcaag gtattcacgc acataaaact 4020
 aaaagaatat ttaataaaga tataacaaa tagcatgaag cccagctggg acagagttc 4080
 aaactacatc ccagttcat cctctgctt ttgctctcag ttgcttggg taggtctct 4140
 ctctgaactg gcgcccctg ggttccatc tgagaccctc tcaattttaa acctactct 4200
 tctgggctgg gtttaattgt gccagggctc aagccaacgc ttctctctc ccacagcaat 4260
 ctccaagt ttacagagata accaggaact gctaagtca tgtgaacctt agtgaagaac 4320
 ctgagttc ccatgtgatt ggtgtgtgca tgtgtgcata cacaaatga tgtgtgtct 4380
 ctatgtgtgc ctatgtatgt gtgcattcat gtgtcatat acaaatgcat atatgtctat 4440
 gtatgtgctg tacacaaatg tatgtgtgtg ctcaatgtgt gcctatgtgt gtgtatgcat 4500

gtgtgcgtac acaatgcatg tgtgtggtgt ctgtgtgcct gtgtgtgtat gcatgtatgc 4560
 atacacaaat gtatatgtgt ggtgtgtgaa tgtgtgccta tgtatgtgtg tgctgtgtgt 4620
 ggggtgtgta tgtgtgtgat gtgtggaggg gtgtgtatgt gtggtatgta taggtgatac 4680
 gtttgggggtg taatatgcgt atgtggtttg tgaaatgtag ttcgtgtgtg tgcattgtgtg 4740
 cgtgcgtgcg tgcgtgcgtg cgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtt ggatatagta 4800
 tgtgtgaggt gtgtgtactc accatggcct cctcacttg ggggagtgaa gtcagcagcc 4860
 tggaccactc agggacatga gatactcaga cacatcttga ttccacccc tcttttctg 4920
 atcctccttc acgtgtcaact ttcccaaaaca ctggacaaca gtttgggggc atctgattcc 4980
 actaatgaca gggacatcac atgtctccag agggaaacacc ttctgtgtca catgtcatct 5040
 gagaatgtag cagagtcaca gagaaatgtc acagaaacca aatgcagag taccaaggtg 5100
 tagctagcca cagagcagag gggaagccgc tgaatttatt aaaaatgtca gaatcgtaaa 5160
 agacagggga cagcgggtggg gacattcagg gtccagtagc acacaggcag tccaaacctg 5220
 atcactggaa ggtagtaggt aaggaaagc tgcacacaga ttattcacac agtttataca 5280
 tgtacacaga ttattcacat ggtttgtgta tgtcacaga ttattcacac agtttataca 5340
 tgtgtggctt cgtggttaact ttgagcttac ttcaattta aaaggatctc tctcacaagc 5400
 tggggccggg aatggctgca gtcaacactc catcacttag tcacactgtg caaacagcac 5460
 ctctgactc atggtgactt gtagtaaaat gaagaggcca catttgcac caagacagct 5520
 catcagtacc tagtgaagaa tctgtccctg agtatttga tgaatggacc cgggtccagg 5580
 gcttggttgg gactctccag gtgttgcagc cagaatgtca ttgtgtttt tcaggatccc 5640
 agaagttct aaaatacagg ccaagtactc atttgtgtta caaagtatct gactaataga 5700
 agtgattagg taacacaaag ctttttaaaa accgagatca ccttgtcat gtcctggcc 5760
 tcttagaaca agatccaagc ttttctgtgt tgacaagtgg ggccatccag tgcgtctccg 5820
 ttctgctac ttcactgga agactctcc cactaacttg ccctgaccc ctcacacctg 5880
 ctgttctct tccaccgga agtgettgc taggettca tggccatctg actgagcacc 5940
 taggcctcag tccagtgtc cctcagctct ctctagtcac tgtactaatg gaaacggcca 6000
 ctaactacat ttcaatatg gaagcctct cctcaggaac ctccaagggc agaagcctcc 6060
 agagaaccac tctgacccc ctggagtct gactgtctt ggccctctct gtgtctgcag 6120
 gactattcac cactgtgtt gaatgttca gtctcact cctctggcat gtgtcagtt 6180
 ctcatctcat tggggagtec ttccaggtc actctctct cctgtctttg aagtgtttt 6240
 ttcttcatg gtattctgt ctgggcacac acacagacac acatacacac acatacacac 6300
 ccatgcagta tggcagatac atacctatg ttccagattt ttattctacc atacccaat 6360
 acctgaatcc ccgaaaaagc cttagaaagc caggaatttg tgtattttg tcagcactcc 6420
 acccagcac ctgaagccaa gcctgactta atattttgg tttgtttct aga 6473

<211> 7045

<212> ДНК

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 4

(SEQ ID NO: 14)

caattgatta tagatgatg atagatagat agatagatag atagatagat agatagatga 60

tggatagaca gatgatggat agttagagga tagataatga ctgaataata agtacataaa 120
 tagatgatag agcggggcgt tgggtgtgca cgtctttaac cccagcacca gagaggcaga 180
 ggcagttgga tctctgtgag tttgaggaca gcctggttac agaatgggtt ccaggacagc 240
 caaggctgtc actcagagaa atactgtctc aaataaaaaa agtaagtaaa caataaata 300
 aatgataact agttagaaga tagatgattg aatgataggt agataaatag aagatagata 360
 gatagatgat tgatagatga tagacagata gacagacaga cagacagaca gacagcagaa 420
 agataatgca cgggtgaaaca tggctgtgatt tagttagcaa gatcagagaa gccttctttg 480
 aaagtgcacat ttgagagcat ttcaaacgct gttcatgtca ggcatgcaa tggggagaga 540
 agggcttgcga gaaagcagge ccggcaagcc atggggagca agctaggagg cagcattcct 600
 tgcatttgc tctgcctcag ctgcttctg gagttccccg gttttatca caacagtaga 660
 aataaaacca ggacaatgft gttccatgc atacatctgc aagaacttac tccggttcaa 720
 tagacagacc aaggcacctg tgtttgctca agaagcacgg agggaggtgt gtgcacctgc 780
 tgggtgctgg tctctggct gtgccagaca gagagcaaga caggaaagt cctggtggcc 840
 tagagcacac agcccagccc aggaagtcac gtctctctct gtctctgtct ctgccccacc 900
 cccaccccat ttaggccaga gaacagctgt ggcaagcttt gggtttgggt gagtcattcc 960
 tcaagagcca agagccgccc acctgtatg gggtagttt ttgttgttgt tgttattt 1020
 atttgtttgt ttgtttgtt ggtaaaggtt ttcaatagg agttggaatt tggcaattca 1080
 gctaggetgg ctgagcagcc agctagcccc gggcactcat cctctctac ctccccagt 1140
 ctgggatttc ggttacatgc tgccacatcc gactttttc cctgetcca gttettaaga 1200
 ccaagtcttc atgtcaaaca cttcaccacc ttagccatct ttctgggtca gaagttagat 1260
 cttcaggaag acaaggagtg taccagaca tgagcgtgcc ccaactctgc tcagaccttc 1320
 tgatagagaa aatgggggga ggggtgtcag aggctgccgg agaaagacaa gtccaggtta 1380
 aggaggacga cctgggctc tgaatccaag ggtgattccc tcaccttga cacttggcat 1440
 tttgggaagg aagcatcaga taaaagcagt gcagacatag tcaggaatat ttacacgtgt 1500
 gagtcaacct gggagtgagt ctgtgtacaa ctgaacatga agcaagtttt gaagcttcat 1560
 ttccagacta ttcccagggt gcaataact cctgttttcg ttgcagcctt cccagtctct 1620
 gccactgcca tctctacttc agtctggaat ggtgggcaca cagaaaaagt ctatggcaat 1680
 cctgcgagaa gacaagtggg cgcctgactt cgggctctg ttacaagaga ggaatccagg 1740
 agtttatttt gcagctgatt cagtgttgac caagagtcca gctctggggg agtgggaagc 1800
 aaccaaagca gagacaggtc ccagcacaat ttttggtttt caagacagca cttctctgtg 1860
 gctttgaagg ctatctaga actgttttt gtatatcctt ccttgaact agctcttata 1920
 gaccaggctg gtcttgaact cacagagatc catctgcctc tgctcccaa gtctgggat 1980
 taaaggcgtg cacctcggt gccaccacc agctacatac ataatttaca ataataaaaa 2040
 taaaataact taaagtgtta tagcagttt aatgtaattg gcctgtcat ccatagggga 2100
 gtggcactat taggaggtat ggtttgttt aaggaaatat gtcactgtga ggtgggctg 2160
 tgaggtttc tatgtcagg gtaccagcca gtgtctcagc tgaggctctg ttgectgcaa 2220
 gatgtaggac tctatccct ttctccagca ccatgtctgt ctgcatgcca tcatgttccc 2280
 agccatgatg acaatgtact aaaacctctg aaactgccac ccaactaaat gtttcttt 2340
 ataagagttg ccatgtctat ggtgtctct cacagcaata gaaacctaa ctaagataag 2400
 tgtattctcc cctactcccc atgattttaa atttaggaag gcaggtaggc aggcagcgag 2460

gctggtatag tggttcattc tagcacctga gacctggaat gggaggattg tgagttagtt 2520
 ctaggccatt ctggtgccta gaaaccagag ceggggggttg gcccaatgca gagcaactgc 2580
 tctacgtatg gccagcaca ataagtcaat ttctcacct taaaggcttg acaatttaa 2640
 aacctgggtt tttagttagt cegtgtctgc tccacagatg gagacagcta atcacagatg 2700
 catcaggggc ctctctgagt gctaaacatc aaacagcctt ctccccctct gagcctttgt 2760
 gtgcagaatg tgtccatcgc aagaagcaaa cagtcttget tgcccaccaa ctctctct 2820
 gcatcagaag agctgggtgc aaactgcaag agtagcctca ccttagagat ggggccatt 2880
 gctctacatg ggagcattac ctccaagaa ggcaaaaatg tctcttggtt gagcttttt 2940
 tgtcacctgt taaaggcaaa tcaacagaga ggctttgtct caccactaa catcttgaa 3000
 acaatacca acgaacgctg gggaggatgt ggggaaagca gagccctcat gctctccgag 3060
 ggaaaatcac acccactgtg gaacagtgtg gaaacctca agactgggat tacaagcagc 3120
 acacaagcca gccacgtac tctggctac acaccacaaa gacgcttgea cattcacgt 3180
 tacgtgcga aactagcaa cgttccact gctctcttg agccccgcc cccgccctg 3240
 cccccgcc cgccccgtg gtctatgttc ctctcccta aagtcagctt ccactctct 3300
 gtctccatct tccccacc ctctctctc gctacataat tgtctctatt ccattctct 3360
 gctttgaaac agctttttgc aaagcatcaa atctattgtc ctatgcccc aatcaacctc 3420
 cagtttaca agtgatacag gaaatcgttt tctaattaa aaatcccc tttgaccatt 3480
 tatteccact ctggaacat ctccccctg aggaaagta cagaatgagg tggctctct 3540
 ctctctatc gagtggttc ctccagactt tgcctgtc taatctttt aactgttggc 3600
 caggcctcca ccacggcaca gatgaactgt ggggttcatt tacctgaaac tctatggaag 3660
 gatgtttatt tctcttca tttageaaat gataaagggc accattcaact ctgtctatc 3720
 tgcaggggcc attcctttct ctaggccaga tactgagaat tgcctccaga atcaatgtgg 3780
 tatacatatt tcccccaa cattgatagg cattgateac acacacacac acacacacac 3840
 acacacacac acacagtage acaaatgtat tccccagcc cgttccate ttgccacagg 3900
 actccagagt ggccctggat agcaagcttc ctgtttgtt tctctgttcc tgetctttt 3960
 ccacctcca gtctatctt tctaagtct tctgcaatg tctcttccc aactgtctg 4020
 agatgcagtc attgtctggg attcagacct tctctctctg cccaagtgag tatattgacc 4080
 cccacggttt gtacaacct aactcaggg agcccgacaa aaactgttt atgagccaag 4140
 tagtcccagg acttgagagg tagaggcggg aagatcagca gtttgaggcc agcctggaga 4200
 gcataagagc cggctcaaa acaacaatgg aaactagata ctaagtaaaa atcctgggg 4260
 gtttcatcat gaatgtctgt tctctagta ccacgtgaa ctccgtacac agctccagct 4320
 gttacggctt tctagaatc catactctt tttttttt tttttttt tttttttg 4380
 ttttcgaga cagggtttct ctgtggcttt ggaggctgtc ctggaactag ctctataga 4440
 ccagctggt ctgcaactca cagatcca cctgctctg cctccagagt gctgggatta 4500
 aaggctggeg ccaccaacac cggcagaat ccaactctt tttaaaaaa gatttatca 4560
 tttactatgt atacagctt ctgctgcat gtatccatgc atgtcagaag atggcaccag 4620
 gtcgcaatc agatggtgt gagccacct gtggttctg ggaattgaac tcagaatgc 4680
 tagaagagca accagttct ttaacctctg agccatctct cggccccca gaaatcata 4740
 ttttgagga tttttacac cccccacc aaaagacgta tatctaaatt ttaatgtgag 4800
 aattcacatt tcttaagag ttgaacatag atttagagga aatcagatc ccacatgatt 4860

aaciaagcat gcttgtgggc aggtctgcta ccaagaggtg ggccgtagct tctagctcag 4920
aaaaactcac tcccttcctc gtggcctctt cgcctcaag tcagaaactc accctgtgat 4980
tctgccccag aagtgtctct agagcacagt gcctcttcc gtcttctcact tgtggcttga 5040
attgtgtcca tgccttatga ttacaacccc tcacagagca tcttaactgg tttctttgca 5100
tgcctatggg cactctcca ttctagaaca ccttgccat caatactatg aaaggagggg 5160
tggaggagga agagcaggaa gaggaggggg aagcgaggga agaggaagac acggatggca 5220
atgaggaggg gggagcacc aagtctccc tggatgagag tctcactggg agacttaata 5280
ttaattataa atgcttggtc agcagctggg caggataagg ttaggcagga gaaccagact 5340
aaggactctg ggaagcagaa gggcagagtc agacaaggag aggaaacagg aagtacaagg 5400
taaagtacg tggcagaatg tagataatag aatggggtc atttaagttg gaagagttag 5460
ctagtaacaa gctgagcta tcagccgagc atttataatt aatattgagc ctccatattg 5520
gttatctggg aattggcggg cagaaaaaaa aaagtctgcc tacaagtcaa tgcctatgag 5580
ctccaaagc caaggtacct ttgttcagtg cttgactgag ccagcattat aaattttctc 5640
cagatgtacc gaatecatt tcatagcaac atgcagacat caagtttcc ctgaagctct 5700
aaccagctgg ttgcatgctg tccggagtct cagctataac ccagaagtga cctgggtcgg 5760
ggaagaggtg gtactttgcc ttctttgca tctctgtgtt gectcacea ttcagcttca 5820
agcaatgtga ctgctgacc ctgagggcgt ttacaacgcc tgaccacag accacaagtc 5880
aaccagctgg tgtgctcag atacctagtc tgaacctag cctgctccc accctgctc 5940
catctccacc cttttctcag tctcatcac agctggctag caaagactgc ctgagactg 6000
agcacaggct cactccaca gccgtgactg ttcgagccac ttaaatcaaa gageccttgt 6060
cttccgctca gtaaactct cctcagctca ctgatgactg tgaacttctc tagacagcac 6120
atttgggtt aagacactgc tacttgagct cttcattcag ttctcagaa tacctcatt 6180
gggtcagatt cccaaagagg aagatagggt tctggcaga cagacatgct tcattcctt 6240
gaaatcttc agagaaatgc agtgactatg gcacctctt aaaaagcaca cacacaaata 6300
acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac atateccct cactgctc 6360
cttgatgtg atagatata tataaaatca ttgtttata ctgtgataat tgattatgaa 6420
taaaatttac taaatgaac aattaaaatt atgggggggg ctggagagat ggctcatcag 6480
ttaagagaac agttgctgct cttgcagaac acgagagttc agttccagc accacatca 6540
ggcagctcat aacctgtgt ggtgctagtt ccaggagatc tgggtccctc ttctggctc 6600
ctccagcacc tctacatgt ggttcacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca 6660
cacacacaca caaataaata taaagattat tttttcaaa actgagttaa aataggttc 6720
tatctgattc atactaaggc tttcacagt ggtaagtct attagatag tctagccata 6780
tctttctcc cttcttctt gaggagagge ttttaaagct acaagttaca gccttcttg 6840
caaataagag taccatttaa caggctctg accaatgaga tgccagaatc ggttgcccag 6900
gagcttccca aacgtccat tataggaaa ggtggtacaa accagtagat taggcatgtt 6960
ccacttcta agtgcctgct caaataagga aatggctca aatgtttgcc tttatctc 7020
accacctct gaattgcacg ctagt 7045

<211> 13515

<212> ДНК

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 5

(SEQ ID NO:15)

tctagaaaca aaacaaaaa tattaagtca ggcttgctt caggtgctgg ggtggagtgc 60
 tgacaaaaat acacaaatc ctggctttct aaggcttttt cggggattca ggtattgggt 120
 gatgtagaa taaaaatctg aaacataggt gatgtatctg ccatactgca tgggtgtgta 180
 tgtgtgtgta tgtgtgtctg tgtgtgtgcc cagacagaaa taccatgaag gaaaaaaca 240
 cttcaaagac aggagagaag agtgacctgg gaaggactcc ccaatgagat gagaactgag 300
 cacatgccag aggaggtgag gactgaacca ttcaacacaa gtggtgaata gtctgcaga 360
 cacagagagg gccagaagca ctcagaactc cagggggctca ggagtggttc tctggaggct 420
 tctgcccttg gaggttctg aggaggaggc ttccatattg aaaatgtagt tagtggccgt 480
 ttccattagt acagtgacta gagagagctg aggaccact ggactgagge ctagatgctc 540
 agtcagatgg ccatgaaagc ctagacaagc acttccgggt ggaaaggaaa cagcaggtgt 600
 gaggggtcag gggcaagtta gtgggagagg tcttccagat gaagtagcag gaacggagac 660
 gcactggatg gccccacttg tcaaccagca aaagcttggg tcttgttcta agaggccagg 720
 gacatgacaa gggatgctc ggtttttaa aggctttgtg ttacctaac acttctatta 780
 gtcagatact ttgtaacaca aatgagtact tggcctgtat tttagaaact tctgggatcc 840
 tgaaaaaaca caatgacatt ctggctgcaa cacctggaga ctcccagcca ggcctggac 900
 ccgggtccat tcatgcaaat actcagggac agattcttca ctaggtactg atgagctgc 960
 ttggatgcaa atgtggcctc ttcatttac tacaagtcac catgagtcag gaggtgctgt 1020
 ttgcacagtg tgactaagt atggagtgtt gactgcagcc attcccggcc ccagcttgtg 1080
 agagagatcc ttttaaatg aaagtaagct caaagttacc acgaagccac acatgtataa 1140
 actgtgtgaa taatctgtgc acatacacia accatgtgaa taatctgtgt acatgtataa 1200
 actgtgtgaa taatctgtgt gcagccttc cttacctact acctccagt gatcaggttt 1260
 ggactgectg tgtgctactg gacctgaat gtccccaccg ctgtcccctg tcttttacga 1320
 ttctgacatt ttaataaat tcagcggctt ccctctgct ctgtgcctag ctatacctg 1380
 gtactctgca ttttggttc tgtgacattt ctctgtgact ctgtacatt ctcagatgac 1440
 atgtgacaca gaaggtgtc cctctggaga catgtgatgt cctgtcatt agtggaatca 1500
 gatccccca aactgttgc cagtgtttgg gaaagtgaca cgtgaaggag gatcaggaaa 1560
 agaggggtgg aaatcaagat gtgtctgagt atctcatgct cctgagtggc ccaggctgct 1620
 gacttcactc cccaagtga gggaggccat ggtgagtaca cacacctcac acatactata 1680
 tccaacacac acacacacac acacacacac acgcacgcac gcacgcacgc acgcacacat 1740
 gcacacacac gaactacatt tcacaaacca catabgcata ttacaccca aacgtatac 1800
 ctatacatac cacacataca caccctcca cacatcacac acataccaca cccacacaca 1860
 gcacacacat acataggeac acattcacac accacacata tacatttgtg tatgcataca 1920
 tgcatacaca cacaggcaca cagacaccac acacatgcat tgtgtacgca cacatgcata 1980
 cacacacata ggcacacatt gagcacacac atacatttgt gtacgcacac tacatagaca 2040
 tatatgcatt tgtatagca cacatgcatg cacacataca taggcacaca tagagcacac 2100
 acatacattt gtgtatgca acatgcacac accaatcaca tgggaagact caggttctc 2160
 actaaggctc acatgaactt agcagttcct ggttatctcg tgaaacttgg aagattgctg 2220

tggagaagag gaagcgttgg cttgagccct ggcagcaatt aaccccgcc agaagaagta 2280
 ggtttaaaaa tgagagggtc tcaatgtgga acccgcaggg cgccagtca gagaagagac 2340
 ctaccaagc caactgagag caaaggcaga gggatgaacc tgggatgtag tttgaacctc 2400
 tgtaccaget gggettcacg ctatittgtt atatctttat taaatattct tttagtttta 2460
 tgtgctgtaa taccttgctt gcataaatgt atgggcaactg tatgtgttct tgggtcccgt 2520
 ggaggccagg agagggcacg gatcctccgg agctggcgtt tgagacagtt gtgaccaca 2580
 gtgtggggtc tgggaactgg gtcttagtgt tccgcaagtg cagctggggc tcttaacctc 2640
 tgagccatcc ctccagcttc aagaaactta tttcttagg acatggggga agggatccag 2700
 ggcttaggc ttgtttgac agcaaaactc ttttctgtg attttgaatt ttatttatt 2760
 ttactttttt gggatagaat cacattctgc agctcaggtt gggcctgaac tcatcaaat 2820
 cctctgtct cagtctacca ggtgataaga ttactgatgt gagcctggct ttgacaagca 2880
 cttagagtc cccagccctt ctggacactt gtccaagta taatataat atatataat 2940
 atatataat atatataat atatattgtg tgtgtgtgtt tgtgtgtgta tgagacactt 3000
 gctctaaggg tatcatatat atccttgatt tgcctttaa ttattttta attaaaaatg 3060
 attagctaca tgcacctgt atgctctgt atcatctata taccctctc tcttctctc 3120
 tcttctctc ttcttctc caccccaag catctattt caaatcctt tcccaggag 3180
 atccaagag tctcgttgg ggagatggtg agggggcgat acaggggaag agcaggagga 3240
 aagggggaca gactggtgtg ggtctttgga gagctcagga gaatagcagc gatcttccct 3300
 gtccctggtg tcacctta cagccaacac cttttgtgg cctggcagaa gagttgtcaa 3360
 gctgtgca ggtctgccac acaacccaa tctggccca agaaaaggca cctgtgtgtg 3420
 actctgggt taaaggcgt gctggtctg ctccagctg actgaaact cccgtttaa 3480
 aaagattct gcaaaataat accgcagag tcacagtcc aggttccct gcttctctga 3540
 agcgcagc acgggttccc taggaaatgg ggccttgc tccaagctc cacggttgc 3600
 cctgcaaag gctgaatga tctggcactc tgcgttcca ctgggatgaa atggaaaaa 3660
 gaaaaaag aagtgtctc ggaagcggc gcctcacac aaaccgca cgattgtgta 3720
 aacactctc atfgagaatc tggagtgcgg ttgccctca ctggggagct gaagacagct 3780
 agtggggcg gggggaggac cgtctagca tcttccacg gtctctctg gctgtgtgc 3840
 atccgggaa ccgaaacgc gaactaaagt caagtctgc tttgtggaa ctgacaatca 3900
 acgaaatca ttcgattgt tctctttt tactggaatt ctggattg atagatggg 3960
 gaggatcaga gggggagggg aggggcgggg agacggaggg aggggggag gaggggagga 4020
 ggggaggagg ggaggagggg aaggatgga ggaataact aactttcta attcaacatg 4080
 acaaagattc ggagaaagt caccgctagt gaccgggagg aggaatgcc tattggcat 4140
 tatattcct gctctaat ggaatcaac tttgttcc agcacaag attctgagc 4200
 taccattc aagacagtaa ctacagcca cacggaag gctatacaac tgaagaata 4260
 aaatttca tttattcat ttctgtact gcatgttca atgtagagag ccacctgtg 4320
 ctggggctg atgtctggg cagtagatt ctgagcccgt taactggaac aaccagaac 4380
 tccaccaca gttagactt gctgagagag ggaggccctt ggtgagatt tttgtgtat 4440
 ttatttagag acagggtc atactgtagt ccaagctagc ctccagctca cagaaattc 4500
 cctgttccg tttccaaagt actggagtt tgagtgtg ttaattgac gctaagaatt 4560
 tctgattga agaaaacctc aagtgggtt ggctaatccc cagaccca gagctgag 4620

caggaggaat gagagaatc aaggtttgcc agagccacag ggtgagctca atgtggagac 4680
tgtgaggggtg agctcaatgt ggagactgtg aggggtgagct caatgtggag actgtgaggg 4740
tgagctcaat tgggagactg tgagggtgag ctcaatgtgg agactgtgag ggtgagctca 4800
atgtggagac ctgtatcaag ataataatag tagtagtaac aatgcaggcg aggggtgtgt 4860
tgagtggtag agcagttagt tgatttgaca tgcctgaggt ctcccgtcc atctgtggcc 4920
ctgcaacagg aagggaggga ggaagggggg gaacgagaga gaggaaagag agacagaagc 4980
taagataggg aatgagagag gaaggaagaa acgggaagaa atcagactc cttctgagt 5040
tccgccaacg cctagtaca tctgtgcac accctaaggt ggcctttgtg tggcactggc 5100
ttgggtgtgc gggaaagca tttcagctt gttgcagaac tgccacagta gcatgctggg 5160
tccgtgaaag tttctgcccg ttaacaagaa gtctacta cttgtgacct caccagtga 5220
aatttttta atgtctct ggtgttctgg gttttgcatt tttgttcta aggatacatt 5280
cctgggtgat gtcataagt ccccaaagac acagtggggc tgtgttgat tgggaaagat 5340
gatttatctg ggggtcaaa aggaaaagaa gggaaacagg cacttgggaa aatgtctcc 5400
cgccccccg aattttggtc tggcaaccgt ggtggaggag caagaaacac gtggacgtt 5460
gaggaggcat ggggtctag gaggacagga agcagaagga gagagctggg ctgacagcct 5520
gcaggcattg cacagttca gaaggagatt acagcatgac tgagtttta gggatccaac 5580
agggacctgg gtagagattc tgtggctct gaggcaact gacctagcc agatggtatt 5640
tgaataacct gctcttagag ggaaaacaga catagcaaac agagccacgt ttagtgatga 5700
aactctact ttgctgagt catgtgcggc catgccagg ggtcaggctg aactcaact 5760
caaaaacaag tgagaaattg aagacaatcc gtggtggcag ctactggaag ggccaccaca 5820
tccccagaaa gagtggagct gctaaaaagc cattttgat aggcacagtt atcttgaatg 5880
catggagcag agattacgga aaaatcgaga atgttaatga ggcaacattc gagttgagtc 5940
atcagtggtg ggaaaccag acgttccat ccctaaaag gaacatctt ctctcagtc 6000
aaatggaaat aaaattggg gcttgaatt ggcaaatgat tcagaactct gtgtaggtat 6060
ttcacacgc acagtggata atttcatgt tggagttat ttgtgctaaa aggcagaaaa 6120
gggtaaaaag cacatctaa gagttatgag gttctacgaa taaaataat gttacttaca 6180
gtattcctt aattagtacc ccttccacc tgtgtaatt tctgagata gtcagtgggg 6240
aaaagatctc tcttctctt cttctcccc ctcccctct cteectctc cctcctctc 6300
ctcctctc tctcctctc cctcttctt tcttttttg ctctctctc tetgectct 6360
tctccttct tcttcttctt attctaagta gcttttaaca gcacaccaat tacctgtga 6420
taacgggaaa acacaggctc aagcagctta gagaagattg atctgtgtc actagcgtgc 6480
aattcagagg tgggtgaaga taaaaggcaa acatttgagg ccatttctt atttggcagc 6540
gcacttagga agtggaaat gcctaacta ctggtttgta ccacttctc ctataatgga 6600
ctgtttggga agctctggg caaccgattc tggcatctca ttggtcagag gcctgttaa 6660
tggfactctt atttgcaaag aaggctgtaa cttgtagctt taaaagcctc tctcaagaa 6720
agaagggaga aaggatagc ctgacatat ctaatagact taaccactgt gaaaagcctt 6780
agtatgaatc agatagaacc tattttaac tcagttttga aaaaaataat ctttatatt 6840
atgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gaaccacatg 6900
tagcaggtgc tggaggagc cagaagaggg caccagatct cctggaactg acaccacaca 6960
tggttatgag ctgcctgatg tgggtgctgg gaactgaact ctctgttct gcaagagcag 7020

caactgttct cftaactgat gagccatctc tccagccccc ccataatft taattgttca 7080
 ttttagtaaa ttttattcat aatcaattat cacagtataa aacaatgatt ttatatatat 7140
 catatacata tcaaggatga cagtgagggg gatagtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg 7200
 tgtgtgtgtg tgtgttattf tgtgtgtgtc ttttaagaa ggtgccaatag tcaactgcatt 7260
 tctctgaagg atftcaaagg aatgagacat gtctgtctgc caggaacct atcttctct 7320
 ttgggaatct gacccaaatg aggtattctg aggaactgaa tgaagagctc aagtagcagt 7380
 gtcttaaacc caaatgtgct gtctagagaa agtcaacgct atcagtgagc tgaggagaga 7440
 tttactgagc ggaagacaag cgctctttga tftaagtgc tgaacagtc acggctgtgg 7500
 agtggagcct gtgctcaggt ctgaggcagt ctttctagc cagctgtgat gagcagtgaa 7560
 gaaaggggtg agatggaggc aggggtggag cagggctatg gttcagacta ggtatcgtga 7620
 gcacaccagc tggttgactf gtggtctgtg ggtcaggcgt tftaaacgcc ctcagggtca 7680
 ggcagtcaca ttgcttgaag ctgaatgggt gaggcaacac agagagtgca aagaaggcaa 7740
 agtaccacct ctftcccagc ccaggtcact tctgggttat agctgagact ccggacagca 7800
 tgcaaccagc tggttagagc ttcagggaaa acttgatgct tgcattgtgc tatgaaatgt 7860
 gattcggtae atctggagaa aatttataat gctggctcag tcaagcactg acaaaagga 7920
 ccttggcttt gggagctaca tgacattgac ttgtaggcag acttttttt ttctgcccgc 7980
 caattcccag ataaccaata tggaggctca atatttafta taaatgctcg gctgatagct 8040
 caggctgtt actagctaac tctccaact taaatgaacc catttctatt atctacattc 8100
 tgccactgca ctttacctg tacttctctf tctctctct tctctgactc tgccctctg 8160
 ctftcccagag tctttagtct ggttctctg cctaacctta tctgcccag ctgctgacca 8220
 agcatttata attaatatta agtctcccag tgagactctc atccaggag gacttgggtg 8280
 ctccccctc ctcaattgca tccgtgtctt cctcttctc cgttcccc tctcttct 8340
 gctcttctc ctccacct ctttcatag tattgatggc aagggtgttc tagaatggag 8400
 gagtgcccat aggcattgca agaaaccagt taggatgctc tgtgaggggt tgtaacata 8460
 agcgtatgac acaattcaag ccacagatg aagacggaag gatgactgt gctctagagc 8520
 aacttctggg gcagaatcac agggtagatt tctgactga gggcgaagag gccacgagga 8580
 agggagtgag tftgtctgag ctagaagcta cggcccact cttggtagca gacctgcca 8640
 caagcatgct ttgttaatca tgtgggatct gatttctc taaatctatg tcaactctt 8700
 aagaaaatgt gaattctcac attaaaatft agatatactg cttttgttg ggggggtgta 8760
 aaaaaactc aagaatattg atftctgggg gccggagaga tggctcagag gftaagagaa 8820
 ctggttctc ttctagacat tctgattca attcccagca accacatgtt ggctcacaac 8880
 catctgtaat gcgacctggt gccatctct gacatgcatg gatacatgca ggcagaaagc 8940
 tgtatacata gtaaattgat aaatctttt ttaaaaagag tatggattct gccgggtgtt 9000
 ggtggcgcac gcctftaatc ccagcactct ggaggcagag gcaggtggat ctctgtgagt 9060
 tctgagaccag cctggtctat aagagctagt tccaggacag cctccaaagc cacagagaaa 9120
 cctgtctctg aaaaacaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaga gtatggattc 9180
 taagaaagcc gtaacagctg gagctgtgta cggagttcag cgtggtacta gaagaacaga 9240
 cattcatgat gaaacacccc aggattfta cttagtatct agtttccatt gttgtttga 9300
 gaccgctct fatgtctctc aggtctgctc caaactgctg atcttcccgc ctctacctct 9360
 caagctctgg gactacttgg ctcataaac agttttgtc gggctccctg aagttatggt 9420

tgtacaaacc gtgggggtca atatactcac ttgggcagag agagaaggtc tgaatcccag 9480
 acaatgactg catctcagga cagttgggaa gaggacaatg gcagaaggac ttagaaaaga 9540
 tagactggag ggtggaaaag cagcaggaac agagaaacaa aacaggaagc ttgctatcca 9600
 gggccactct ggagtctctg ggcaagatgg aagcgggcta ggggaatata tttgtgtac 9660
 tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgat caatgcctat caatgttgaa 9720
 ggggaaatat gtataccaca ttgattctgg gagcaattct cagtatctgg cctagagaaa 9780
 ggaatggccc ctgcagaata gacagagtga atggtgccct ttatcatttg ctaaagtga 9840
 ggagaaataa acatcctcc atagagtffc aggtaaatga accccacagt tcatctgtgc 9900
 cgtggtggag gcctggccaa cagftaaaaa gattagacac ggacaaagtc tgaaggaaac 9960
 acctgaata ggaagaggag agccacctca ttctgtaact ttctcaagg ggaagatgtt 10020
 ccaagatgg gaataaatgg tcaaaggggg gatttttaat taggaaaacg atttctgta 10080
 tcaattgtga aactggaggt tgattfgggg cataggacaa tagatttgat gctttgcaa 10140
 aagctgttcc aaagcagaga aatggaatag agacaattat gtagcgagga gggagggtgg 10200
 ggcaagatg gagacagaga agtgggaagct gactttaggg aagaggaaca tagaccacag 10260
 gggcggggcg gggggcaggg gcggggggcg gggctcaaag gaggcagtgg gaacgttct 10320
 agtgttcgca gcgtaagcgt gaatgtgcaa gcgtctttgt ggtgtgtgac caggagtgc 10380
 gtggctggct tgtgtgtgc ttgtaatccc agtctttgag gttccacac tttccacag 10440
 tgggtgtgat tttccctcgg agagcatgag ggctctgctt tccccacac cttcccagcg 10500
 ttctgtgta tttgttcca agatgttagt gggtgagaca aagcctctct gttgattgc 10560
 ctftaacagg tgacaaaaaa agctcaacca ggagacattt ttgccttctt ggaaggtaat 10620
 gctcccatgt agagcaatgg gacctatc taaggtgagg ctactcttgc agtttgcacc 10680
 cagctctct gatgcaggaa ggaagtgggt gggcaagcaa gactgtttgc ttcttgcgat 10740
 ggacacattc tgacacaaa ggctcaggag gggagaaggc tgtttgatgt ttgactca 10800
 ggaaggcccc tgatgcatct gtgattagct gtctccatct gtggagcaga cacggactaa 10860
 ctaaaaacca gtgttttaa atgtcaagc ctftaagggt aggaaattga cttattgtgc 10920
 tgggccatac gtagagcaag tgctctgcat tggccaacc cccggctctg gtttctagc 10980
 accagaatgg cctagaacta actcacaatc ctcccattcc aggtctcagg tgctagaatg 11040
 aacctata ccagctgcc tgectgccta cctgccttcc taaattttaa atcatgggga 11100
 gtgggggaga atacattat cttagtagg gtttctattg ctgtgaagag acaccatgag 11160
 catggcaact cttataaagg aaaacattta gttgggtggc agtttcagag gttttagtag 11220
 attgtcatca tggctgggaa catgatggca tgcagacaga catggtgctg gagaaagga 11280
 tgagagtctt acatcttga ggcaacagga cctcagctga gacctggct ggtaccctga 11340
 gcataggaaa cctcacagcc caccctcaca gtgacatatt tcttcaaca aagccatacc 11400
 tctaataagt gccactcct atgagatgac agggccaatt acattcaaac tctataaca 11460
 ctftaaagta ttttattttt attattgtaa attatgtatg tagctgggtg gtggcagccg 11520
 aggtgcacgc ctftaatccc agcactfggg aggcagaggc agatggatct ctgtgagttc 11580
 aagaccagcc tggctataa gagctagttg caaggaaagga tatacaaaga acagttctag 11640
 gatagccttc aaagccacag agaagtgctg tcttgaanaa caaaaattgt gctgggacct 11700
 gtctctgctt tggttgttc cactcccc agagctggac tcttggtaaa cactgaatca 11760
 gctgcaaaat aaactctggt attcctctct tgaacagga gcccgaaagtc aggcgcccac 11820

ttgttcttc gcaggattgc catagacttt ttctgtgtgc ccaccattcc agactgaagt 11880
 agagatggca gtggcagaga ctgggaagc tgcaacgaaa acaggaagtt attgcacct 11940
 gggaatagtc tggaaatgaa gcttcaaac ttgcttcattg ttcagttgta cacagactca 12000
 ctcccagggt gactcacacg tgtaaataatt cctgactatg tctgactgc ttttatctga 12060
 tgettcttc ccaaaatgcc aagtgtacaa ggtgagggaa tcacccttgg atfcagagcc 12120
 cagggtctc ctcttaacc tggacttgc ttctccggc agcctctgac accctcccc 12180
 ccattttctc taccagaagc tctgagcaga gttggggcac gctcatgtcc tgataactc 12240
 ctgtcttcc tgaagatcta acttctgacc cagaaagatg gctaaggtgg tgaagtgtt 12300
 gacatgaaga cttggtctta agaactggag caggggaaaa aagtcggatg tggcagcatg 12360
 taccgaaat ccagaactg gggaggtaga gacggatgag tgcccggggc tagctggctg 12420
 ctgaccagc ctactgaat tgccaaatc caactctat tgaaaaacct ttaccaaaaca 12480
 acaaaacaaa caaataataa caacaacaac aacaacaac taccatac aagtgggcg 12540
 gctcttgct cttgaggaat gactcacca aaccaaagc ttgccacagc tgtctctgg 12600
 cctaaatggg gtgggggtgg ggcagagaca gagacagaga gagacatgac ttctgggct 12660
 gggctgtgtg ctctagcca ccaggaactt tctgtcttg ctctctctg ggcacagcca 12720
 gagcaccagc acccagcagg tgcacacacc tccctccgtg cttcttgagc aaacacaggt 12780
 gccttggtct gtctattgaa ccggagtaag ttctgcaga tctatgcatg gaaacaacat 12840
 tctctggtt ttattctac tttgtgata aaaaccgggg aactccagga agcagctgag 12900
 gcagaggcaa atgcaaggaa tctgctctc tagcttctc cccatggctt gccgggctg 12960
 cttctgcaa gccctctc cccattggc atgctgaca tgaacagctt ttgaaatgct 13020
 ctcaaatgct acttcaag aagcttctc tgacttctc aactaatca gaccatgtt 13080
 caccgtgcat tatctctg ctgtctctg gctctctg ctgtctctg gctatctc 13140
 tatcaatcat ctatctctc atctctatt tatctaccta tcattcaate atctatctc 13200
 taactagta tcattattt atttgttac ttacttttt tatttgagac agtatttctc 13260
 tgagtgcag cttggctgt cctggaacce attctgtaac caggctgtcc taaaactca 13320
 agagatccaa ctgctctgc ctctctggtg ctggggttaa agactgcaac caccaacgcc 13380
 ccgctctatc atctattat gtaactatta ttcagctatt atctatctc taactatca 13440
 tcactgtct atccatctc tatctctc tetatctc tatctctc tetatctc 13500
 atctataatc aattg 13515

<211> 14553

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 6

(SEQ ID NO:16)

cttgaagaac acatgtttc caagagggag caccatgtt ggaatgaaa ttagttagt 60
 gctctctcc ttaggttag tctctcttg ctataggtaa gtctctctc cctataggtc 120
 agtctctc tctataggt tagtctctc ctctatagg ttagtctcc tctctacag 180
 gttagtctc ctctctc gttagtctc gctctctat agtacctaga gagctaggc 240
 aaatgggcta ggcccgaagt gcagagacaa acagctatgg aagactggg aagcactcc 300

aagctacgaa agagcagtgt gaagggtcag ggcttgtgca gftagtaggg gagatctcc 360
agttgaagaa acagaagaac tgagagccac tgggtatcat cctctcgcgc catgccttc 420
tggatactgc catgctccca ccttgatgat aatggaatga acctctgaac ctgtaagcca 480
gccccaatga aatattgttt ttatgagagt tgccttggtc atgctgtctg ttcacagcag 540
taaaacccta aataaggcag aagttggtag cagtattgct gtgatagacc tgaccatgct 600
ttcctttgaa agaatgtgga tttggtagact ttggattgc aacacagtgg aatgctttaa 660
atggagatta atgggtcadc aattcctagt aggaatatgg aagactttgt tgctgggagt 720
atttgaactg tgttgacctg gcctaagaga tttcaaagga gaagaatttc agaatgtggc 780
ataaagacag tttttgtggt attttggtag agaatgtggc tactttttgc ccttgtctga 840
aaagtctgcc tgagactaaa gtgaagagaa tcagattaat tgcattgaca agggaagttt 900
gtggctgcgc tatctggaaa cttacagcca gcctcttggc cctcgggtga cttacgcaa 960
tactcagga cagagatgct tgactctgta ctgatgagtt gtcttggatg caaatatggg 1020
ctcttcattt gactacatgt cacgatgagt caggagctgc tctctccaga gtgtgacaaa 1080
gcgaggggat gctgacggta gctgttctag ctttgaaggt aagcctgcac ttatgctaaa 1140
gtcacacata cagagccgg gtggagaacc tgtctgtgtg gagacacctt tcattacctg 1200
tggcatccag cctctcaagc ttggactgcc tgtgtgctcc tggactctgg aggtcccact 1260
gctctgtcct ctgctgctta tgatactgac attttaaaag aatccagtgg tccccctg 1320
tactcgggtg ctactctac ctggatgttc ctcaattatg ttctgtgaca cttctctgtg 1380
actctgctgc attcctgggt gacatgtgga caccctgtcc ctttgcagac catgatgca 1440
ctgtcactag tggaaacaga tgecccaagt gttgtcctgt gtttgggaac gtgacaggca 1500
gtacagaagc agaagaggaa gggtgaaaac ggaaatgtca cagcagcadc tgatgtgtgc 1560
ctcagtcacg catgctgctg attggaacta ctcagcatga gagagggcca tggtaatac 1620
acaacctat acacactgtg tccatttctc tctctctctt acacagagag agagggagga 1680
gggggagggg gaggcggagg gggaggggga gggagaggga gtgggagagg gagagggaga 1740
gggagaggga gagggagagg gagagggaga gggagagttt aatgtctgtg aagagatacc 1800
atgaccaaag caactcttat aaaggacaac attttaattgg ggctggctta caggttcaga 1860
aattcagtc attctacca tgggtgggaag catgcaggtg gatgtggtgc tggaggaacc 1920
aagagttcta tctctgac tgaaggcagc caggagaaga ctgcctcttc tgcacagggc 1980
agagctttag catagaacat caaagccctt cccacactt cctccaacaa ggtcatacat 2040
acttcaacaa agacacacct ctaacgggtg cactcctg tggaccaacc atttaaacgc 2100
atgagtctat gagggtcaaa gctctcaaaa ccaccacact catgtacaca cacacacaca 2160
cacacacaca ctctcataca cacacacaca cacactcaca cacacacaca cacacacaca 2220
cacacacaca ccacacacac acacacacac agagttctat tttgactgt ttcactgtca 2280
caaggttcta cttatctcag acacactgcc aggaattgtg tgggaagact ttcagtttct 2340
ttgggttcaac atggacttag cagttcttgg tgactctgaa agatttctgc agaaagaagc 2400
caaagtgtg agcccaaggc ctggccacac attagtctg tctagatgaa caggggttta 2460
aaaataaggg ggcacaaagg tgaagccagc aggggctgac ttagagagga gaccacca 2520
agcccaactgc tcgaagtcaa aagcagatgaa tcccatac cagctgtgcc cgggtctgtc 2580
ttgctacac tttagtaaat gttcttttag ttgatgcgt atgaatattt tcttgcata 2640
tatttgtgta caccataggt gttcctaggg cctatggagg ccagaagagg gcatcagatc 2700

ctttgaact ggaattatag acacttgta cccatagagt agattgtggg aaatgagcct 2760
 ttagcttcg agagcggcca gtgctctaa cctttggtcg ttctccagg tctttgagac 2820
 tttatttct tggacatcag gacaggatcc agggcttga gcttgttct tcagccagct 2880
 ttctttcat gtatattaa tttatgta tttgcttc ttttccca agacagaatc 2940
 acactctata tagctcagc tgggtttaa ttcagttcc ctgtctcagt ctaccgggta 3000
 atatgattac agatgtgagt ctgacttgg tatcaaagtc cccagccct ctggatatgt 3060
 gtttaagga tatcagatat atccttgatt tgccttgaat tttctttta gttacaacat 3120
 aattagtcc gtgtcacctg aatatgtga tgtcacctac atagtcttc ttctctctt 3180
 ctccctctc ccacttccc aggtacctgt ctgtctcat atcctgtgc tgagagtctt 3240
 gttgagggag atgatgaccg agacagagcc actggggaag ggagatgggc tagtgcaggt 3300
 ctccagagag gagctcgtga atattgtagc cctttagtc cctggcatgt cctctgtat 3360
 agccaccgcc atgctgtggc ctggcagaag tgaataagtt gtccagctgt tgacaggcct 3420
 gccctcaga ccagctcga tcccaagaaa gggcatctgt gtctgtctc gaggccgtaa 3480
 gtgtgcctg gttgtctca gcttgaactg acactcctc ctttaataaga gtaccacaga 3540
 acagggctg cagagtccct gggccaggtc cctgtctgt cctggaatgc cagcgtgaa 3600
 ttctctgta agtaggactt tctcgcaca gctcccacgg ctgcccctc agatagccag 3660
 aattatctgg taccctgcat tgccttcaa tacgcagagt atcactggaa gcgcgcgcgc 3720
 gcacacacac acacacacac acacacacac acacacacac acagccac tccatctta 3780
 aacccaccc cccagcaac gcggtgtaaa cactctccat caggaagctg aaacgcagtt 3840
 gccctctgct ggggagatga aggcagctt ctgggggcca ggaccgtgct agcaacctc 3900
 cctggtgca acgggctct gtgatgacg ggaacggaaa cgcggaacta aagtcagtc 3960
 tctttttt tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt ggcgttggtg 4020
 gtggactgag tgacaatcag tgaatcact taggtgttt ttctctctt cgttgggttt 4080
 gatagacggt gggagagggg cagaggagaa ggggagggat ggggagagag ggaggagga 4140
 ggggcgggag gcggggggcg aggaaaact gctaactct ccaatctac aagacaaag 4200
 tttggagaaa gccgactga gtgaccagc agaaggaatc caggaatgc cgctggaatc 4260
 tgactgttga ttccagccc atgcagagaa tctaggtgg taggaacatt cttgtctca 4320
 tccacataa taactcaac caacacggaa aagaaaggct atacaagtga aaaaatggca 4380
 ttttcactt catgactata caatcactc caggtagtaa cacgtgtca gcacagcgtt 4440
 tctcaactg ggggtcacga tccccactt ttctcatat cagacattt tacgttga 4500
 ttcataacag tagcaaaatt gcagctatga agtaacaatg aatgcattt atggtgcgtg 4560
 tgtgtgtgtg tgggggggta tcacctaac attfactgta agaaggtga gaatactgct 4620
 ccagcagcta gttgttga cttaggttct gggtatatta ttagcaatag ccaaccagaa 4680
 tccccacca ccacagcatt gagccccat gcaggcctt ctgggagagg cactgataag 4740
 actttttt gtattttt agagacgaat actcattagg taggccaagc tagcgtcaa 4800
 ctcatggcaa ttctctct cagtttct aagtactgga ctcaggagtg tttgcccac 4860
 atatacagta aggatttatt gactgaagaa aatctcaagt ggctttggtt aatccctact 4920
 acgccagagg ctgaggcagg aggcgcgcaa ggtcaaggct tgcctgggct acatagag 4980
 tgactcaat tttgacactt ggtgcggtgt tagtagtaat agtaaagatg aaggtgtgca 5040
 tcaggtgggg ccggtgattg gacacactg gggctctct gtccatctgc agctgtgcaa 5100

caggaagagc ggagaatgag aggaaagaga gaaaagacag aatgagagag agggaggaag 5160
 agagaaaaag gaaaagagag aggaaaggaa aaaggaaaat gaggaaagcg agaaagaaga 5220
 aatgagaaag aggaaaggga gaaagaaatg agagagagaa aaaaaagac agaatgcgag 5280
 agagggagga agagagaaaa aggaaaagag agaggaaaag aaaaaggaaa atgaggaaaag 5340
 cgagaaaaga gaaatgagaa agaggaaaag gagaaagaaa tgagagagag aaaagaaaag 5400
 acagaatgag agagagggag gaagagagaa aaaggaaaag agagaggaag ggaaaaagga 5460
 aatgaggaa agcgagaaaag aagaaatgag aaagaggaaa gggagaaaaga aatgagagag 5520
 agaaaaagaa agacagaatg cgagagaggg aggaagagag aaaaaggaaa agagagagga 5580
 agggaaaaag gaaaatgagg aaagcgagaa agaagaaatg agaaagagga aaggagagaa 5640
 gaaatgagag agagaaaaga aaagacagaa tgcgagagag ggaggaagag agaaaaagga 5700
 aaagagagag gaagggaaaa tggaaaatga ggaaagcgag aaagaagaaa tgagaaagag 5760
 gaaagggaga aagaaatgag cgagataaaa gacagaatft gagagagga ggaagaaata 5820
 ggaaaagaga ggaaaggatg gagaaaagag agaaagaaa agagatgaaa gagagaaaag 5880
 agaaatgaaa tgagagagag agagagacac aaagagccag agagagaaga aaaaagggga 5940
 aagagaaaaga gaaagaggaa ggctctctt ggacacatct tctttatct ttcctgggg 6000
 accgccaag cctggtggca tactgtacat tctgtacact gttcattca aacaggctct 6060
 gtctaaaga tggctgagc ggtcagaaaa ggtattgtt aactgtttg caaaactgcc 6120
 tcaggagagt gctgagtgcg taaaagtgc tgcctgtaa ggagaagtct ctactactg 6180
 tgatcacc atcgaaaatt tcttaattg tctctggtg ttctgggtt tgcagtttg 6240
 ttttaagga tacattctg ggtgatgca caaagtcccc aaagacacgg tggagctgtg 6300
 ttgatggg aaagacagtc tgctgagat ttatctggaa ctgtcagaag gaaaagaag 6360
 taaatggggc acttgggaaa gtggcctcta gttgacttc tggttagca aaggtgtgg 6420
 ggagataagg catacacagt agttagcagg aggcaacagg gtctgggag gacgcgagc 6480
 agaaggagag gctgggctga cagcatgca tcatgcata gtctccaaag gagattgca 6540
 catggtgag tttcagagg tctacagag cccgtgtag agattctgtg gttctgaga 6600
 caactgact ttagccagat ggtattgag taatctggga gagagaaaac agctacagca 6660
 aacaggcca catttagtga cgaaactct actttgactg ttgagtcatt tgcagtggc 6720
 cctgaggtca ggctggcct cagctcaaaa acaagcgagg aactgaagca attactcaga 6780
 taatccacag ccacagccac tggaaaggc cacatccca gagacagcac agcaggggtg 6840
 ggggtggggc tatgagaaag ttagtattg tagcagttat ctagaatgtg cggagcagag 6900
 gaggttacac aaaaacctag aatgcatc aatgtggga accgagagc tccaagccc 6960
 taaaaggaac agtttcttt cagccaaaat ggaaataaaa tttgggctt aaatctggca 7020
 aatgattcag acctctgtg tagtgtctt taaatgcaca gcagattgat tttcatgtg 7080
 gagttattt gaactaaaag acagaaatgg tgaagacac acctgaagaa attgagatgc 7140
 tatgaataaa atcatfact tacagctatc acttaattag tactctctc caccttctg 7200
 atttattggg ctagtcaag aagaaaagat ctccctct cttctctc tctcccct 7260
 cctctctc tcccctcc tcttgact tctctctc ctctctc ctcccct 7320
 tctctctc accctctc cctcccct ctctgact cctcccct cctcccct 7380
 tctttctc cctctctc ctctctc cctctctc tctctctc tctctctc 7440
 ctctctc ctctctc tctctctc ctctctc tctctctc tctctctc 7500

cctectcett ttccagecct acctacette cctttctct tcatatttc aaagtagctt 7560
 tgaacagcac tactcggttt agttgtgtat aaaaggaaaa tgcaggtcca agcagcttgg 7620
 ggaagattgc tttttgctct ctggaggcag atgatgacag ttcaagatca ttcttttgc 7680
 tccatgtcac aggaaggggg acatgccgaa tetaccagtt tgcagccacc tacacagat 7740
 ccaccttcac ttctaaggaa atgtttggga agctacctac caaccacttc tggcatctca 7800
 tgggctagag gactctaaa tggcactctt atttgtttaa taaaggaggt tgtgactgt 7860
 agttttaaat ccttccaca caacaattgc tactctctga ccaaaaaaga agggagacag 7920
 gatacggcta ggtgtctagt agactttacc actttgaaaa gccttaatat aatcaggtta 7980
 gatacatctt tttacttat tctgttaaag acaaaaacaa aactttttt ttatttgtgt 8040
 gtatgcttgt gtgtgtgtgc ctgtgtgtat accacatgtc gctggtgccg gagaacacca 8100
 gaagagggga cctgatctcc tggagctaaa gctatccatg gttctgagct gctgatgtg 8160
 ggtgctggga acagaactct ggtcttctgc aagagcaaca agcctcctct taactacgaa 8220
 tctctcccc atcccccaa atacatttaa ttattcattt tagcagcttt atttcgtaac 8280
 tacttatac agcataaaac aaggatttta tatatattac atgcaatcga ggataagagt 8340
 tgaggggaga tgcgtgtgct cctctgggtt gtctgtgctt ttgaagaatg taagcagtgc 8400
 acaagggacc gaggcgtgcc tgtctgccag gagctgtctt ctcccttgg actctgagct 8460
 gagtgcagtgc ctccgaagaa gtaaaagacg acctcatgaa gcaatgtctt caacccaaac 8520
 atgctgtcca gacaaagtc agcttcatta gtgctctgag gagagactta ctgagcctca 8580
 ggaaageccc cctcagcatg gcgaaagtc actttgattg aagtactcg aaagccatgg 8640
 cagtgcggcg gcggccgctt ggagcttctg ctcgagtcgg aagcggcctc tttgtcagcg 8700
 ggctgtgatt agcacgggga ggcaggactg gagtgaagga agagtgggg gcggggctta 8760
 gcgctctggt ctctaagct gtagtcagcg cctcaagatt tgaacctgc cttctgctt 8820
 cccagccagg cagtcaagtg gctccaagct gaagactgca aagtgccctt aaccttttgg 8880
 ttatagcgag gctgaagaca cctgtctctt tcatgaaagc cggatgtctg aaatccgatt 8940
 tgataaatat ggataaaacg tataacgctc gatcaatcga atcgaaggag ctacagattg 9000
 gcaccacggc tttggggaca acagagtact gactcgttgg gaggacttgg atactcccc 9060
 tctcttcca tctctcccc ttctctact tctctctct tctcttcca tttctcct 9120
 ctctactgtt tctactatt ttacaaaag atttattta tttatttatt tattattta 9180
 tttatttatt tattattta tttattta gtagcagat aactgtagc tgtctcaga 9240
 cacaccagaa gagggcgtca agttccatta gagatggttt cgagccacca tgtggttct 9300
 ggggctctg gaaggaccgc cagtgtctt aaccttgag ccatttctcc agtacccttc 9360
 teaccgttcc tctcaatct tctctctt cctctccac ttctctgtc ttcttggtt 9420
 cattatctt ctctcttct tctctctc cctctctcc tctctactg tagtttct 9480
 tctctctct ttctctgct cctctctct cctctctat tctctctct ctctctct 9540
 tctctctct ctctctct tctctctc cctctctcc tctctctct cctctctcc 9600
 cctctctc ctctctcc ttctcacc ctctgtcac agtatcaatg gcaaggtgt 9660
 tctagaatgg aggagtgtcc cctagcact aacgaaagcc agttaggatg ctctgagacg 9720
 ggtacaattc agggagggcc gtgggatgg aagggtgtg ctgcattca ttctggagca 9780
 accccagcg agaatcatga ggttggtcc gattctcag ggcacaattc agaagaggaa 9840
 ggttctagga aggacagatt tctctgagat aggagttaca tctgatgtct tggcagcaga 9900

gccactgtac aagcgtgctt tattaaccac gtgggattaa atcttctttt aaatttattt 9960
 tcaactetta aggaaacgtg aactttcaca ttcaaatffa gacttgcagc tcttatgggg 10020
 aaaaaaaggg gatcttaaga atattaagca taggcggctg gagagatggc tcagcggta 10080
 agagcactct ctgctctccc agaggtctcg agttcaatc ctagcaacca cataatagtt 10140
 aacaacagtc tftaatgaat tctaatgccc tcttctggtg tgtctgaaga cagttacagt 10200
 gtactcatat aaataaaata aagaaatffa aaaaaatgaa tattagggcat agattctctg 10260
 atcctaagaa agccatcaga gctggagcca tgtgtgggat cctgcttggg gctggagggg 10320
 cagagtfcac gccccgggg ttttactta ttatcacatt ttcacgttg tttgaaaca 10380
 gggctctgtg tggccaggc tggcctgaa ctcatcttc agcctctacc tcacaggtc 10440
 tgggattact tggftctaa aagtatctcc gteaagctcc ctggtgttat ggctgtgcca 10500
 accaggaggg tctatacact cgctcaggta gagggagaag atccgaatct ctgacaggga 10560
 ctgctgctc tcggggcaaa tggagtgaag gacagcggca gaaggattta ggaaagatgg 10620
 acgggagagt ggaatgctg cagaagccag aaaacaaagc aggaagcctg ctgtccagt 10680
 gggctcaaga gcggagggat gcgagggggc tgcgcaggaa catttagcgt ctgctctat 10740
 gggggtaggg gcgggtgcc agcacctagt cacctgaagg ggaaatgctt gcccaggag 10800
 caggtctcag tagctgacct agagaaagga gcggccccta cagaggagac acgggtcact 10860
 gtttgttaaa gtgaaggaga aataaatatt ctttcaaaga atcttaggtg agcccagttc 10920
 atctgcgctg tggaggcctg gggaacagtt aaaaagacc tgacacacac ccaaggcaaa 10980
 caagcaaac acggctcctt ccgtaagggt ccatgattct ctgaagaatc agccccgaa 11040
 tcagccccgg aatcaggtag tccgtaaaaca caatgagtgt tttactctgc agaagtcag 11100
 cctgctggcg tctcccatta ccaaaataga gggatagca cgtgagctca ccgctcgat 11160
 ttaaggcacg tggtttcca gggtagatga gcttggctt ctggaacct tatggggcac 11220
 gaaggatgga gccagattt tttttttt tttttttt tattagcaat tgatttgett 11280
 gggcttggct ggactgccc agttcttagg cccagtctt ttaactgcc atctgaagtc 11340
 tgtcatggag tcagcctagc ctctcactt ccttcagct cgaataggaa gaggaggtgc 11400
 acaccagatg gtctgagagc agggataaat ggtgtgcctt tgtcttcag tatttctta 11460
 ttttaagtag gaagatgctt ttctgtatta cattgctgt gaaaccgaa gttgattcgg 11520
 ggcacaggac aatggattg gtgtttgca aggactgtt cagaagagag aggagtggaa 11580
 ggggtggttag agtgaggagt ggggtgggac gggatggggg aagagaagga agggccagac 11640
 aggctaggta gggctgagag gaggcgggtg gaactcttg agttagcgc gcagtaaact 11700
 tggatgtgcg tgtatcttg tgatatatga cccggagccg ttagctggc tccgatagta 11760
 ctgctaafgt cagtgtcggg gggggggggg cccatactgt tccacagggg ctgcacatc 11820
 ccactgagag caggagggt cctctctcca tacatctcg ccagcattcc ttgtgtttc 11880
 tgtgatgaca ggggtggga tgaatctct ctgttggtt gagagaccgt gaagaagctc 11940
 aaccacagga catttgcag tcttgaagg cagtgcctc atgtggagcc gtggagccca 12000
 tctctgagtc caggtcactc ttgactctg cactcagctc ttcagatgca ggagagacgt 12060
 tgggtggaaa gcaagattg ttgcttgtg agatagacac attctccaca caaaggctca 12120
 cgtggggcaa aggctgattg acgtacagc ttcaggaacg cctgtggtag agctatgatt 12180
 agctgtctcc atctatgaag cagacaaaga gttataaaaa aatcaatgt tttcaaattg 12240
 tcaactttt aaccgacag caagcgtct gtcctgggc taatccctag ccctggttc 12300

ttgagatggg gtcttttgtg cactagactg gcetagaact cacgatctta gtgttccage 12360
 ctcccagctg ctgggatgag ccgctataac cagtctgcct gccttcctaa attttaagtg 12420
 atgggaagtg ggggagaata cagtttaaag tatgcagatc tgagagcagg aacctggcaa 12480
 agccaagggg ccggagttac aggcgggctaa catgggtgct gggaactgac ccaggtcctt 12540
 gagaggagca gtgtgtactc ttgaccaaac aggtccgtct ctccagtccc cgtagtatta 12600
 aaaataggtc ctacgggcat ggtggtgac acctttaatc ccagcactag ggaggcagag 12660
 gcaggtggat ttctgagttt gaggccagcc tggctacaa aatgagttcc aggacagcca 12720
 cggctataca gagaaacct gtcttgaaaa caaacaaca aaaaatagg tactacaaag 12780
 cgatgtaatt gtgctcaaac atgcaaacg aggggactgt atgcataaga aagagaaaga 12840
 cggccact ggttctatct ggtgacagg aatcagtat tttattttt cacattcatt 12900
 ttttgtgtg tgtgtgtgac acagtattt ttctacaaa aacattattt cttttatagt 12960
 tccctgagg agctgtttt aaagccgtgc ttgaaaaac cattgaagga gcagaggcag 13020
 ggagactcct gtgtggcagt cgggaaagca ggcctctgc aggcaggctg gcctggact 13080
 tgggagtctc ttccctccc tctgtgctc aaatagcaaa tgcaggctt caatgtagct 13140
 agaaggttct agaatgatta agttccaag gctgaagagc tccctgttt gcctttcact 13200
 tccctggaga ggtcgttgtg tgttccggag tctgcaaggt gcctttggtg atgcgggtgg 13260
 ttcatctcgg gagattccgc ctggaggacc caagtcaag cctgcctga gctacagagt 13320
 gactttcagg tcttctcgc aattcagta gaccagtct acaataaaa agtaaaaaga 13380
 aggctgtgga tggaaactcg tggtagatt ctgggtttac tcctagagg aggggagaag 13440
 gaggaggagg gaggaggaag aggaagaaag aagaagaaa ggaagagga gaaggaagg 13500
 agggaagggg ctgacaagaa gagagaagag ggaggagggg gagggaaagg aaggggaaag 13560
 gaagggaggg aaggggctga caagaagaga gaagaggag ggaggggagg gaaaggaagg 13620
 ggaaagaaga gaaggtaag aagaaactgt tccaatggtc tgggccacag agtgatggcc 13680
 ttttgggtg atcagctgta atccttgatt tgacacaacc tagaatctgg gaagcgagtt 13740
 tctgtgaag agcattcaca ctggctggcc tgtggcgtg catgtgggag actgtcataa 13800
 ttaggttcat taatacagga agtcccagcc cactacaaat ggcttcgttc cataccaag 13860
 agatgetaac ttagacaggt tggagaaagc aagcaagctg tggataccc acgtctttc 13920
 acctcggctc ctgggggggtg ggtgactgt gtctcttgg attttaaagt cctgcctga 13980
 cgtccctget gtgacagact gtaactggaa ttgtgagctt tagtcttta gttttctac 14040
 ttggttttc tcaggatatt ttatcagct aacagaaaca agaccaggac acttgatctc 14100
 ctctgateca cactgaagag ttacaaaaca ggtgaggaa aaaaacttc ttctcctct 14160
 cccctctg tccctccc tcttctcgc tccctcctt gcccctctc tccctgtctc 14220
 tgtctctg tctgtctg tctctctc tctctctc tctctctc tctctctc 14280
 ctctctct ctctctct ctctctct ctctctct ctctctct ctttctctc 14340
 tatctctaa atggctggag gccatctag ctcaatgtt aactttgaac acgtatttag 14400
 gaaatcttt ttctaacag ttctgaagt ctgaagtgt ggttagtct ctggcctga 14460
 caagctcact tctctcact ctgtctaat gaccaaatc gccatttccc taaaacagca 14520
 caggtccag ctccaggtt ctccggagc gag 14553

Последовательности стабильного сайта 2 СНО - патент США № 9816110

<211> 4001

<212> ДНК

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 1

(SEQ ID NO:17)

ccaagatgcc catcaactga ttaatagatg ataaaattat tgtacatttc agtgtaatat 60
 tattcagttt ttaagaaaaa tgaaffatg taataagcat gtaatggat atatctgaa 120
 acaaccattc cccattatat tacctaaaca ttgaaagtcc aaaatcatat gatcttttta 180
 gtggatctac taatctttg ctatatgtat tttattgaac tacccatgga tgtgagataa 240
 ttgtaacaa cagcacatgg gagagcatgg gatcattcaa ggaagattag agagaatgca 300
 ttttttagga gataatggag gagcaataga aaggatfaaa tgaggttact gatgaaagtg 360
 atggttagag aaggcaatat gaggaggat aactagcaact tagggccttt tgaaaaagac 420
 atagagaaaa tactattgta gaaacttct ataattgggtg tatagttata tacacaaag 480
 agtcagatg gagttaccct ataatggaaa tattaactac tttttatcac tgtgataaaa 540
 catcctgaac agagcaacat agattgggaa gcatttactt tggcttacag ttctaacggg 600
 ataaaaattc atgatgaaag aatgaatag tcagcaaaaca gcagtagcaa tggcctgaga 660
 agcaggtgag agctcacatc ttgaagtgta agaattgtagc agagagaaca aactgcaat 720
 gaccagaaaa tgcttttggg tcagagccca taccctctg actgacttct ccagaaattc 780
 tgaacaaata aaactcccca aacagagcca taactgaagg tccagtgtct gagactacta 840
 ggggtatttc ttattcaaac cactacaatg ggggtgggggg agcaatcctc caagtaggca 900
 ctacacacag acaataaaaa actctagtaa ctggaatgga ttgacttatt tgaattactt 960
 gccagtggag ctacatagag cacaattatt gtattfaaat taccctttat gatcttaca 1020
 aactgacag taagatcata ttgctaaaga aaccacatat ttgaatcagg gaacatggtg 1080
 atatctagtt gttcttcaac tggaaacttc atgctttctg cccagcattc atgttgctgg 1140
 aaagagcaat gtactactacc agttagaana ttaaatcacc aatcttaca agatgtggat 1200
 cctataagtt acaataaaaa ttagctgat aagatatecc caccagaaga atattacat 1260
 aatgctatg ggagcaacaa gctattttct aattagctt taatcctatt ctacaagaga 1320
 gaatccatat ctagaatagt fatagggatc aagaacccat ggcttgattg gtcatagccc 1380
 caatgggaga tctaatatt attgttctac aaaatgaaaa taactcctaa tgacttggg 1440
 ctgcagtaat aagttagat gttgctcaac tctcacaaga gaagttttgt cttacaataa 1500
 atggcaatta aagcagcccc acaagattta tatcataccg atctctcat ggcttatgca 1560
 tctagaagct aggaacaaaa gaggacccta agagagacat acatgggtccc cctggagaag 1620
 ggggaaggggg caagacctcc aaagctaatt gggagcatgg gggagggggag agggagttag 1680
 aagaaagaga aggggataaa agggaggaga ggaggacaag agagagaagg aagatctagt 1740
 caagagaaga tagaggagag caagaaaaga gataccatag tagagggagc cttgtatgtt 1800
 taaatagaaa actggcacta gggaattgct caaagatcca caaggtcca ctaataatct 1860
 aagcaatagt cgagaggcta cctfaaaagc ctttctctga taatgagatt gatgactacc 1920
 ttatatacca tctagagcc ttcattcagt agctgatgga agcagaagca gacatctaca 1980
 gctaaacact gagctagttg cagacagggg ggagtgatga gcaaagtcaa gaccaggctg 2040

gagaaacaca cagaaacagc agacctgaaa aaaatgttgc acatggaccc cagactgata 2100
 gctgggagtc cagcatagga cttttctaga aacctgaat gaggatatca gtttgagggt 2160
 ctggttaatc tatggggaca ctggtagtgg atcaatattt atccctagtt catgactgga 2220
 atttgggtac ccattccaca tggaggaatt ctctgtcagc ctagacacat gggggagggt 2280
 ctaggtctctg ctccaaataa tgtgttagac tttgaagaac tcccttgaga agactcacc 2340
 tccctgggga gcagaaaggg gatgggatga gggttgggta gggacaggag aggaggggag 2400
 ggtgagggaa ctgggattga caagtaaatg atgcttgttt ctaatttaa tgaataaagg 2460
 aaaagtaaaa gaagaaaaga aacaggcca aaagattata aaagacagag gtggtgggtg 2520
 actataaaga aacactatta tctaaataaa aacatgtcag aagcacacat gaacttatag 2580
 tgtttatgaa agtatgtata ataactacat aatctcaagc caagaaaaa atatcatctt 2640
 tcagtgatga aggtgatttt atttctccca gaattaaagc caaagaccta atgaaagtaa 2700
 ttatctcaa aaggttgaaa atacatactt tgcaatacac agatctgcct agaaatctca 2760
 tgttcacaat acacatgatg ctcaattgaa ttccattcaa tgttacagtt tagataaaca 2820
 gttttagat aaactcaca tgtatcttt cttttattt tttgaccaa cagcttctca 2880
 tctgttatc agaataatc ctgatggca ggatatccat cccaattggg ggaaggggag 2940
 aatttgaaga aaacctagac cacatacata tttgccattg gaaacaaag tctaaatga 3000
 tgtgttcac atctctcta ctagctctct cccctccca aagaacctg gtatatgtgc 3060
 ctatcttac agagagagga aagcaggaac tgagcatccc ttacttcca tctcaacc 3120
 aaaatttga ctattgtca gctctgcct tctcatatga cagttacaag tcaaggcttc 3180
 caaagtcct ctgtcatgtt tgggtcaat agtttataca gatgacttca tgtctcata 3240
 tctaatgtct tatatagatt aatattaaac aatgtattt cttaaccac attttaaatt 3300
 aatttaaaa tccattaatt gtgtctataa aatgcagaca gagtgtgag acacaatata 3360
 agcctgatga tctgaattt aaactcacac ccaccacatg gagaatcaac ttccaaaaat 3420
 tttctatta ctccacact tacaccattg tacaacaca ataataatga acaaatgaa 3480
 atgaaataa aaattaaagc tctgtaggta atgctactgt gcagcaaaag taaaatggc 3540
 agcttaaget tgccttatgg ttacacttta ccatctcca ttaattataa ggacttcaat 3600
 catggcagaa ctatgtgtt atgtctcag tgtaacctaa ccaggtgttc cagatgttct 3660
 taatgtggac acctaaacta tttgatattt gggtaagat cttccctct tcagaagaa 3720
 acctcaggac agaggggaatc ttgtcttta atttgagtc ttagacttt ttccatttca 3780
 aatatacatg aaacaagtga tgaagaaaat taatcaaaag gtgggaattg caatgatatt 3840
 aggttcaata ttaagcttca atattatcat ggaatgcct gttatacact gagtgtttgg 3900
 caataaggga tttttagaag aaggagtttt tattctcaac aggttctta agtttagctc 3960
 aaataaatct aagcaatcca ctctagaatt aatagtttc c 4001

<211> 14931

<212> ДНК

<213> *Cricetulus griseus*

<220>

<221> прочий_признак

<222> (2176)..(2239)

<223> n представляет собой а, с, g, t или нуклеотид отсутствует

<400> 4

(SEQ ID NO:18)

catgtacact tatgcaagta tgatatggcc caacacagta ttttacacca attttatct 60
 ataaaatata catgtacac aaaatatatt attaataata acatcattat tttttcttc 120
 caagtaataa acacatacac tgaatfttg gttcttggg ataatttaa tgaacagga 180
 aatgcaaatt tatcttagca tgtttacttc actttcttg catagataac cagtaatcac 240
 attgatggat catgtagtga aatgtatfff taggtatcta aggaatttg gcttcgttt 300
 gtgcttggg aactgaatt ctattcctaa caacagtgtg taaggattct gctgatttc 360
 tttfaccagt atftgtccat ttgcatttcc tttatttct atggctgctg ttctagaaag 420
 tggaaagtag tgtgtcaagt ctgtttaaca tgtttccctg atgatcagtg tcttaacacc 480
 tctctgagta catgttggcc aatgtcgttt ctagacccat ctattcttgc ttgacttate 540
 ctggtacatg cctgccaaga aatttctcct catcctttct gctctttcac tgatttactt 600
 gatgtgtgga tttcacattg atcatatgga aatagaagat acaattttct ttattcacag 660
 tttggaagac tttcaatctc atagatcacc attatttttt gctactgttc cctatgctat 720
 ggtgaaattt ccatttgaat aattgcttaa acaattaaca agaagaate ttttttact 780
 tgcaataact tccatttcag aacatttact aactgttac tatatccaaa aactagtttt 840
 atatatcatg tgagaaatga ctaattcata atftggccat gacatttttt tcagaaacag 900
 aaaaagtgc caatacacac acaatgctat aatattaag acttcagcaa attaaatt 960
 tattcatgat atcacataaa attcatttat tatgttttat ttaaattgtt ttttaaaaca 1020
 gtggtatcac taaatattaa gttagatgtg tttatgtgct taatgaattt atattttaga 1080
 atgttataag ttgtatatag tcaaatatgt aataaatttt attttttagg tctttctcat 1140
 taaggatttt taattttggg tccctttcc agagtgactc tagctcatga tgagttgaca 1200
 taaaaactaa acagtacaaa atgtacattg cattcagatg tgcacttgat ctttgcactg 1260
 aagtttgagt cagttcatac atttagtact tgggaagtac attaagctaa ctttcattgc 1320
 tctggcaaaa tctctgataa gataagagtc ttttgggaa agccatggca gcaggaaagt 1380
 aagactgctg atgatgttta atccatagtc aagacgcaga aggagatgaa tgctggtatc 1440
 caacattttt tctgtttcat tttctctaga accctagtc ataaagatgt atgacttgc 1500
 ttcaaatgc gtcccttca gttgttcaac tttctgtaa atatccttcc aggeatgtct 1560
 agaagattgt ttcgcaataa ctctcaate cattcaagtt gatagtgcag ataatcact 1620
 gcagaataaa agcctgtaac ttggctcag tgccaaggaa tatgcacact cctgacacat 1680
 caataagtaa atcaaatgtg agcttttggc tttaacattg ccagacttat gtaatgttct 1740
 gcacttctt cctccatcac tttttattct aatgggtttt ccttgacatt gaatcacgct 1800
 gtggaagctg cftagaatta acattgaaat ctactgatat atttatgatg cagcaattta 1860
 gatttactat tttacttaga atttttata attgagagaa tataatattt tcacagttat 1920
 ctatctgctg taaatagagg attttaaaaa aaatctctat aacttttttt tacaacacac 1980
 agtaaaatta agttaaatt taataaagtc actatgttga ttcaaatgtg tgctacgccc 2040
 acggtggtca cgcaggtgta gcagaagatg ccaactaaggt gggctaagcc cgtatgggtg 2100
 gggctcgcgc tccctggaga tgagccccag gcggttccct ggcaatcagc tgcgatcatg 2160
 atgcccgatg agccannnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 2220
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnc tgggtgactt tatggaaaga atftgataga tttcatgatg 2280

tagaagaatt ttattagget tattttacag gagactaaga ccttgggacc taaagatate 2340
tgggtcctga gaacaggaa atgggtagag acgtgggtga tggtatgaga cagatttag 2400
agaactctta gatcatgggc aatgaccgca atctgatgct tagaatagat catctataaa 2460
caattatgct gttcttttc ttctgtgtg atgatctgat gatgtagccc ccttgccaag 2520
ttccctgac ccccttgcca agttccctga ttgtaacagt atataagcat tgcttgagag 2580
catattcaac tacattgagt gtgtctgtct gtcatttct cgcgattcc tgatttctcc 2640
ttgagccttt tccctgttc tccctcggtc ggtggctccc acgagaggcg gtccgtggca 2700
aaagtgtata aatgttctaa aacattgaa ctctaaaaca tgcaaatga aaaattaaa 2760
taaataaaca tgaaaattaa aatatattag ctgctaaaag ttaacaata ctatataata 2820
ttttgtatt agaattcaaa atcacattag ttggattaa ttgaacatt gcattcttc 2880
aataataatt tcaataaaaa agtttcccc atgatagtag aaaataataa catatgatac 2940
tatctattta tttaactaca catatagc atttgttca actaaaataa atgaatgagc 3000
aaagcaccta agtaattggg gtctattata ttatgaagc caatagtctc aaataaatta 3060
tcatgcataa ggaggtattg caaatgttaa acctttttg aaacagatat tcccagtac 3120
agaaattata atttctaate ttctataa gtagaatgat gataattaat atagccatt 3180
tgtaaataat gttcagatta aaatattctc tatttacta gagaagaatg atattaaatg 3240
tattatatt tatttccat ttgtttgca cactattct ataccctca gcagttaaa 3300
ttgtttcac catatgtgtg tgtgtttga tcttaaatat ggcactaaa ttagaataat 3360
ttaatataa tctttaggag aaaagatatt gaattattt atgttgatag gaaaatatct 3420
tttaattgtc caagaatact tttcttcta ttttaggact gatcagacc aggactaata 3480
ttttatgt actaattcta tgtacaaaa tatgttatta tctcatgaat tctgtctca 3540
tattgagga ataaaaatag tccatcatga actttaaaat taaaataatg attaattaat 3600
ttttattcat atttgtttg tatgaatgg tatacatcac atgtgtcct ggtgactgtg 3660
aatgtcagga gaaggtatga aagccactgg aattggaata agagataata ttgagatgt 3720
tatgtgggtg ctgagaatta gacgcaagcc atctcaaga atagccagca tactatacca 3780
ctgagtaac cattcatccc tcaataatta tctttgtaga cagtaaatat atttetaaac 3840
tataaatgac cagaaaaatt aatgtattat taatgaagac atctatctca tgtgacacac 3900
ttcacctgtc taaatcagta acactctct cactaattaa gattttctaa gtgcatgaca 3960
cttactattt ctaaagctgt ccaatggggg ccagtcacca gtcagcacc agtgagataa 4020
tccatgaatg catttatate ttaggaaaa ttcttatcta ttagtattt agaacattt 4080
catgtgaggg gataaacaag gaagcacaga tgctttctga tagaaacttt ctcttaatt 4140
catctagaaa aaaaaaacct ctaggaaaa tctctctgc tctctccca atgctctatt 4200
cagcatcttc tccctactta attctagac ttttcteta tgctctctg ctgctgccct 4260
gctggctctg ctctatgct cccatgctca cttttttg ctatctcacc gttacctct 4320
ctgctcact ctctgcttc ttctctgct ctcacatggc caggctctgg acaattatag 4380
ttatatttta cattctata acacatgata tgcacatag ttctctcag gctagggata 4440
tcacaatgac tggcaatga gcaagtggcc ttgcatgtag ctctaattg gtgatggtc 4500
ccagacagta agtagccatt tggttgaaat ttgaggttg gtagtcatg aagactgaat 4560
ttcttcaaa ctctggcctt gaaatagtaa aacaacacct atgaaatga cgacctgat 4620
ttgtcttag aggcaaccac atattgtctg caggcctgc ttgaaattg ctctgaagt 4680

agcttgttg tgtaaaagga agaatcctat atcagcctga gaaatgtaa atacctagc 4740
 atttcaagtc atcaaaatta tatggagagt ataatcctc ctctgacta ttcatagtca 4800
 tatttgtgtc caccaagtat aaaacacact accaaagggc tgtggaaaaa atgccataa 4860
 ctgttcttat tagggaggca tagcagtggt acctgaggaa gttacagcaa caaccagtca 4920
 tccagtcaat aacccatgg cttgccact tggaggtacc caataatgtt tggctttgcc 4980
 gagtaggact ccaacaaatt cagagggta attttfaat gctggttgc actgctgaac 5040
 agtcccattg cctctgcat aattccaca tggaaagctt ttactactga ttgccaatca 5100
 ttaaacagcc tactcagcat aaacaggtat gatattatc tgcattttgt tacattacta 5160
 gatgaattcc tatttcttcc tacaatagtg gaactgaaaa aagatacaca atcactactac 5220
 cctctacta atcttatgac ttatatcatt tcaatttca gaccataatg caaactattg 5280
 accaaaaat gtgaagatga aaaatagaaa tgtagaataa tattacatat aaaaagaaaa 5340
 ggcggactta tttgtttta tttcttagca tgcatagcaa tacatgattt gaggtttata 5400
 taataaaggg acaataaatc ttcaagaaac ttaccctac tgaattaaa tattaagaa 5460
 ggtcacacat ttactcaaat atattagact actgggcaaa tagacatgaa aagtagagtt 5520
 aatattgagg taggccttct gtgaaatgc taaggaaatt atgtttcata cagtgtgtaa 5580
 ccaagtggga atcatatcag aaagcagtc aaagcttata ttacaagtaa cagatgcttg 5640
 gttatatgac ctcccagagc ttgactgtct atacacaaaa agtgggtgta ataaaactgt 5700
 aatttgggct atgtttttt aaatggctc accaacatga aaggaaggga atgagcatgt 5760
 catggatgct tagagattat gcttccagca agaagaattg agctttggct cttattacag 5820
 aaacatgaca aggtgtgagt tttatttatt agaaattata taatattta agctggggac 5880
 taaaaattt atgaaacaa acaggcaagg gatagggcatg tactagaagc aaaaatagga 5940
 tgcattgct gtaattttt ttttggacc aaaatagtat ttctataga aatgacaatg 6000
 atcttaggtt attattctc ataaagatga caagttcaca agataccta gttcattaa 6060
 atcgttttag tcaattata gaggctgtg atagattaca caaaggaaag cacttacgat 6120
 gagaaataat gatatccaca attatttct taattcttag aaacattcta ttgttatc 6180
 tcaatctcag aagccactta ttgctttatt attgaaacat atgaaattgt aagttatata 6240
 ttgtctatgg tgacattca aagaacatgt gacgtacagt gtagcacaga taaagaacat 6300
 aactgcagct gaatcagtaa ctaaacttac atacattaaa tctgcatgt tggcaacagt 6360
 gtgtgcaact ccaaaggatg tactaatgct cagcactc cctatgta cctttgttc 6420
 atcattacat cataggtcta tttgtttgc tttgaaatc tagaccaagt cttttgtgc 6480
 ttccaagca cagagctcat taatttacct catagactg ttaaacttct tetggttcat 6540
 caattgaata gaaactca ctactaatta tgtgagacc tggcagttacc atagcacatg 6600
 gataatttt acataaaaca tgcatacaag taagattatt cagactgaac atgaattta 6660
 gagaaatcag gaaggagtat atgggagtgg ttggagtgag actagagaaa tgtaattaa 6720
 ctataatctc aatacaaaga tctactaagc aaaaacatg aaacattgtc attcaagtga 6780
 aacatcagtc ttcaaattgg aaagatattt ttactaggaa aatgtctggt agatggttat 6840
 tatctagaaa acacaaaaat tagaaaacgg taaactftaa taaaagaat aatacaatga 6900
 gactacatga aaagtctta actaatgaaa caaatatctt gaaactttt tcttaaaagt 6960
 ttaatatcaa taaccatcat ggaaatcaa attaaaacta ttacatatt acccctgaaa 7020
 taataactaa taccaataa aaataatata aacaaaaat ggcaatgcat gccatcatgg 7080

atttgggaga gagaatgttc attgcagttc tgaatggata ctggtgccac cacggtgaaa 7140
 atctctgtat aggtccttcc aaaagctgaa aatagacata tcacaagacc tgccacacat 7200
 ttttcaagca aatacccaaa ggactctacc tgactgcaga gacactttct cataaaatat 7260
 tattgtgat ctattcataa tatctggaaa atagaaacag ccaagatgcc catcaactga 7320
 ttaatagatg ataaaattat tgtacatttc agtgaatat tattcagttt ttaagaaaa 7380
 tgaattatg taataagcat gtaaatggat atatcttgaa acaaccattc cccattatat 7440
 tacctaaaca ttgaaagtc aaaatcatat gatcttttta gtggatctac taatcttttg 7500
 ctatatgtat tttattgaac tacccatgga tgtgagataa ttgtaacaa cagcacatgg 7560
 gagagcatgg gatcattcaa ggaagattag agagaatgca ttttttagga gataatggag 7620
 gagcaataga aaggattaaa tgaggttact gatgaaagtg atggttagag aaggcaatat 7680
 gaggagggat aactagcact tagggccttt tgaaaaagac atagagaaaa tactattgta 7740
 gaaacttct ataattggtg tatagttata tacaccaaag agctcagatg gagttaccct 7800
 ataatggaaa tattaactac tttttatcac tgtgataaaa catctgaac agagcaacat 7860
 agattgggaa gcatttactt tggettacag ttctaacggg ataaaaatc atgatgaaag 7920
 aatgaatag tcagcaaca gcagtagcaa tggcctgaga agcaggtgag agctcacatc 7980
 ttgaagtga agaattgagc agagagaaca aactgcaaat gaccagaaaa tgcttttga 8040
 tcagagccca taccctctg actgacttct ccagaaatc tgaacaaata aaactcccca 8100
 aacagagcca taactgaagg tccagtgtct gagactacta ggggtatttc ttattcaaac 8160
 cactacaatg ggggtggggg agcaatctc caagtaggca ctacacacag acaataaaaa 8220
 actctagtaa ctggaatgga ttgacttatt tgaattactt gccagtggag ctacatagag 8280
 cacaattatt gtatttaaat taccctttat gatcttaca aacttgacag taagatcata 8340
 ttgctaaaga aaccacatat ttgaatcagg gaacatggtg atatctagtt gttcttcaac 8400
 tggaaacttc atgctttctg cccagcattc atgttgctgg aaagagcaat gtactactacc 8460
 agttagataa ttaaatcacc aatcttatca agatgtggat cctataagtt acaataaaaa 8520
 ttgacctgat aagatatccc caccagaaga atattccat aatgctatg ggagcaacaa 8580
 gctattttct aaattagctt taactctatt ctacaagaga gaatccatat ctagaatagt 8640
 tatagggatc aagaacccat ggcttgattg gtcataggcc caatgggaga tctaatatt 8700
 attgttctac aaaatgaaa taactctaa tgactgttg ctgcagtaat aagttagtat 8760
 gttgctcaac tctacaaga gaagttttgt cttacaataa atggcaatta aagcagcccc 8820
 acaagattta taccataccg atctctcat ggcctatgca tctagaagct aggaacaaa 8880
 gaggacccta agagagacat acatggctcc cctggagaag gggagggggg caagacctcc 8940
 aaagctaatt gggagcatgg gggagggggag agggagttag aagaaagaga aggggataaa 9000
 aggagggaga ggaggacaag agagagaagg aagatctagt caagagaaga tagaggagag 9060
 caagaaaaga gataccatag tagagggagc cttgtatgtt taaatagaaa actggcacta 9120
 gggaaattgc caaagatcca caaggtccaa ctaataatct aagcaatagt cgagaggcta 9180
 ctttaaaagc ctttctctga taatgagatt gatgactacc ttatatacca tcttagagcc 9240
 ttcatccagt agctgatgga agcagaagca gacatctaca gctaaacact gagctagttg 9300
 cagacagggg ggagtgatga gcaaagtcaa gaccaggctg gagaacaca cagaacagc 9360
 agacctgaaa aaaatgttgc acatggacc cagactgata gctgggagtc cagcatagga 9420
 cttttctaga aacctgaat gaggatatca gtttgagggt ctggttaatc tatggggaca 9480

ctggtagtgg atcaatattt atccctagt catgactgga atttgggtac ccattccaca 9540
tggaggaatt ctctgtcagc ctagacacat gggggagggt ctaggtcctg ctccaaataa 9600
tgtgttagac tttgaagaac tcccttgaga agactcacc tccctgggga gcagaaaggg 9660
gatgggatga ggggttggtga gggacaggag aggaggggag ggtgagggaa ctgggattga 9720
caagtaaatg atgcttgttt ctaattfaaa tgaataaagg aaaagtaaaa gaagaaaaga 9780
aacaggcca aaagattata aaagacagag gtggtgggtg actataaaga aacactatta 9840
tctaaataaa aatattcagc aagcacacat gaacttatag tgtttatgaa agtatgtata 9900
ataactacat aatcacaagc caagaaaaaa atatcatctt tcagtatga aggtgatttt 9960
atcttccca gaattaaagc caaagaccta atgaaagtaa ttatctcaaa aaggttgaaa 10020
atacactatt tgcaatacac agatctgect agaaatctca tgttcacaat acacatgatg 10080
ctcaattgaa ttccattcaa tgtfacagtt tagataaaca gttttagat aaactcaca 10140
tgtatcattt cttttattt ttgacccaaa cagcttctca tctgttattc agaataattc 10200
ctcgaatgga ggatatccat cccaattggg ggaaggggag aatttgaaga aaacctagac 10260
cacatacata tttgccattg ggaacaaaag tctaaatga tgtgttccac atcttctcta 10320
ctagctctct ccccgtecca aagaaccttg gtatatgtgc ctcatcttac agagagagga 10380
aagcaggaac tgagcatecc ttacttgcca tctcaacc aaaattgca tcattgetca 10440
gctctgcect tctcatatga cagttacaag tcaaggcttc caaagteect ctgcatggt 10500
tgggtcaat agttataca gatgacttca tctctcata tctaatgtct tatatagatt 10560
aatattaaac aatgttattt cttaaccac attttaaatt aattfaaaaa tccattaatt 10620
gtgtctataa aatgcagaca gaggctgag acacaatata agcctgatga tctgaatttg 10680
aaactcacac ccaccatg gagaatcaac ttccaaaaat ttctctatta ctccacact 10740
tacaccattg tacaacaca ataataatga acaaaatgaa atgaaataaa aaattaagtc 10800
tctgtagga atgctactgt gcagcaaaag taaaatggc agcttaagct tctttatgg 10860
ttacacttta ccatttcca ttaattataa ggacttcaat catggcagaa ctatgctgtt 10920
attgtctcag tgtaacctaa ccagggttc cagatgtct taatgtggac acctaaacta 10980
ttgatattt gggftaagat ctctccctct ttcagaaga acctcaggac agagggaatc 11040
ttgtctttta atttgagtc ttagactttt tccatttca aatatacatg aaacaagtga 11100
tgaagaaaat taatcaaaaag gtgggaattg caatgatatt aggttcaata ttaagcttca 11160
atattatcat ggaatgect gttatacact gaggtttgg caataaggga tttttagaag 11220
aaggagtttt tatttcaac aggttctta agtttagctc aaataaatct aagcaatcca 11280
ctctagaatt aaatagtttc ctaagggcac agctatgaat agagctcaat ttacataaa 11340
aattttgttc accatttatg tcaatccagt ttccattagt acaaggaaaa taaaaatat 11400
ttagatgca atatcaagt aatagttcat ctctttttt aatatatc acctaaatca 11460
ccattttctc agaaaaatct ggcctgaagt tctgtctgga acttcaacat gaaaaatag 11520
cacagcttgc tattataat cctagttgat ttttaagatt catgtctggt gtctgactca 11580
gaggggccag aggctagaca aatattttt gaacttcat tgtgaagatt tttatgatt 11640
attttaatat aaatacaaaa gatgatggat aatgtaactt tgtacagttc atagacgctg 11700
aactactttg tcttfaaat gttagttccc taccataat gataggtgat aagtgtatgt 11760
ttaatacttt cctctgagc tatattcatg tactagagaa ttattttaaa catgaaaaga 11820
ctgttttat agtctcagct cctgagaact ggtccaacct taggcaggtg aatgccagga 11880

gcaacgtttt tctctacag aggatgcttt gctccaagc aacctgggtg tgtgaaatg 11940
ttcctttttt aatcaagttt aaagggctct catcatgctg ttgctccaca tattttcagg 12000
ttagagcttg gtccttggag tattatcttt taccagaaaa ttcatagtat tctttcaata 12060
actaacaact aaacttttcg ataaaaaaga atggaattt caattttaaa gcctgagtaa 12120
aattcttggg aatcaggata tttttttta agtcttatct tftaaaaagt tattttattt 12180
tftaaaaaat tataatatac tttcataatt tctctcttc actttttttt acaaactt 12240
ctatagatca ccatgtgttt tttttttac atttatggcc tctttctgtt cattgttatt 12300
acatacaaat agtcttgcct atagaagaac accacaattt gttacctgat aacaaattat 12360
caaccttaa aacctacaaa ctattgatat tactgaaaag actatactta tagatgtaa 12420
gatatatgtg tgtgcacata tatagatata catatatgta ggatttttaa ttttagattt 12480
tagacatcaa aattatttat atgactgaga aactagacac tataaatgag cattcagat 12540
tcaacacctg gattttagat attgtcacia tgacagaaaa tttcttata gaaaatttt 12600
agttttgtga ttgctctgtg cacttagtga agtctcacag aaaaagaatc atagtatttt 12660
tagttataa taaaaagtac atataattaa aatgggtggc acaaaacaac atttgagcat 12720
tttcttatt tactatcaag tagtatcatt ttgaaataat aatttgacta gtttcaaaaa 12780
tgaaaacaaa atftaaacta aatgcctaat ctgacctgat aacattttta tgaatgaaat 12840
tattcaatag tttatcaat taggggcccc aaactttcc taaaataaaa cttttaattt 12900
ttttcattt ttatttaaat tagaaacaaa atgtttttac atgtaaatca gagtttctc 12960
acctcccc tctcctgtc cctcactaac acctacttg tcccatacca tttctgctc 13020
ccagggaggg tgaggcttc catggggaaa cttcagagtc tgtctatcct ttcgatagg 13080
gcctaggccc tccccattt gtctaggcta aggtcacaa agtttactcc tatgctagt 13140
ataagtactg atctactaca agagacacca tagatttctt aggttctc actgacacc 13200
atgttcatgg ggtctggaac aatcatatgc tagtttcta ggtatcagtc tggggaccat 13260
gagctcccc ttgttcaggt caactgttc tgtgggttc accacctgg tcttgactgc 13320
tttctcct actctcctt ttctgtaact gggttccagt acaattcctg gtttagctgt 13380
gggtgtctac ttctacttc atcagcttct gggatggagc ctctaggata gcatacaatt 13440
agtcacatc tcaatcag ggaaggcat ttaaagtagc ctctccattg ttgcttggat 13500
tgtagttgg tctcatcttt gtagatctct ggacatttc ctagtccag atatctttt 13560
aaacctaca gactacctt attatggtat ctctttctt gctctctctt attctccag 13620
acaaaattt cctgctcct tatattttc tctcccctc tctctccc ttctcattt 13680
cctagatca tcttcttc cccatgctc ccaagagaga tttgtctcag gagatcttgt 13740
tcttaacc tttcttggg gatctgtctc tcttagggtt gctctgttt cctagcttct 13800
ctggaagtgt ggattgtaag ctggtaatca tttctccat gctaaaaac catatatgag 13860
tgatgtttgt cttttgtga ctgggttacc tcaactcaaa tggtttctc catatgtctg 13920
tggattcaa tagcacaac aacatacagt atcttggggc aactaacc aaacaagtga 13980
aagaccagta tagcaagaac tttgagttta aagaaagaaa ttaaagaaga taccagaaaa 14040
tggaaagatc tccatgctc tttgatagc agaataca tagtaaaaat ggcaatttt 14100
ccaaaatca tctacagact caatgcaatc ccaftaaat accagcacac ttctcacag 14160
acctgaaaga ataacttta actttatag gagaacaaa agaccagga taggccaac 14220
aacctgtac aatgaaggca ctccagagg catccccatc cctgactca agctctatta 14280

tagagtaata atcctgaaaa cagcttgga atggcacaaa aatagacagg tagaccaatg 14340
gaattgagtt gaaaaccctg atattaacce acatattat gaacacctga ctttgacaaa 14400
gaagctaagg ttatacaatg taagaaagaa agcatcttca acaaatcgtg ctggcataac 14460
tggatgctgg catgtagaag actgcagata gatccatgtc taatgccatg cacaaaactt 14520
aagtccaat ggatcaaaaa cctcaacata aatccagcca cactgaacct catagaagag 14580
aaagtgggaa gtatccttga ataaattggt acaggagacc acatcttgaa cttaacacca 14640
gtagcacaga caatcagatc aataatcaat aatgggacc tctgaaact gagaagcttc 14700
tgtaaggcaa tggataagtc aacaggacaa aatggcagcc cacggaatgg gaaaagatat 14760
tcaccaatcc tataatctgac agagggtgct tctctatttg caaagaacac aataagctag 14820
tttttaaac accaattaat ccgattataa agttgggtag agaactaat aaagaattgt 14880
taacagagca atctaactg gcagaaagac acataagaaa gtgctcacca t 14931

[00130] Следует понимать, что описание, конкретные примеры и данные, указывающие примерные варианты реализации, даны в качестве иллюстрации и не предназначены для ограничения данного изобретения. Различные изменения и модификации в рамках данных изобретений, включая объединение вариантов реализации полностью и частично, станут очевидными для специалиста в данной области из обсуждения, раскрытия и данных, содержащихся в данном документе, и, таким образом, считаются частью данных изобретений.

Данное изобретения могут быть воплощены в других конкретных формах, не отступая от их сущности или существенных атрибутов, и, соответственно, следует делать ссылку на приложенную формулу изобретения, а не на предшествующее описание, как указывающее объем данных изобретений.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ контроля транскрипции представляющего интерес полинуклеотида в клетке, включающий

I. поддержание клетки в среде без эффективного количества лиганда как активатора, так и репрессора, причем клетка содержит:

(A) промотор, функционально связанный с представляющим интерес полинуклеотидом и контролируемый первым оператором, функционально связанным и расположенным на 5'-конце относительно промотора;

(B) полинуклеотид, кодирующий активатор;

(C) второй оператор; и

(D) полинуклеотид, кодирующий репрессор,

при этом транскрипция представляющего интерес полинуклеотида ингибируется в отсутствие лиганда как активатора, так и репрессора; и

II. управление клеткой для транскрипции представляющего интерес полинуклеотида путем поддержания клетки в среде с эффективным количеством лиганда как активатора, так и репрессора.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что второй оператор функционально связан и расположен на конце 3' относительно промотора и 5' конце относительно представляющего интерес полинуклеотида.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что активатор связывается с первым оператором в присутствии лиганда, обеспечивая транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что репрессор представляет собой белок-репрессор, при этом транскрипция представляющего интерес полинуклеотида ингибируется в отсутствие лиганда и при этом транскрипция происходит в присутствии лиганда.

5. Способ по п. 4, отличающийся тем, что белок-репрессор связывается со вторым оператором в отсутствие лиганда.

6. Способ по п. 3, отличающийся тем, что активатор представляет собой регуляторный слитый белок (RFP).

7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что лиганд выбран из группы, состоящей из тетрациклина и доксициклина.

8. Способ по п. 6, отличающийся тем, что RFP представляет собой обратный тетрациклин-контролируемый трансаактиватор.

9. Способ по п. 4, отличающийся тем, что белок-репрессор представляет собой тетрациклин-контролируемый белок-репрессор.

10. Способ контроля транскрипции представляющего интерес полинуклеотида в клетке, включающий

I. поддержание клетки в среде без эффективного количества лиганда активатора (лиганда-активатора) и с эффективным количеством лиганда-репрессора (лиганда-

репрессора), причем клетка содержит:

(А) промотор, функционально связанный с представляющим интерес полинуклеотидом и контролируемый первым оператором, функционально связанным и расположенным на 5'-конце относительно промотора;

(В) полинуклеотид, кодирующий активатор;

(С) второй оператор; и

(D) полинуклеотид, кодирующий репрессор,

при этом транскрипция представляющего интерес полинуклеотида ингибируется в отсутствие лиганда-активатора и в присутствии лиганда-репрессора; и

II. управление клеткой для транскрипции представляющего интерес полинуклеотида путем поддержания клетки в среде с эффективным количеством лиганда-активатора и без эффективного количества лиганда-репрессора.

11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что второй оператор функционально связан и расположен на 3' конце относительно промотора и на 5' конце относительно представляющего интерес полинуклеотида.

12. Способ по п. 10, отличающийся тем, что активатор связывается с первым оператором в присутствии лиганда-активатора, обеспечивая транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида.

13. Способ по п. 12, отличающийся тем, что активатор представляет собой регуляторный слитый белок (RFP).

14. Способ по п. 10, отличающийся тем, что репрессор представляет собой регуляторный слитый белок (RFP), при этом транскрипция представляющего интерес полинуклеотида ингибируется в присутствии лиганда-репрессора, и транскрипция происходит в отсутствие лиганда-репрессора.

15. Способ по п. 13, отличающийся тем, что RFP представляет собой обратный тетрациклин-контролируемый трансактиватор.

16. Способ по п. 10, отличающийся тем, что лиганд-активатор выбран из группы, состоящей из тетрациклина и доксициклина.

17. Способ по п. 10, отличающийся тем, что RFP представляет собой ArcEr.

18. Способ по п. 10, отличающийся тем, что лиганд-репрессор выбран из группы, состоящей из эстрогена, эстрадиола (E2), тамоксифена и 4-гидрокситамоксифена (ОНТ).

19. Способ контроля транскрипции представляющего интерес полинуклеотида в клетке, включающий

I. поддержание клетки в среде без эффективного количества первого лиганда первого регуляторного слитого белка (RFP) и с эффективным количеством второго лиганда второго RFP, причем клетка содержит:

(А) промотор, функционально связанный с представляющим интерес полинуклеотидом и контролируемый первым оператором, функционально связанным и расположенным на 5' конце относительно промотора;

(В) полинуклеотид, кодирующий первый RFP, при этом первый RFP содержит:

(1) домен, активирующий транскрипцию, слитый с первым ДНК-связывающим доменом; и

(2) лигандсвязывающий домен; при этом первый лиганд способен связываться с лигандсвязывающим доменом первого RFP, и при этом ДНК-связывающий домен первого RFP способен связываться с оператором, расположенным на 5' конце, в присутствии первого лиганда;

(C) второй оператор; и

(D) полинуклеотид, кодирующий второй RFP, который отличается от первого RFP, при этом второй RFP содержит:

(1) ДНК-связывающий домен; и

(2) лигандсвязывающий домен; при этом второй лиганд способен связываться с лигандсвязывающим доменом второго RFP, и при этом второй RFP способен связываться со вторым оператором в присутствии второго лиганда; при этом транскрипция представляющего интерес полинуклеотида ингибируется в отсутствие первого лиганда и в присутствии второго лиганда; и

II. управление клеткой для транскрипции представляющего интерес полинуклеотида путем поддержания клетки в среде с эффективным количеством первого лиганда и без эффективного количества второго лиганда.

20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что второй оператор функционально связан и расположен на 3' конце относительно промотора и на 5' конце относительно полинуклеотидной последовательности, кодирующей представляющий интерес белок.

21. Способ по п. 19, отличающийся тем, что второй оператор функционально связан с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей первый RFP.

22. Способ по п. 19, отличающийся тем, что первый RFP представляет собой обратный тетрациклин-контролируемый трансактиватор (rtTA).

23. Способ по п.19, отличающийся тем, что второй RFP содержит домен, связывающий репрессор Arc, слитый с доменом, связывающим лиганд рецептора эстрогена (ArcEr).

24. Способ по п. 19, отличающийся тем, что первый оператор представляет собой элемент ответа Tet (TRE).

25. Способ по п. 19, отличающийся тем, что второй оператор представляет собой оператор Arc (AO).

26. Способ по п. 19, отличающийся тем, что клетки дополнительно содержат репрессор, измененный первым лигандом.

27. Способ по п. 26, отличающийся тем, что репрессор представляет собой TetR.

28. Способ по п. 19, отличающийся тем, что (B) полинуклеотид, кодирующий первый RFP, функционально связан с промотором и вторым оператором Arc.

29. Способ по п. 28, отличающийся тем, что промотор представляет собой промотор CMVmin.

30. Способ по п. 28, отличающийся тем, что первый RFP представляет собой

слитый белок обратного тетрациклин-контролируемого трансаактиватора (rtTA), и второй RFP представляет собой слитый белок, содержащий домен, связывающий репрессор Arcs, и домен, связывающий лиганд рецептора эстрогена (ArcEr).

31. Способ по п. 30, отличающийся тем, что ArcEr контролирует транскрипцию полинуклеотида, кодирующего rtTA.

32. Способ контроля транскрипции представляющего интерес полинуклеотида в клетке, включающий

I. поддержание клетки в среде без эффективного количества первого лиганда первого регуляторного слитого белка (RFP) и с эффективным количеством второго лиганда второго RFP, причем клетка содержит:

(A) промотор, функционально связанный с представляющим интерес полинуклеотидом и контролируемый Tet-ответным элементом (TRE), функционально связанным и расположенным на 5' конце относительно промотора;

(B) полинуклеотид, кодирующий первый RFP, при этом первый RFP содержит:

(1) домен, активирующий транскрипцию, слитый с ДНК-связывающим доменом; и

(2) лигандсвязывающий домен, при этом первый лиганд способен связываться с лигандсвязывающим доменом первого RFP, и при этом ДНК-связывающий домен первого RFP способен связываться с оператором, расположенным на 5' конце, в присутствии первого лиганда;

(C) оператор Arcs, функционально связанный и расположенный на 3' конце относительно промотора и на 5' конце относительно полинуклеотида, кодирующего представляющий интерес белок; и

(D) полинуклеотид, кодирующий второй RFP, при этом второй RFP содержит:

(1) ДНК-связывающий домен Arcs-репрессора; и

(2) лигандсвязывающий домен; при этом второй лиганд способен связываться с лигандсвязывающим доменом второго RFP, и при этом второй RFP способен связываться с оператором Arcs в присутствии второго лиганда;

при этом транскрипция полинуклеотида, кодирующего представляющий интерес белок, ингибируется в отсутствие первого лиганда и в присутствии второго лиганда; и

II. управление клеткой для транскрипции представляющего интерес полинуклеотида путем поддержания ее в среде с эффективным количеством первого лиганда и без эффективного количества второго лиганда.

33. Способ по п. 32, отличающийся тем, что первый лиганд выбран из группы, состоящей из тетрациклина и доксициклина.

34. Способ по п. 32, отличающийся тем, что второй лиганд выбран из группы, состоящей из эстрогена, эстрадиола (E2), тамоксифена и 4-гидрокситамоксифена (ОНТ).

35. Способ по п. 32, отличающийся тем, что лигандсвязывающий домен второго RFP представляет собой лигандсвязывающий домен стероидного рецептора.

36. Способ по п. 32, отличающийся тем, что первый регуляторный слитый белок (RFP) представляет собой обратный тетрациклиновый трансаактиватор (rtTA).

37. Способ по п. 32, отличающийся тем, что промотор, функционально связанный с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей представляющий интерес полипептид, представляет собой промотор CMVmin.

38. Способ по п. 32, отличающийся тем, что промотор CMVmin и оператор Arc функционально связаны с полинуклеотидом, кодирующим первый RFP, и второй RFP может контролировать транскрипцию полинуклеотида, кодирующего первый RFP.

39. Способ по п. 32, отличающийся тем, что промотор E/L SV40 функционально связан с полинуклеотидом, кодирующим второй RFP.

40. Способ по п. 32, отличающийся тем, что клетка является членом популяции клеток и после по меньшей мере 14 дней пассирования клеток в отсутствие первого лиганда и в присутствии второго лиганда процент копий ДНК полинуклеотидной последовательности, кодирующей представляющий интерес полипептид, уменьшилась на менее чем около 5%.

41. Способ по п. 32, отличающийся тем, что клетка является членом популяции клеток и после пассирования клеток в отсутствие эффективного количества первого лиганда и в присутствии эффективного количества второго лиганда экспрессия представляющего интерес полипептида на по меньшей мере 50% меньше, на по меньшей мере 60% меньше, на по меньшей мере 70% меньше, на по меньшей мере 80% меньше, на по меньшей мере 90% меньше или на по меньшей мере 95% меньше, чем экспрессия полипептида в клетки в присутствии эффективного количества первого лиганда и отсутствии эффективного количества второго лиганда по меньшей мере через 14 дней.

42. Способ по п. 32, отличающийся тем, что клетка является членом популяции клеток и после пассирования клеток в отсутствие эффективного количества первого лиганда и в присутствии эффективного количества второго лиганда количество транскрипционных копий, кодирующих полипептид, на по меньшей мере 70% меньше, на по меньшей мере 75% меньше, на по меньшей мере 80% меньше, на по меньшей мере 85% меньше, на по меньшей мере 90% меньше или на по меньшей мере 95% меньше количества транскрипционных копий кодирующей полипептид в клетках при наличии эффективного количества первого лиганда и отсутствии эффективного количества второго лиганда по меньшей мере через 14 дней.

43. Способ контроля транскрипции представляющего интерес полинуклеотида в клетке, включающий

I. поддержание клетки в среде без эффективного количества лиганда регуляторного слитого белка (RFP) и белка-репрессора, при этом клетка содержит:

(A) промотор, функционально связанный с представляющим интерес полинуклеотидом и контролируемый первым оператором, функционально связанным и расположенным на 5'-конце относительно промотора;

(B) полинуклеотид, кодирующий RFP, при этом RFP содержит:

(1) домен, активирующий транскрипцию, слитый с ДНК-связывающим доменом; и

(2) лигандсвязывающий домен; при этом лиганд способен связываться с

лигандсвязывающим доменом RFP, и при этом ДНК-связывающий домен RFP способен связываться с первым оператором в присутствии лиганда;

(C) второй оператор; и

(D) полинуклеотид, кодирующий белок-репрессор, при этом белок-репрессор может связываться со вторым оператором только в отсутствие лиганда,

при этом транскрипция полинуклеотида ингибируется в отсутствие эффективного количества лиганда; и

II. управление клеткой для транскрипции представляющего интерес полинуклеотида путем поддержания клетки в среде с эффективным количеством лиганда.

44. Способ по п. 43, отличающийся тем, что второй оператор функционально связан и расположен на 3' конце относительно промотора и на 5' конце относительно представляющего интерес полинуклеотида.

45. Способ по п. 43, отличающийся тем, что белок-репрессор связывается со вторым оператором в отсутствие лиганда для ингибирования транскрипции представляющего интерес полинуклеотида.

46. Способ по п. 43, отличающийся тем, что RFP связывается с первым оператором в присутствии лиганда, обеспечивая транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида.

47. Способ по п. 43, отличающийся тем, что лиганд выбран из группы, состоящей из тетрациклина и доксициклина.

48. Способ по п. 43, отличающийся тем, что RFP представляет собой обратный тетрациклин-контролируемый трансаактиватор (rtTA).

49. Способ по п. 43, отличающийся тем, что белок-репрессор представляет собой тетрациклин-контролируемый белок-репрессор.

50. Способ по п. 43, отличающийся тем, что первый оператор представляет собой элемент ответа Tet (TRE).

51. Способ по п. 43, отличающийся тем, что второй оператор представляет собой оператор Tet.

52. Способ контроля транскрипции представляющего интерес полинуклеотида в клетке, включающий

I. поддержание клетки в среде без эффективного количества первого лиганда первого регуляторного слитого белка (RFP) и с эффективным количеством второго лиганда второго RFP, причем клетка содержит:

(A) промотор, функционально связанный с представляющим интерес полинуклеотидом и контролируемый Tet-ответным элементом (TRE), функционально связанным и расположенным на 5'-конце относительно промотора;

(B) полинуклеотид, кодирующий первый RFP, при этом первый RFP содержит:

(1) домен, активирующий транскрипцию, слитый с ДНК-связывающим доменом; и

(2) лигандсвязывающий домен, при этом первый лиганд способен связываться с лигандсвязывающим доменом первого RFP, и при этом ДНК-связывающий домен первого

RFP способен связываться с TRE, расположенным 5', в присутствии первого лиганда; и

(C) оператор Tet, функционально связанный и расположенный на 3'-конце относительно промотора и на 5'-конце относительно представляющего интерес полинуклеотида; и

(D) полинуклеотид, кодирующий второй RFP, при этом второй RFP содержит:

(1) ДНК-связывающий домен Arc-репрессора; и

(2) лигандсвязывающий домен; при этом второй лиганд способен связываться с лигандсвязывающим доменом второго RFP, и при этом второй RFP способен связываться с Arc оператором в присутствии второго лиганда; при этом транскрипция полинуклеотида ингибируется в отсутствие первого лиганда и присутствии второго лиганда;

II. управление клеткой для транскрипции представляющего интерес полинуклеотида путем поддержания клетки в среде с эффективным количеством первого лиганда и без эффективного количества второго лиганда.

53. Способ по п. 52, отличающийся тем, что первый лиганд выбран из группы, состоящей из тетрациклина и доксициклина.

54. Способ по п. 52, отличающийся тем, что первый регуляторный слитый белок (RFP) представляет собой обратный тетрациклин-контролируемый трансаактиватор (rtTA).

55. Способ по п. 52, отличающийся тем, что промотор, функционально связанный с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей представляющий интерес полипептид, представляет собой промотор CMVmin.

56. Способ по п. 52, отличающийся тем, что промотор CMVmin и оператор Arc функционально связаны с полинуклеотидом, кодирующим первый RFP, и второй RFP может контролировать транскрипцию полинуклеотида, кодирующего первый RFP.

57. Способ по п. 52, отличающийся тем, что промотор E/L SV40 функционально связан с полинуклеотидом, кодирующим второй RFP.

58. Способ по п. 52, отличающийся тем, что клетки дополнительно содержат репрессор, измененный первым лигандом.

59. Способ по п. 52, отличающийся тем, что репрессор представляет собой TetR.

60. Способ по п. 52, отличающийся тем, что после пассирования клеток в отсутствие эффективного количества первого лиганда и в присутствии эффективного количества второго лиганда процент клеток, содержащих копии полинуклеотидной последовательности ДНК, кодирующей содержание представляющего интерес полипептида снизилось на менее чем около 5%.

61. Способ по п. 52, отличающийся тем, что клетка является членом популяции клеток и после пассирования клеток в отсутствие эффективного количества первого лиганда и в присутствии эффективного количества второго лиганда экспрессия представляющего интерес полипептида на по меньшей мере 50% меньше, на по меньшей мере 60% меньше, на по меньшей мере 70% меньше, на по меньшей мере 80% меньше, на по меньшей мере 90% меньше или на по меньшей мере 95% меньше, чем экспрессия полипептида в клетки в присутствии эффективного количества первого лиганда и

отсутствии эффективного количества второго лиганда по меньшей мере через 14 дней.

62. Способ по п. 52, отличающийся тем, что клетка является членом популяции клеток и после пассирования клеток в отсутствие эффективного количества первого лиганда и в присутствии эффективного количества второго лиганда количество транскрипционных копий полипептида, на по меньшей мере 70% меньше, на по меньшей мере 75% меньше, на по меньшей мере 80% меньше, на по меньшей мере 85% меньше, на по меньшей мере 90% меньше или на по меньшей мере 95% меньше количества транскрипционных копий кодирующей полипептид в клетках при наличии эффективного количества первого лиганда и отсутствии эффективного количества второго лиганда по меньшей мере через 14 дней.

63. Способ контроля транскрипции представляющего интерес полинуклеотида в клетке, включающий поддержание клетки в среде без эффективного количества первого лиганда первого регуляторного слитого белка (RFP) и с эффективным количеством второго лиганда второго RFP, причем клетка содержит

(A) промотор;

(B) оператор Arc; и

(C) полинуклеотид, кодирующий слитый белок обратного тетрациклин-контролируемого трансаактиватора (rtTA), при этом (A), (B) и (C) функционально связаны, и при этом транскрипция полинуклеотида rtTA контролируется слитым белком, содержащим домен, связывающий репрессор Arc и лигандсвязывающий домен рецептора эстрогена (ArcEr);

при этом rtTA может контролировать транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида.

64. Способ по п. 63, отличающийся тем, что промотор представляет собой промотор CMVmin.

65. Способ по п. 63, отличающийся тем, что первый лиганд выбран из группы, состоящей из тетрациклина и доксициклина.

66. Способ по п. 63, отличающийся тем, что второй лиганд выбран из группы, состоящей из эстрогена, эстрадиола (E2), тамоксифена и 4-гидрокситамоксифена (ОНТ).

67. Способ контроля транскрипции представляющего интерес полинуклеотида в клетке, включающий

I. поддержание клетки в среде с эффективным количеством второго лиганда второго RFP, при этом клетка содержит:

(A) промотор, функционально связанный с представляющим интерес полинуклеотидом и контролируемый первым оператором, функционально связанным и расположенным на 5' конце относительно промотора;

(B) полинуклеотид, кодирующий первый RFP, при этом первый RFP содержит:

(1) домен, активирующий транскрипцию, слитый с первым ДНК-связывающим доменом; и

(2) лигандсвязывающий домен; при этом первый лиганд способен связываться с

лигандсвязывающим доменом первого RFP, и при этом ДНК-связывающий домен первого RFP способен связываться с оператором, расположенным на 5' конце, в присутствии первого лиганда;

(С) второй оператор; и

(D) полинуклеотид, кодирующий второй RFP, который отличается от первого RFP, при этом второй RFP содержит:

(1) ДНК-связывающий домен; и

(2) лигандсвязывающий домен; при этом второй лиганд способен связываться с лигандсвязывающим доменом второго RFP, и при этом второй RFP способен связываться со вторым оператором в присутствии второго лиганда; при этом транскрипция представляющего интерес полинуклеотида ингибируется в отсутствие первого лиганда и в присутствии второго лиганда; и

II. управление клеткой для транскрипции представляющего интерес полинуклеотида путем поддержания клетки в среде с эффективным количеством первого лиганда и без эффективного количества второго лиганда.

68. Способ по п. 67, отличающийся тем, что второй оператор функционально связан и расположен на 3' конце относительно промотора и на 5' конце относительно полинуклеотидной последовательности, кодирующей представляющий интерес белок.

69. Способ по п. 67, отличающийся тем, что второй оператор функционально связан с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей первый RFP.

70. Способ по п. 67, отличающийся тем, что первый RFP представляет собой обратный тетрациклин-контролируемый трансактиватор (rtTA).

71. Способ по п. 67, отличающийся тем, что второй RFP содержит домен, связывающий репрессор Arc, слитый с лигандсвязывающим доменом рецептора эстрогена (ArcEr).

72. Способ по п. 67, отличающийся тем, что первый оператор представляет собой элемент ответа Tet (TRE).

73. Способ по п. 67, отличающийся тем, что второй оператор представляет собой оператор Arc (AO).

74. Способ по п. 67, отличающийся тем, что клетки дополнительно содержат репрессор, измененный первым лигандом.

75. Способ по п. 74, отличающийся тем, что репрессор представляет собой TetR.

76. Способ по п. 67, отличающийся тем, что (B) полинуклеотид, кодирующий первый RFP, функционально связан с промотором и вторым оператором Arc.

77. Способ по п. 76, отличающийся тем, что промотор представляет собой промотор CMVmin.

78. Способ по п. 77, отличающийся тем, что первый RFP представляет собой слитый белок обратного тетрациклин-контролируемого трансактиватора (rtTA), и второй RFP представляет собой слитый белок, содержащий домен, связывающий репрессор Arc, и лигандсвязывающий домен рецептора эстрогена (ArcEr).

79. Способ по п. 78, отличающийся тем, что ArcEg контролирует транскрипцию полинуклеотида, кодирующего rtTA.

80. Способ контроля транскрипции представляющего интерес полинуклеотида в клетке, включающий

I. поддержание клетки в среде с эффективным количеством второго лиганда второго RFP, при этом клетка содержит:

(A) промотор, функционально связанный с представляющим интерес полинуклеотидом и контролируемый Tet-ответным элементом (TRE), функционально связанным и расположенным на 5' конце относительно промотора;

(B) полинуклеотид, кодирующий первый RFP, при этом первый RFP содержит:

(1) домен, активирующий транскрипцию, слитый с ДНК-связывающим доменом; и

(2) лигандсвязывающий домен, при этом первый лиганд способен связываться с лигандсвязывающим доменом первого RFP, и при этом ДНК-связывающий домен первого RFP способен связываться с оператором, расположенным на 5' конце, в присутствии первого лиганда;

(C) оператор Arc, функционально связанный и расположенный на 3' конце относительно промотора и на 5' конце относительно полинуклеотида, кодирующего представляющий интерес белок; и

(D) полинуклеотид, кодирующий второй RFP, при этом второй RFP содержит:

(1) ДНК-связывающий домен Arc-репрессора; и

(2) лигандсвязывающий домен; при этом второй лиганд способен связываться с лигандсвязывающим доменом второго RFP, и при этом второй RFP способен связываться с Arc оператором в присутствии второго лиганда; при этом транскрипция полинуклеотида, кодирующего представляющий интерес белок ингибируется в отсутствие первого лиганда и в присутствии второго лиганда; и

II. управление клеткой для транскрипции представляющего интерес полинуклеотида путем поддержания ее в среде с эффективным количеством первого лиганда и без эффективного количества второго лиганда.

81. Способ по п. 80, отличающийся тем, что первый лиганд выбран из группы, состоящей из тетрациклина и доксициклина.

82. Способ по п. 80, отличающийся тем, что второй лиганд выбран из группы, состоящей из эстрогена, эстрадиола (E2), тамоксифена и 4-гидрокситамоксифена (ОНТ).

83. Способ по п. 80, отличающийся тем, что лигандсвязывающий домен второго RFP представляет собой лигандсвязывающий домен стероидного рецептора.

84. Способ по п. 80, отличающийся тем, что первый регуляторный слитый белок (RFP) представляет собой обратный тетрациклин-контролируемый трансаактиватор (rtTA).

85. Способ по п. 80, отличающийся тем, что промотор, функционально связанный с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей представляющий интерес полипептид, представляет собой промотор CMVmin.

86. Способ по п. 80, отличающийся тем, что промотор CMVmin и оператор Arc

функционально связаны с полинуклеотидом, кодирующим первый RFP, и второй RFP может контролировать транскрипцию полинуклеотида, кодирующего первый RFP.

87. Способ по п. 80, отличающийся тем, что промотор E/L SV40 функционально связан с полинуклеотидом, кодирующим второй RFP.

88. Способ по п. 80, отличающийся тем, что клетка является членом популяции клеток и после пассирования клеток в отсутствие эффективного количества первого лиганда и в присутствии эффективного количества второго лиганда процентное содержание количество копий полинуклеотидной последовательности ДНК, кодирующей представляющий интерес полипептид, уменьшилось на менее чем около 5%.

89. Способ по п. 88, отличающийся тем, что клетка является членом популяции клеток и после пассирования клеток в отсутствие эффективного количества первого лиганда и в присутствии эффективного количества второго лиганда экспрессия представляющего интерес полипептида на по меньшей мере 50% меньше, на по меньшей мере 60% меньше, на по меньшей мере 70% меньше, на по меньшей мере 80% меньше, на по меньшей мере 90% меньше или на по меньшей мере 95% меньше, чем экспрессия полипептида в клетки в присутствии эффективного количества первого лиганда и отсутствии эффективного количества второго лиганда по меньшей мере через 14 дней.

90. Способ по п. 88, отличающийся тем, что клетка является членом популяции клеток и после пассирования клеток в отсутствие эффективного количества первого лиганда и в присутствии эффективного количества второго лиганда количество транскрипционных копий, кодирующих полипептид, на по меньшей мере 70% меньше, на по меньшей мере 75% меньше, на по меньшей мере 80% меньше, на по меньшей мере 85% меньше, на по меньшей мере 90% меньше или на по меньшей мере 95% меньше количества транскрипционных копий кодирующий полипептид в клетках при наличии эффективного количества первого лиганда и отсутствии эффективного количества второго лиганда по меньшей мере через 14 дней.

91. Способ по п. 80, отличающийся тем, что среда на стадии поддержания I. дополнительно содержит первый лиганд.

92. Способ контроля транскрипции представляющего интерес полинуклеотида в клетке, включающий

I. поддержание клетки в среде с эффективным количеством второго лиганда второго RFP, при этом клетка содержит:

(A) промотор, функционально связанный с представляющим интерес полинуклеотидом и контролируемый Tet-ответным элементом (TRE), функционально связанным и расположенным на 5' конце относительно промотора;

(B) полинуклеотид, кодирующий первый RFP, при этом первый RFP содержит:

(1) домен, активирующий транскрипцию, слитый с ДНК-связывающим доменом; и

(2) лигандсвязывающий домен, при этом первый лиганд способен связываться с лигандсвязывающим доменом первого RFP, и при этом ДНК-связывающий домен первого RFP способен связываться с TRE, расположенным на 5' конце, в присутствии первого

лиганда; и

(C) оператор Tet, функционально связанный и расположенный на 3'-конце относительно промотора и на 5'-конце относительно представляющего интерес полинуклеотида; и

(D) полинуклеотид, кодирующий второй RFP, при этом второй RFP содержит:

(1) ДНК-связывающий домен Arc-репрессора; и

(2) лигандсвязывающий домен; при этом второй лиганд способен связываться с лигандсвязывающим доменом второго RFP, и при этом второй RFP способен связываться с Arc оператором в присутствии второго лиганда; при этом транскрипция полинуклеотида ингибируется в отсутствие первого лиганда и присутствии второго лиганда;

II. управление клеткой для транскрипции представляющего интерес полинуклеотида путем поддержания клетки в среде с эффективным количеством первого лиганда и без эффективного количества второго лиганда.

93. Способ по п. 92, отличающийся тем, что первый лиганд выбран из группы, состоящей из тетрациклина и доксициклина.

94. Способ по п. 92, отличающийся тем, что первый регуляторный слитый белок (RFP) представляет собой обратный тетрациклин-контролируемый трансаактиватор (rtTA).

95. Способ по п. 92, отличающийся тем, что промотор, функционально связанный с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей представляющий интерес полипептид, представляет собой промотор CMVmin.

96. Способ по п. 92, отличающийся тем, что промотор CMVmin и оператор Arc функционально связаны с полинуклеотидом, кодирующим первый RFP, и второй RFP может контролировать транскрипцию полинуклеотида, кодирующего первый RFP.

97. Способ по п. 92, отличающийся тем, что промотор E/L SV40 функционально связан с полинуклеотидом, кодирующим второй RFP.

98. Способ по п. 92, отличающийся тем, что клетки дополнительно содержат репрессор, измененный первым лигандом.

99. Способ по п. 92, отличающийся тем, что репрессор представляет собой TetR.

100. Способ по п. 92, отличающийся тем, что после пассирования клеток в отсутствие эффективного количества первого лиганда и в присутствии эффективного количества второго лиганда процент клеток, содержащих копии полинуклеотидной последовательности ДНК, кодирующей содержание представляющего интерес полипептида снизилось на менее чем около 5%.

101. Способ по п. 92, отличающийся тем, что клетка является членом популяции клеток и после пассирования клеток в отсутствие эффективного количества первого лиганда и в присутствии эффективного количества второго лиганда экспрессия представляющего интерес полипептида на по меньшей мере 50% меньше, на по меньшей мере 60% меньше, на по меньшей мере 70% меньше, на по меньшей мере 80% меньше, на по меньшей мере 90% меньше или на по меньшей мере 95% меньше, чем экспрессия полипептида в клетки в присутствии эффективного количества первого лиганда и

отсутствии эффективного количества второго лиганда по меньшей мере через 14 дней.

102. Способ по п. 92, отличающийся тем, что клетка является членом популяции клеток и после пассирования клеток в отсутствие эффективного количества первого лиганда и в присутствии эффективного количества второго лиганда количество транскрипционных копий, кодирующих полипептид, на по меньшей мере 70% меньше, на по меньшей мере 75% меньше, на по меньшей мере 80% меньше, на по меньшей мере 85% меньше, на по меньшей мере 90% меньше или на по меньшей мере 95% меньше количества транскрипционных копий кодирующей полипептид в клетках при наличии эффективного количества первого лиганда и отсутствии эффективного количества второго лиганда по меньшей мере через 14 дней.

103. Способ по п. 92, отличающийся тем, что среда на стадии поддержания I. дополнительно содержит первый лиганд.

104. Способ контроля транскрипции представляющего интерес полинуклеотида в клетке, включающий поддержание клетки в среде с эффективным количеством второго лиганда второго RFP, при этом клетка содержит

(A) промотор;

(B) оператор Arc; и

(C) полинуклеотид, кодирующий слитый белок обратного тетрациклин-контролируемого трансаактиватора (rtTA), при этом (A), (B) и (C) функционально связаны, и при этом транскрипция полинуклеотида rtTA контролируется слитым белком, содержащим домен, связывающий репрессор Arc и лигандсвязывающий домен рецептора эстрогена (ArcEr);

при этом rtTA может контролировать транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида при связывании с эффективным количеством первого лиганда.

105. Способ по п. 104, отличающийся тем, что промотор представляет собой промотор CMVmin.

106. Способ по п. 104, отличающийся тем, что первый лиганд выбран из группы, состоящей из тетрациклина и доксициклина.

107. Способ по п. 104, отличающийся тем, что второй лиганд выбран из группы, состоящей из эстрогена, эстрадиола (E2), тамоксифена и 4-гидрокситамоксифена (ОНТ).

108. Клетка, способная контролировать транскрипцию по меньшей мере одного представляющего интерес полинуклеотида, причем клетка содержит:

(A) промотор, функционально связанный с представляющим интерес полинуклеотидом и контролируемый первым оператором, функционально связанным и расположенным на 5'-конце относительно промотора;

(B) полинуклеотид, кодирующий активатор;

(C) второй оператор; и

(D) полинуклеотид, кодирующий репрессор,

при этом транскрипция представляющего интерес полинуклеотида ингибируется в отсутствие лиганда как активатора, так и репрессора и присутствует в присутствии

лиганда как активатора, так и репрессора.

109. Клетка по п. 108, отличающаяся тем, что второй оператор функционально связан и расположен на 3' конце относительно промотора и на 5' конце относительно представляющего интерес полинуклеотида.

110. Клетка по п. 108, отличающаяся тем, что активатор связывается с первым оператором в присутствии лиганда, обеспечивая транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида.

111. Клетка по п. 108, отличающаяся тем, что клетку получают любым из вышеуказанных способов.

112. Клетка, способная контролировать транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида, при этом клетка содержит

(А) промотор, функционально связанный с представляющим интерес полинуклеотидом и контролируемый первым оператором, функционально связанным и расположенным на 5'-конце относительно промотора;

(В) полинуклеотид, кодирующий активатор;

(С) второй оператор; и

(D) полинуклеотид, кодирующий репрессор;

при этом транскрипция представляющего интерес полинуклеотида ингибируется в отсутствие эффективного количества лиганда-активатора и присутствия эффективного количества лиганда-репрессора; и присутствует при наличии эффективного количества лиганда-активатора и отсутствии эффективного количества лиганда-репрессора.

113. Клетка по п. 112, отличающаяся тем, что второй оператор функционально связан и расположен на 3' конце относительно промотора и на 5' конце относительно представляющего интерес полинуклеотида.

114. Клетка по п. 112, отличающаяся тем, что активатор связывается с первым оператором в присутствии лиганда-активатора, обеспечивая транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида.

115. Клетка по п. 112, отличающаяся тем, что клетку получают любым из вышеуказанных способов.

116. Клетка, способная контролировать транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида, при этом клетка содержит:

(А) промотор, функционально связанный с представляющим интерес полинуклеотидом и контролируемый первым оператором, функционально связанным и расположенным на 5'-конце относительно промотора;

(В) полинуклеотид, кодирующий первый регуляторный слитый белок (RFP), при этом первый RFP содержит:

(1) домен, активирующий транскрипцию, слитый с первым ДНК-связывающим доменом; и

(2) лигандсвязывающий домен; при этом первый лиганд способен связываться с лигандсвязывающим доменом первого RFP, и при этом ДНК-связывающий домен первого

RFP способен связываться с оператором, расположенным на 5' конце, в присутствии первого лиганда;

(C) второй оператор; и

(D) полинуклеотид, кодирующий второй RFP, который отличается от первого RFP, при этом второй RFP содержит:

(1) ДНК-связывающий домен; и

(2) лигандсвязывающий домен; при этом второй лиганд способен связываться с лигандсвязывающим доменом второго RFP, и при этом второй RFP способен связываться со вторым оператором в присутствии второго лиганда; при этом транскрипция полинуклеотида ингибируется в отсутствие эффективного количества первого лиганда и в присутствии эффективного количества второго лиганда, и присутствует в присутствии эффективного количества первого лиганда и в отсутствие эффективного количества второго лиганда.

117. Клетка по п. 116, отличающаяся тем, что второй оператор функционально связан и расположен на 3' конце относительно промотора и на 5' конце относительно полинуклеотидной последовательности, кодирующей представляющий интерес белок.

118. Клетка по п. 116, отличающаяся тем, что второй оператор функционально связан с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей первый RFP, и второй RFP может контролировать транскрипцию полинуклеотида, кодирующего первый RFP.

119. Клетка по п. 116, отличающаяся тем, что клетку получают любым из вышеуказанных способов.

120. Клетка, способная контролировать транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида, при этом клетка содержит

(A) промотор, функционально связанный с представляющим интерес полинуклеотидом и контролируемый первым оператором, функционально связанным и расположенным на 5'-конце относительно промотора;

(B) полинуклеотид, кодирующий регуляторный слитый белок (RFP), при этом RFP содержит:

(1) домен, активирующий транскрипцию, слитый с ДНК-связывающим доменом; и

(2) лигандсвязывающий домен; при этом лиганд способен связываться с лигандсвязывающим доменом RFP, и при этом ДНК-связывающий домен RFP способен связываться с первым оператором в присутствии лиганда; и

(C) второй оператор; и

(D) полинуклеотид, кодирующий белок-репрессор, при этом белок-репрессор может связываться со вторым оператором только в отсутствие лиганда,

при этом транскрипция представляющего интерес полинуклеотида ингибируется в отсутствие эффективного количества лиганда как активатора, так и репрессора и присутствует в присутствии эффективного количества лиганда как активатора, так и репрессора.

121. Клетка по п. 120, отличающаяся тем, что второй оператор функционально

связан и расположен на 3' конце относительно промотора и на 5' конце относительно представляющего интерес полинуклеотида.

122. Клетка по п. 120, отличающаяся тем, что клетку получают любым из вышеуказанных способов.

123. Клетка, способная контролировать транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида, при этом клетка содержит:

(А) промотор, функционально связанный с представляющим интерес полинуклеотидом и контролируемый Tet-ответным элементом (TRE), функционально связанным и расположенным на 5'-конце относительно промотора;

(В) полинуклеотид, кодирующий первый регуляторный слитый белок (RFP), при этом первый RFP содержит:

(1) домен, активирующий транскрипцию, слитый с ДНК-связывающим доменом; и

(2) лигандсвязывающий домен; при этом первый лиганд способен связываться с лигандсвязывающим доменом первого RFP, и при этом ДНК-связывающий домен первого RFP способен связываться с оператором, расположенным на 5' конце, в присутствии первого лиганда;

(С) оператор Arg, функционально связанный и расположенный на 3' конце относительно промотора и на 5' конце относительно полинуклеотида, кодирующего представляющий интерес белок; и

(D) полинуклеотид, кодирующий второй RFP, при этом второй RFP содержит:

(1) ДНК-связывающий домен Arg-репрессора; и

(2) лигандсвязывающий домен; при этом второй лиганд способен связываться с лигандсвязывающим доменом второго RFP, и при этом второй RFP способен связываться с оператором Arg в присутствии второго лиганда;

при этом транскрипция полинуклеотида ингибируется в отсутствие эффективного количества первого лиганда и в присутствии эффективного количества второго лиганда и присутствует в присутствии эффективного количества первого лиганда и в отсутствие эффективного количества второго лиганда.

124. Клетка по п. 123, отличающаяся тем, что лигандсвязывающий домен второго RFP представляет собой лигандсвязывающий домен стероидного рецептора.

125. Клетка по п. 124, отличающаяся тем, что первый регуляторный слитый белок (RFP) представляет собой обратный тетрациклиновый трансактиватор (rtTA).

126. Клетка по п. 123, отличающаяся тем, что клетку получают любым из вышеуказанных способов.

127. Клетка по п. 123, отличающаяся тем, что представляет собой член популяции клеток и пассирует клетки в отсутствие эффективного количества первого лиганда, и в присутствии эффективного количества второго лиганда процент клеток, содержащих копии полинуклеотидной последовательности ДНК, кодирующей представляющий интерес полипептид, снизился на менее чем около 5%.

128. Клетка по п. 123, отличающаяся тем, что представляет собой член популяции

клеток и после пассирования клеток в отсутствие эффективного количества первого лиганда и в присутствии эффективного количества второго лиганда экспрессия представляющего интерес полипептида на по меньшей мере 50% меньше, на по меньшей мере 60% меньше, на по меньшей мере 70% меньше, на по меньшей мере 80% меньше, на по меньшей мере 90% меньше или на по меньшей мере 95% меньше, чем экспрессия полипептида в клетки в присутствии эффективного количества первого лиганда и отсутствии эффективного количества второго лиганда по меньшей мере через 14 дней.

129. Клетка по п. 123, отличающаяся тем, что представляет собой член популяции клеток и после пассирования клеток в отсутствие эффективного количества первого лиганда и в присутствии эффективного количества второго лиганда количество транскрипционных копий, кодирующих полипептид, на по меньшей мере 70% меньше, на по меньшей мере 75% меньше, на по меньшей мере 80% меньше, на по меньшей мере 85% меньше, на по меньшей мере 90% меньше или на по меньшей мере 95% меньше количества транскрипционных копий кодирующий полипептид в клетках при наличии эффективного количества первого лиганда и отсутствии эффективного количества второго лиганда по меньшей мере через 14 дней.

130. Клетка, способная контролировать транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида, содержащая:

(A) промотор, функционально связанный с представляющим интерес полинуклеотидом и контролируемый Tet-ответным элементом (TRE), функционально связанным и расположенным на 5'-конце относительно промотора;

(B) полинуклеотид, кодирующий первый регуляторный слитый белок (первый RFP), при этом первый RFP содержит:

(1) домен, активирующий транскрипцию, слитый с ДНК-связывающим доменом; и

(2) лигандсвязывающий домен; при этом первый лиганд способен связываться с лигандсвязывающим доменом первого RFP, и при этом ДНК-связывающий домен первого RFP способен связываться с TRE, расположенным на 5' конце, в присутствии первого лиганда;

(C) оператор Tet, функционально связанный и расположенный на 3'-конце относительно промотора и на 5'-конце относительно представляющего интерес полинуклеотида; и

(D) полинуклеотид, кодирующий второй RFP, при этом второй RFP содержит:

(1) ДНК-связывающий домен Arg-репрессора; и

(2) лигандсвязывающий домен; при этом второй лиганд способен связываться с лигандсвязывающим доменом второго RFP, и при этом второй RFP способен связываться с Arg оператором в присутствии второго лиганда; при этом транскрипция полинуклеотида ингибируется в отсутствие эффективного количества первого лиганда и в присутствии эффективного количества второго лиганда, и присутствует в присутствии эффективного количества первого лиганда и в отсутствие эффективного количества второго лиганда.

131. Клетка по п. 130, отличающаяся тем, что представляет собой член популяции

клеток и после пассирования клетки в отсутствие эффективного количества первого лиганда и в присутствии эффективного количества второго лиганда обеспечивает клеточную популяцию, в которой процент клеток, содержащих копии полинуклеотидной последовательности ДНК, кодирующей представляющий интерес полипептид, снизился на менее чем около 5%.

132. Клетка по п. 130, отличающаяся тем, что представляет собой член популяции клеток и после пассирования клетки в отсутствие эффективного количества первого лиганда и в присутствии эффективного количества второго лиганда экспрессия представляющего интерес полипептида на по меньшей мере 50% меньше, на по меньшей мере 60% меньше, на по меньшей мере 70% меньше, на по меньшей мере 80% меньше, на по меньшей мере 90% меньше или на по меньшей мере 95% меньше, чем экспрессия полипептида в клетки в присутствии эффективного количества первого лиганда и отсутствии эффективного количества второго лиганда по меньшей мере через 14 дней.

133. Клетка по п. 130, отличающаяся тем, что клетку получают любым из вышеуказанных способов.

134. Клетка, способная контролировать транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида, если он присутствует, содержащая:

(А) полинуклеотид, кодирующий первый регуляторный слитый белок (RFP), при этом первый RFP содержит:

(1) домен, активирующий транскрипцию, слитый с первым ДНК-связывающим доменом; и

(2) лигандсвязывающий домен; при этом первый лиганд способен связываться с лигандсвязывающим доменом первого RFP, и при этом ДНК-связывающий домен первого RFP способен связываться с оператором, расположенным на 5' конце, в присутствии первого лиганда;

(В) второй оператор;

(С) полинуклеотид, кодирующий второй RFP, который отличается от первого RFP, при этом второй RFP содержит:

(1) второй ДНК-связывающий домен;

(2) лигандсвязывающий домен; при этом второй лиганд способен связываться с лигандсвязывающим доменом второго RFP, и при этом второй RFP способен связываться со вторым оператором в присутствии второго лиганда; при этом транскрипция полинуклеотида ингибируется в отсутствие первого лиганда и в присутствии второго лиганда и присутствует в присутствии первого лиганда и в отсутствие второго лиганда; и

(D) один или более сайтов вставок представляющего интерес полинуклеотида, который функционально связан с промотором и по меньшей мере с одним оператором.

135. Клетка по п. 134, отличающаяся тем, что полинуклеотидная последовательность, кодирующая первый регуляторный слитый белок, вставлена в первый сайт-специфический сайт интеграции, и полинуклеотидная последовательность, кодирующая второй регуляторный слитый белок, вставлена во второй сайт-

специфический сайт интеграции.

136. Клетка по п. 134, отличающаяся тем, что клетку получают любым из вышеуказанных способов.

137. Клетка, способная контролировать транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида, содержащая

(A) промотор;

(B) оператор Arc; и

(C) полинуклеотид, кодирующий слитый белок обратного тетрациклин-контролируемого трансактиватора (rtTA), при этом (A), (B) и (C) функционально связаны, при этом транскрипция полинуклеотида rtTA контролируется слитым белком, содержащим домен, связывающий репрессор Arc и лигандсвязывающий домен рецептора эстрогена (ArcEr), и при этом rtTA может контролировать транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида.

138. Способ контролируемой транскрипции по меньшей мере одного представляющего интерес полинуклеотида, содержащего клетку по любому из предыдущих пунктов.

139. Культура клеток, содержащая клетки, способные контролировать транскрипцию по меньшей мере одного представляющего интерес полинуклеотида, причем культура клеток содержит клетку по любому из предыдущих пунктов.

140. Биореактор, содержащий (i) клетку по любому из предшествующих пунктов и (ii) среду.

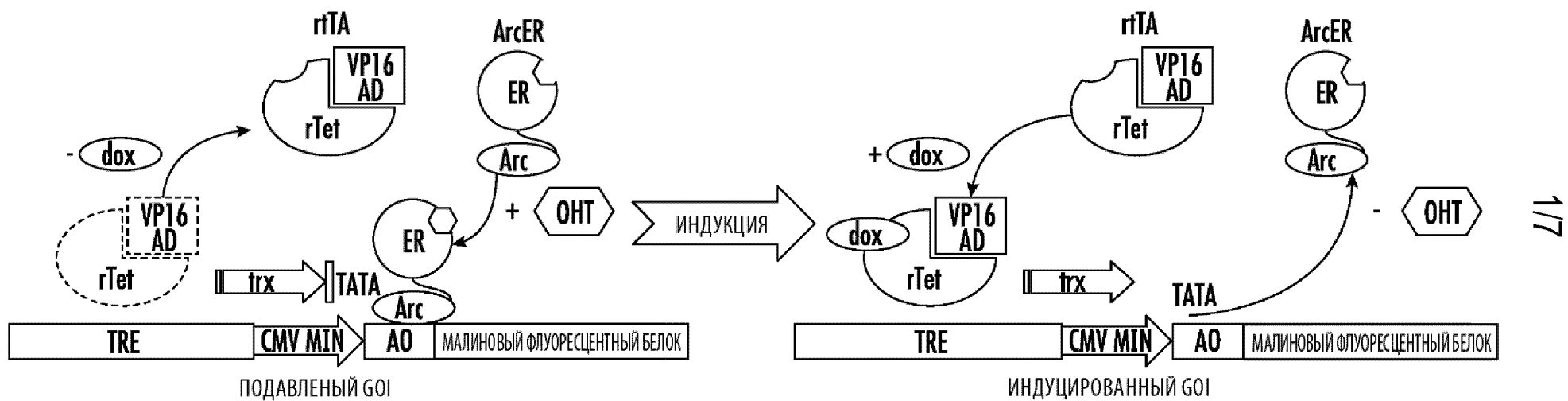
141. Клетка по любому из предшествующих способов.

142. Способ, применяющий любую из предшествующих клеток.

143. Способ по пп. 1, 10, 19, 32, 43, 52, 63, 67, 80, 92, 104, 108, 112, 116, 120, 123, 130, 134, 137 или 139, отличающийся тем, что представляющий интерес полинуклеотид кодирует Rep 78.

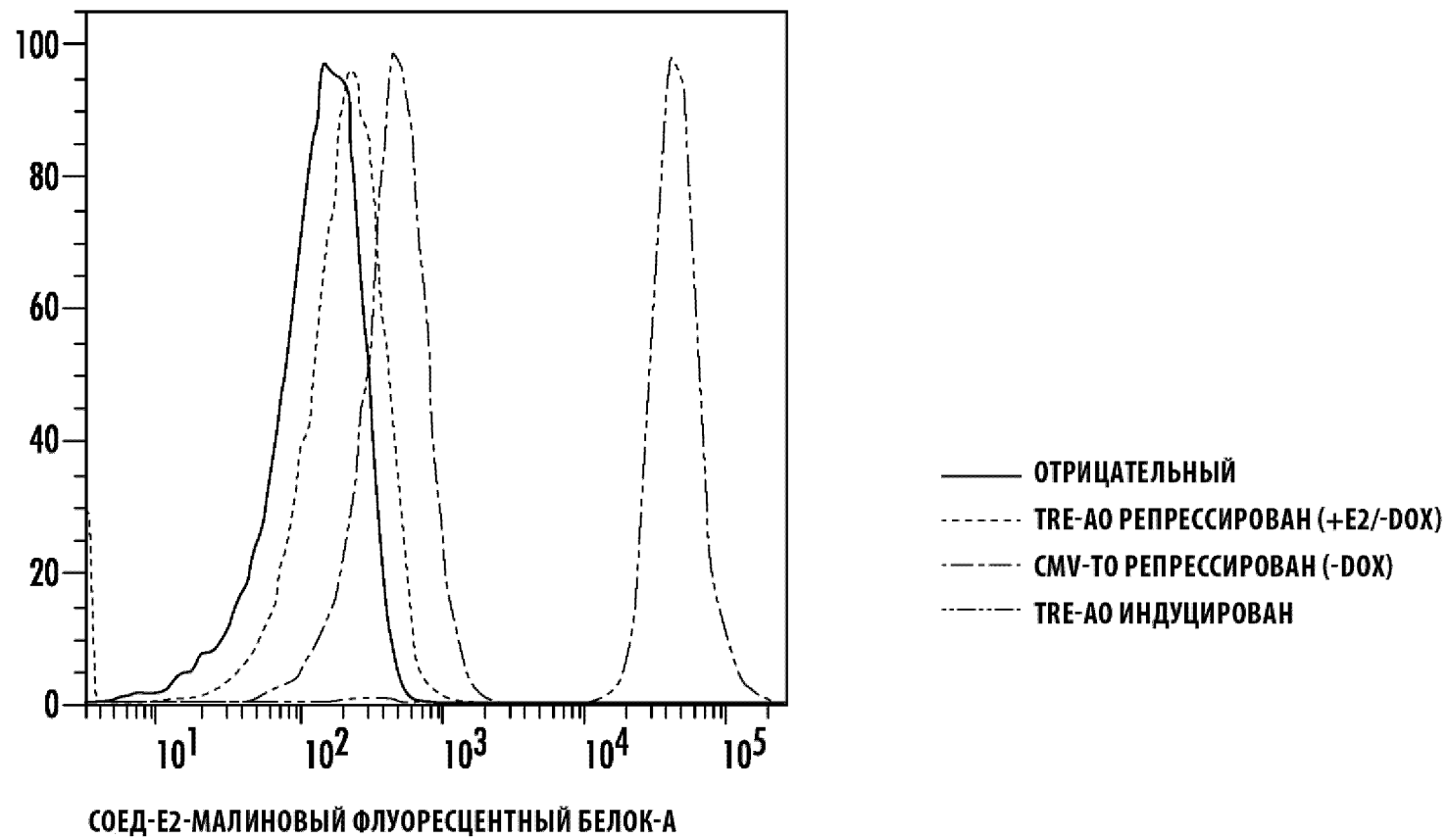
144. Способ по пп. 1, 10, 19, 32, 43, 52, 63, 67, 80, 92, 104, 108, 112, 116, 120, 123, 130, 134, 137 или 139, отличающийся тем, что представляющий интерес полинуклеотид кодирует Rep 52.

По доверенности

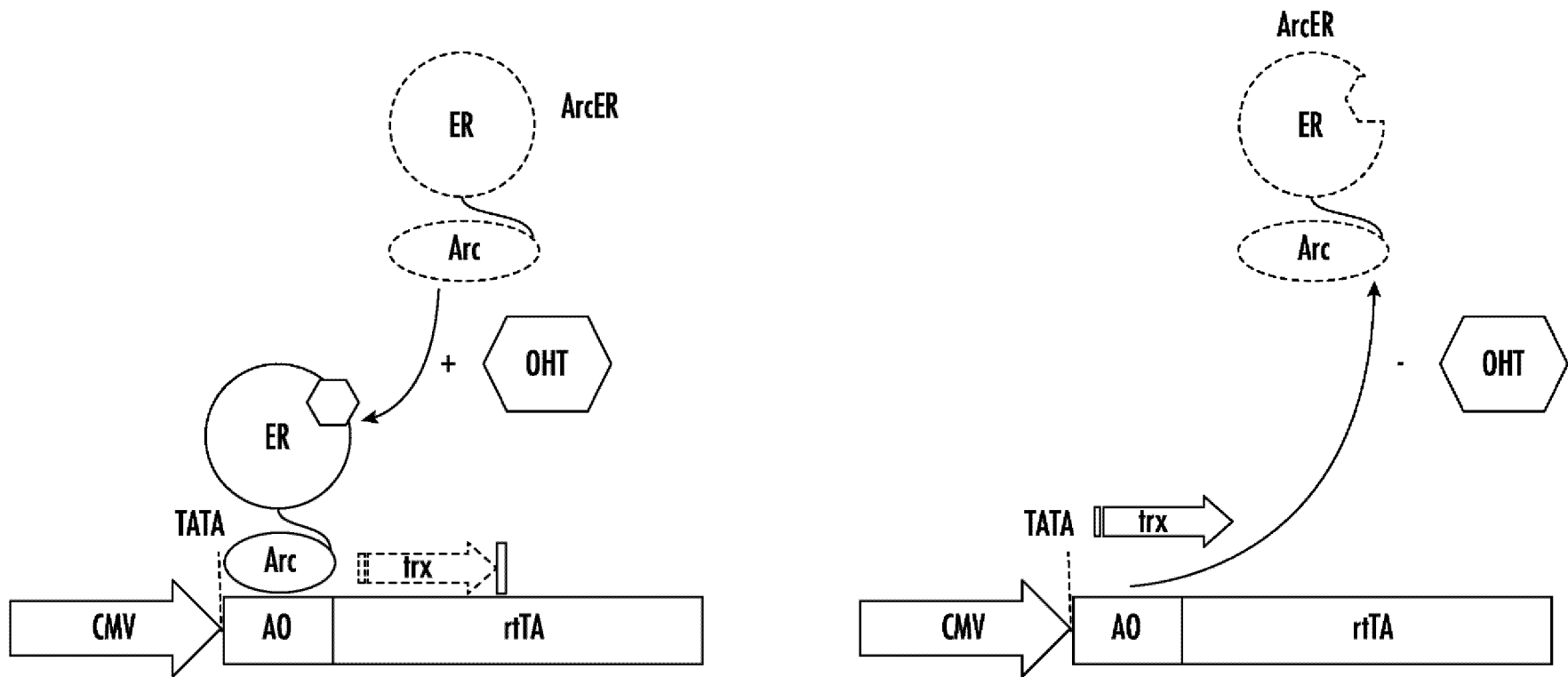


Фиг. 1

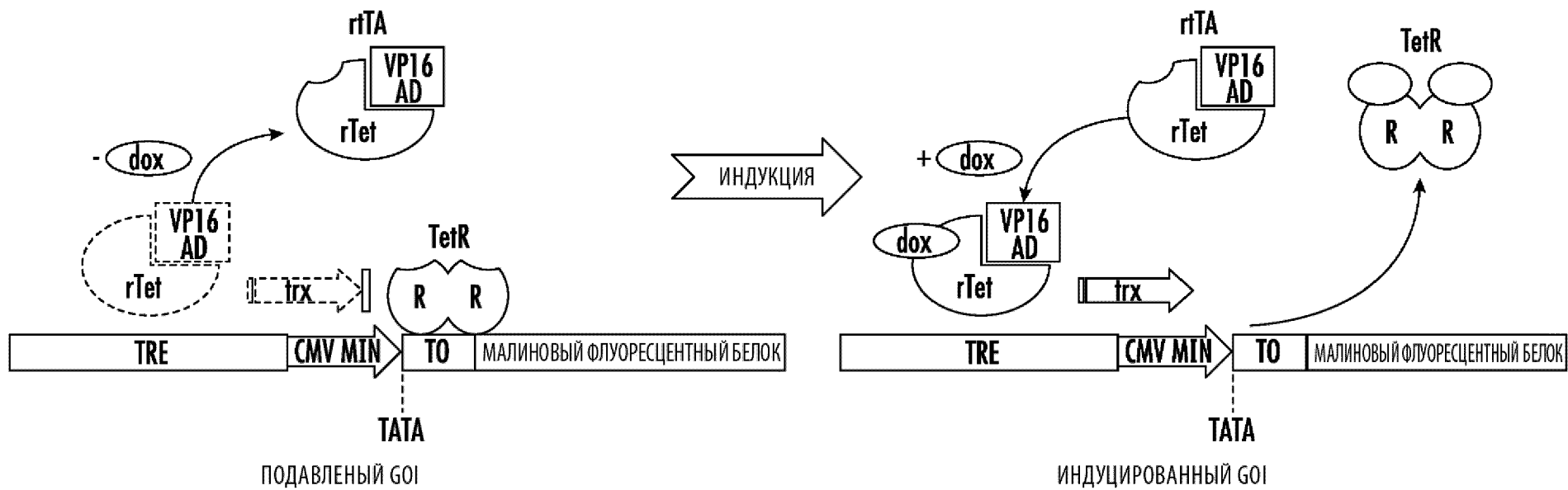
ИНДУЦИРОВАННЫЙ ИНТЕРЕСУЮЩИЙ ГЕН (GOI)



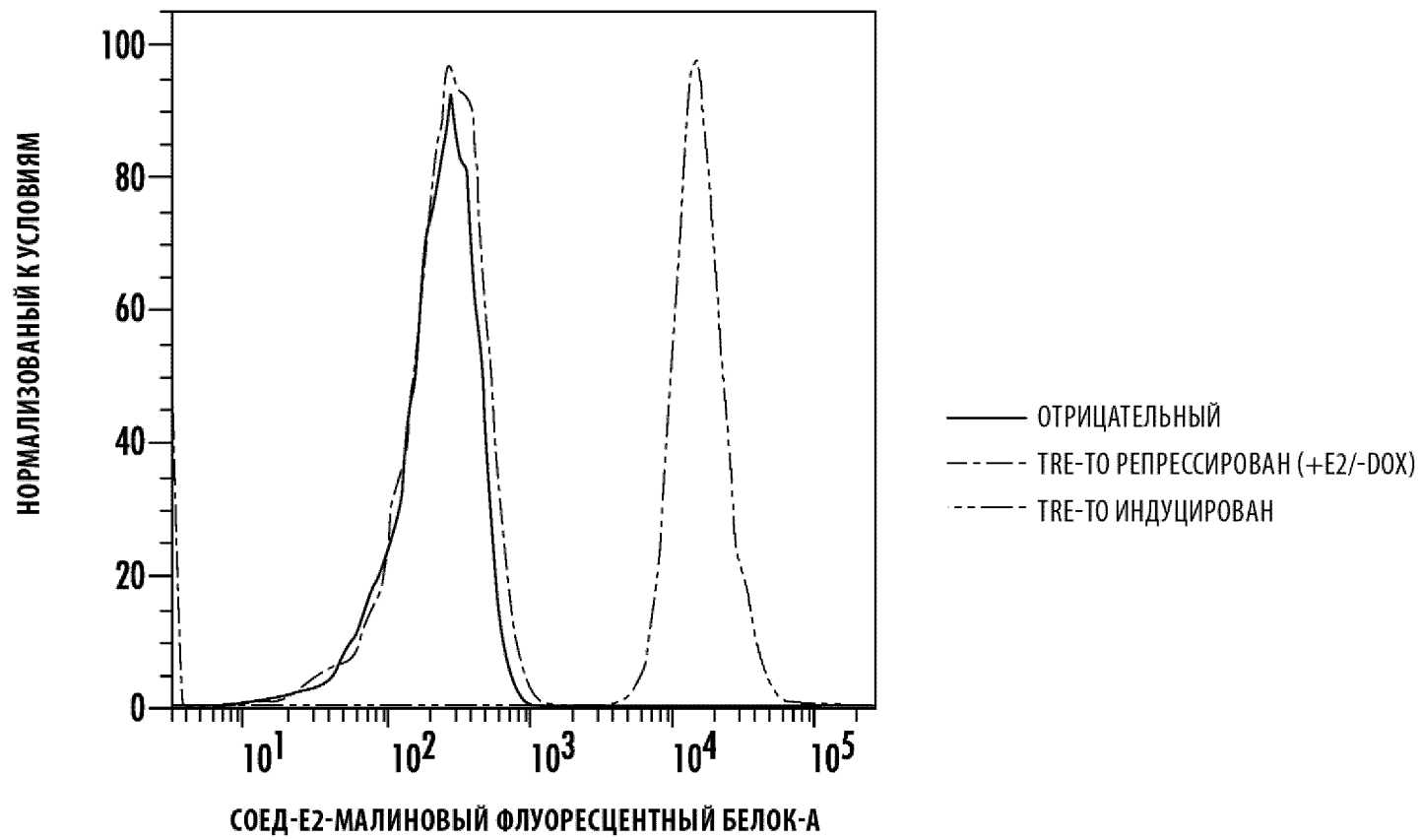
Фиг. 2



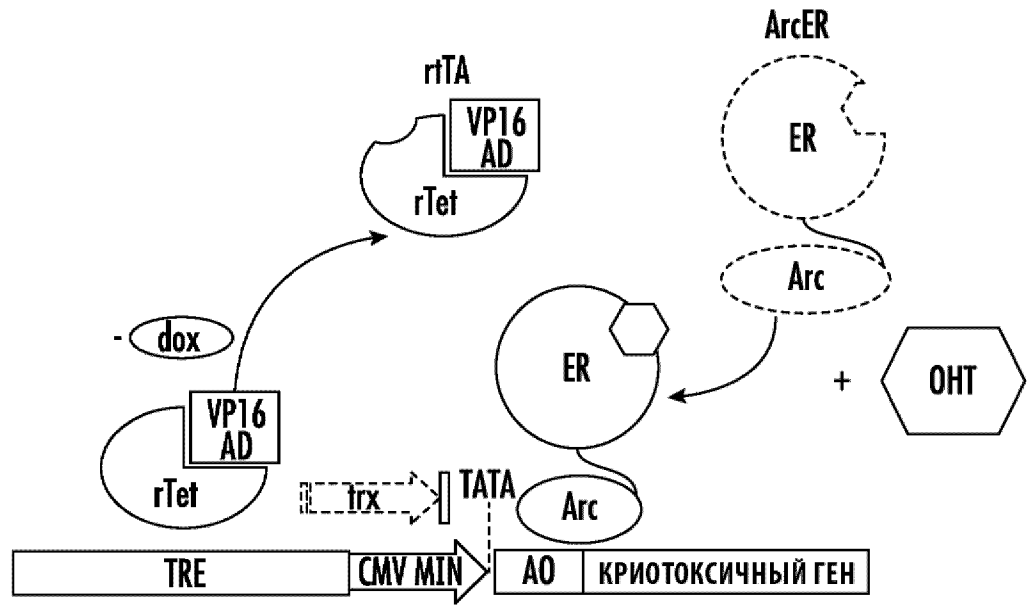
Фиг. 3



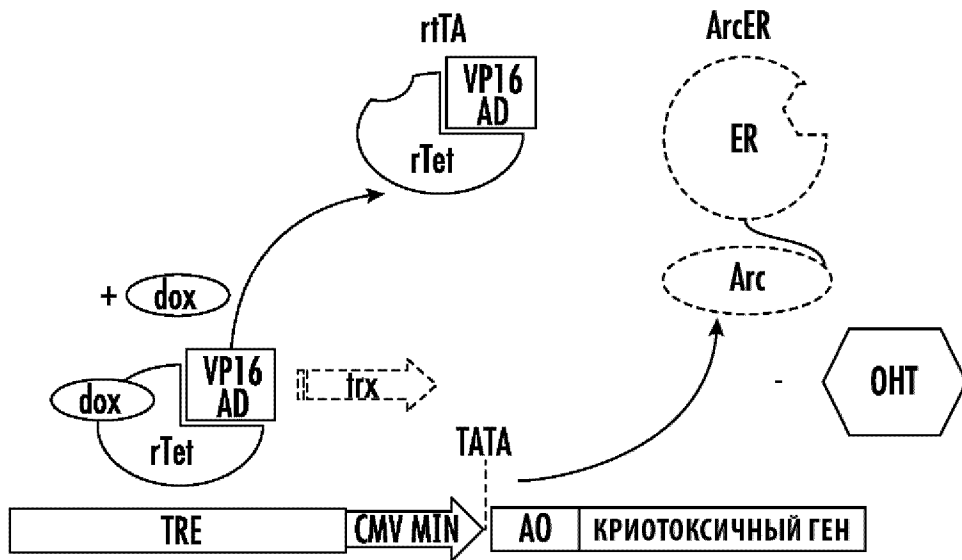
Фиг. 4



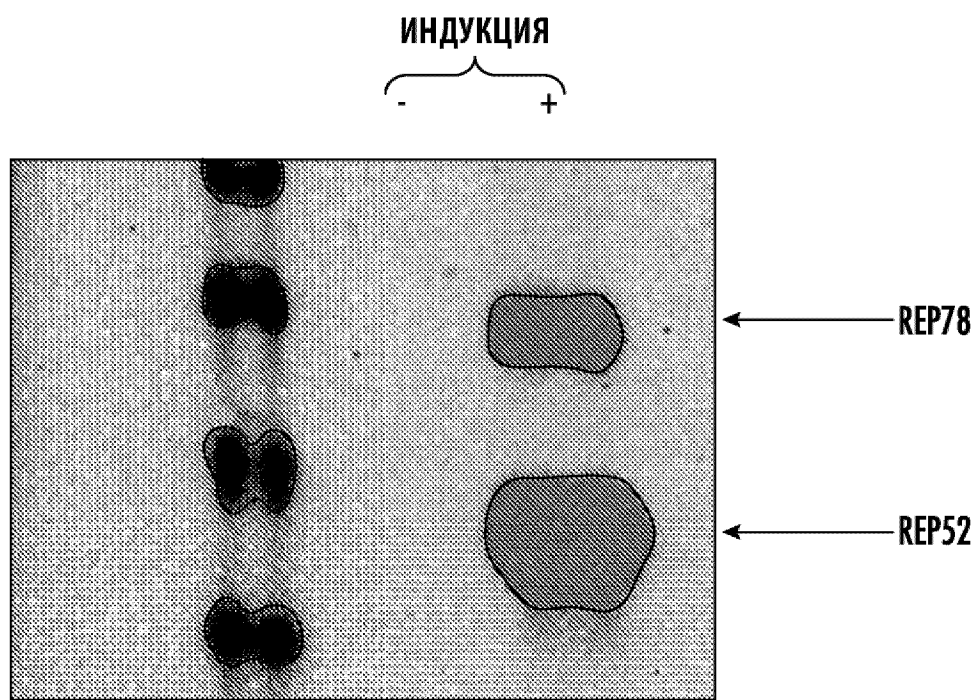
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8