

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201791751** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2018.02.28

(22) Дата подачи заявки
2016.02.02

(51) Int. Cl. *C12N 15/11* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

(54) РЕГУЛИРОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПОСРЕДСТВОМ АПТАМЕР-ОПОСРЕДОВАННОГО МОДУЛИРОВАНИЯ АЛЬТЕРНАТИВНОГО СПЛАЙСИНГА

(31) 62/110,919

(32) 2015.02.02

(33) US

(86) PCT/US2016/016234

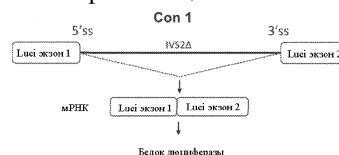
(87) WO 2016/126747 2016.08.11

(71) Заявитель:
**МЕИРЭДжТиЭкс ЮКей П ЛИМИТЕД
(GB)**

(72) Изобретатель:
**Бойн Алекс Р., Дэйнос Ф. Оливье,
Воллес Дж. Майкл, Го Сюэцуй (US)**

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

(57) В данном изобретении предлагается платформа и способы применения платформы для регулирования экспрессии целевого гена с применением воздействия лиганда (например, низкомолекулярного), связывающегося с аптамером. Платформа имеет полинуклеотидную кассету для регулирования генов, которую помещают в целевой ген, и содержит синтетический рибосвитч, расположенный в области 5'-интрон -альтернативный экзон - 3'-интрон. Рибосвитч содержит эффекторную область и сенсорную область (например, аптамер, который связывается с низкомолекулярным лигандом), вследствие чего альтернативный экзон сплайсируется в мРНК целевого гена при отсутствии лиганда, тем самым предотвращая экспрессию целевого гена. При наличии лиганда альтернативный экзон не сплайсируется в мРНК целевого гена, тем самым обеспечивая экспрессию целевого гена.



A1

201791751

201791751

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-544889ЕА/061

РЕГУЛИРОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПОСРЕДСТВОМ АПТАМЕР-ОПОСРЕДОВАННОГО МОДУЛИРОВАНИЯ АЛЬТЕРНАТИВНОГО СПЛАЙСИНГА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет по заявке на патент США №62/110919, поданной 2 февраля 2015 года, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] В данном изобретении предлагается платформа и способы применения платформы для регулирования экспрессии целевого гена с применением воздействия низкомолекулярного соединения. Платформа имеет полинуклеотидную кассету, которую помещают в целевой ген, и при этом содержит синтетический рибосвитч, расположенный в области 5'-интрон -альтернативный экзон - 3'-интрон. Рибосвитч содержит эффекторную область и аптамер, который связывается с лигандом (например, низкомолекулярным) и обеспечивает контроль экспрессии целевого гена под воздействием лиганда.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Сплайсинг означает процесс, с помощью которого интронная последовательность удаляется из зарождающейся пред-матричной РНК (пре-мРНК), а экзоны объединяются вместе, образуя мРНК. Участки сплайсинга представляют собой соединения между экзонами и интронами и определяются различными консенсусными последовательностями на 5'- и 3'-концах интрона (т.е. участок донора сплайсинга и участок акцептора сплайсинга соответственно). Альтернативный сплайсинг пре-мРНК или альтернативный сплайсинг представляет собой широко распространенный процесс, происходящий в большинстве генов человека, содержащих множество экзонов. Процесс осуществляется с помощью большой многокомпонентной структуры, называемой сплайсингосомой, которая представляет собой набор малых ядерных рибонуклеопротеинов (snRNP) и разнообразный массив вспомогательных белков. Распознавая различные цис-регуляторные последовательности, сплайсингосома определяет границы экзона/интрона, удаляет интронные последовательности и объединяет экзоны в конечную транслируемую матрицу (т.е. мРНК). В случае альтернативного сплайсинга некоторые экзоны могут быть включены или исключены для изменения конечной кодируемой

матрицы, тем самым изменяя полученный экспрессированный белок.

[0004] Регулирование экспрессии целевого гена (например, терапевтического трансгена) необходимо в самых разных ситуациях. В контексте терапевтической экспрессии генов методы, которые позволяют регулировать экспрессию трансгенов, могут повысить безопасность посредством регулирования уровня экспрессии и времени ее осуществления. Регулируемая система контроля экспрессии белка играет практическую и в некоторых случаях основную роль для безопасного и эффективного терапевтического применения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0001] В одном аспекте данного изобретения предлагается полинуклеотидная кассета для регулирования экспрессии целевого гена, содержащая (a) рибосвитч и (b) альтернативно сплайсированный экзон, граничащий с 5'-интроном и 3'-интроном, при этом рибосвитч содержит (i) эффекторную область, содержащую стебель, который включает 5'-участок сплайсинга 3'-интрона, и (ii) аптамер, причем альтернативно сплайсированный экзон содержит стоп-кодон, который находится внутри рамки с целевым геном, когда альтернативно сплайсированный экзон сплайсирован в мРНК целевого гена. В одном варианте реализации изобретения аптамер специфически связывается с низкомолекулярным лигандом.

[0002] В одном варианте реализации изобретения полинуклеотид для регулирования экспрессии целевого гена ("кассета регулирования гена", "регуляторная кассета" или "полинуклеотидная кассета") содержит 5'- и 3'-интроны, которые получены из эндогенного интрона из целевого гена. В одном варианте реализации изобретения 5'- и 3'-интроны являются экзогенными для целевого гена. В одном варианте реализации изобретения 5'- и 3'-интроны получают из интрона 2 гена β -глобина человека. В одном варианте реализации изобретения 5'-интрон содержит стоп-кодон в рамке с целевым геном. В одном варианте реализации изобретения 5'- и 3'-интроны, каждый независимо, содержат от около 50 до около 300 нуклеотидов в длину. В одном варианте реализации изобретения 5'- и 3'-интроны, каждый независимо, содержат от около 125 до около 240 нуклеотидов в длину. В одном варианте реализации изобретения 5'- и/или 3'-интроны модифицированы для включения или изменения последовательности интронного энхансера сплайсинга, интронного

энхансера сплайсинга, 5'-участка сплайсинга, 3'-участка сплайсинга или последовательности точек разветвления.

[0003] В одном варианте реализации изобретения стебель эффекторной области рибосвитча содержит от около 7 до около 20 пар оснований в длину. В одном варианте реализации изобретения стебель эффекторной области содержит от 8 до 11 пар оснований в длину.

[0004] В одном варианте реализации изобретения альтернативно сплайсированный экзон получают из экзона 2 гена дигидрофолатредуктазы человека (DHFR), экзона 5 мутантной опухоли Вильмса 1, дельта экзона 16 кальций/калмодулин-зависимой протеинкиназы II мыши, или экзона 6 SIRT1. В одном варианте реализации изобретения альтернативно сплайсированный экзон представляет собой модифицированный экзон 2 DHFR из SEQ ID NO 15. В одном варианте реализации изобретения альтернативно сплайсированный экзон модифицирован в одной или более групп, состоящих из изменения последовательности экзонного сайленсера сплайсинга, изменения последовательности экзонного энхансера сплайсинга, добавления экзонного энхансера сплайсинга и добавления экзонного донора сплайсинга. В одном варианте реализации изобретения альтернативно сплайсированный экзон является синтетическим (т.е. полученным не из природного экзона).

[0005] В другом аспекте данного изобретения предлагается способ модулирования экспрессии целевого гена, включающий (а) вставку полинуклеотидной кассеты по данному изобретению (как, например, описано выше и далее в тексте данного документе) в целевой ген, (b) введение целевого гена, содержащего полинуклеотидную кассету, в клетку, и (с) воздействие на клетку низкомолекулярным лигандом, который специфически связывается с аптамером в количестве, эффективном для индуцирования экспрессии целевого гена.

[0006] В одном варианте реализации изобретения уровень экспрессии целевого гена при наличии низкомолекулярного лиганда выше примерно в 5 раз по сравнению с уровнями экспрессии при отсутствии низкомолекулярного лиганда. В одном варианте реализации изобретения уровень экспрессии целевого гена при наличии низкомолекулярного лиганда выше примерно в 10 раз по сравнению с уровнями экспрессии при отсутствии низкомолекулярного лиганда.

[0007] В одном варианте реализации изобретения полинуклеотидную кассету вводят в область целевого гена, кодирующую белок. В одном варианте реализации изобретения в целевой ген вводят две или более полинуклеотидных кассеты. В одном варианте реализации изобретения две или более полинуклеотидных кассеты содержат различные аптамеры, которые специфически связываются с различными низкомолекулярными лигандами. В другом варианте реализации изобретения две или более полинуклеотидных кассеты содержат один и тот же аптамер различных аптамеров, которые специфически связываются с одним и тем же лигандом.

[0008] В одном варианте реализации изобретения целевой ген, содержащий полинуклеотидную кассету, вводят в вектор для экспрессии целевого гена. В одном варианте реализации изобретения вектор представляет собой вирусный вектор. В других вариантах реализации изобретения вирусный вектор выбирают из группы, состоящей из аденовирусного вектора, вектора аденоассоциированного вируса и лентивирусного вектора.

[0009] В другом аспекте данного изобретения предлагается способ модулирования экспрессии целевого гена в глазу млекопитающего, включающий (a) введение в глаз вектора, содержащего целевой ген, который содержит полинуклеотидную кассету, содержащую (i) рибосвитч и (ii) альтернативно сплайсированный экзон, граничащий с 5'-интроном и 3'-интроном, при этом синтетический рибосвитч содержит эффекторную область, содержащую стебель, который включает 5'-участок сплайсинга 3'-интрона, и аптамер, который специфически связывается с лигандом, причем альтернативно сплайсированный экзон содержит стоп-кодон, который находится внутри рамки с целевым геном, когда альтернативно сплайсированный экзон сплайсирован в мРНК целевого гена; и (b) введение млекопитающему лиганда в количестве, эффективном для индуцирования экспрессии целевого гена. В одном варианте реализации изобретения лиганд представляет собой низкомолекулярное соединение.

[0010] В одном варианте реализации изобретения вектор вводят в глаз путем внутриглазной инъекции. В одном варианте реализации изобретения вектор представляет собой вирусный вектор. В одном варианте реализации изобретения вирусный вектор выбирают из группы, состоящей из аденовирусного вектора, вектора аденоассоциированного вируса и лентивирусного вектора.

[0011] В одном варианте реализации изобретения полинуклеотид для регулирования экспрессии целевого гена в глазу содержит 5'- и 3'-интроны, которые получены из эндогенного интрона из целевого гена. В одном варианте реализации изобретения 5'- и 3'-интроны являются экзогенными для целевого гена. В одном варианте реализации изобретения 5'- и 3'-интроны получают из интрона 2 гена β -глобина человека. В одном варианте реализации изобретения 5'-интрон содержит стоп-кодон в рамке с целевым геном. В одном варианте реализации изобретения 5'- и 3'-интроны, каждый независимо, содержат от около 50 до около 300 нуклеотидов в длину. В одном варианте реализации изобретения 5'- и 3'-интроны, каждый независимо, содержат от около 125 до около 240 нуклеотидов в длину. В одном варианте реализации изобретения 5'- и/или 3'-интроны модифицированы для включения или изменения последовательности интронного энхансера сплайсинга, интронного энхансера сплайсинга, 5'-участка сплайсинга, 3'-участка сплайсинга или последовательности точек разветвления. В одном варианте реализации изобретения стебель эффекторной области рибосвитча содержит от около 7 до около 20 пар оснований в длину. В одном варианте реализации изобретения стебель эффекторной области содержит от 8 до 11 пар оснований в длину. В одном варианте реализации изобретения альтернативно сплайсированный экзон получают из экзона 2 гена дигидрофолатредуктазы человека (DHFR), экзона 5 мутантной опухоли Вильмса 1, дельта экзона 16 кальций/калмодулин-зависимой протеинкиназы II мыши, или экзона 6 SIRT1. В одном варианте реализации изобретения альтернативно сплайсированный экзон представляет собой модифицированный экзон 2 DHFR из SEQ ID NO 15, модифицированный экзон 2 из DHFR человека. В одном варианте реализации изобретения альтернативно сплайсированный экзон модифицирован в одной или более групп, состоящих из изменения последовательности экзонного сайленсера сплайсинга, изменения последовательности экзонного энхансера сплайсинга, добавления экзонного энхансера сплайсинга и добавления экзонного донора сплайсинга. В одном варианте реализации изобретения альтернативно сплайсированный экзон является синтетическим (т.е. полученным не из природного экзона).

[0012] В одном аспекте данного изобретения предлагается рекомбинантный полинуклеотид, содержащий целевой ген, который содержит полинуклеотидную кассету для регулирования экспрессии

целевого гена (как, например, описано выше). В одном варианте реализации изобретения полинуклеотидную кассету помещают в кодирующую белок последовательность целевого гена.

[0013] В одном аспекте данного изобретения предлагается вектор, содержащий целевой ген, который содержит полинуклеотидную кассету для регулирования экспрессии целевого гена (как, например, описано выше). В одном варианте реализации изобретения вектор представляет собой вирусный вектор. В одном варианте реализации изобретения вирусный вектор выбирают из группы, состоящей из аденовирусного вектора, вектора аденоассоциированного вируса и лентивирусного вектора.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0014] **фиг. 1a.** Схематическое изображение конструкции сплайсинга "Con 1" с усеченным интроном 2 бета-глобина человека (IVS2 Δ), вставленным в кодирующую последовательность гена люциферазы. Обозначения "Luc1 экзон 1" и "Luc1 экзон 2" относятся к делению гена люциферазы на 5' и 3'- кодирующие последовательности. Сплайсинг вставленной интронной последовательности IVS2 Δ приводит к образованию полноразмерной мРНК, которая транслируется в полноразмерный белок.

[0015] **фиг. 1b.** Влияние интронной вставки и последовательности участка сплайсинга на экспрессию люциферазы. Конструкции от Con 1 по Con 7 содержат разные интронные участки сплайсинга (см. Таблицу 1). Конструкция Con 1 содержит IVS2 Δ со своим исходным IVS2 5'-участком сплайсинга и 3'-участком сплайсинга ("5'ss" и "3'ss" соответственно). Конструкции от Con 2 по Con 7 содержат IVS2 Δ , но с отличающимися последовательностями 5'ss и 3'ss, как указано в Таблице 1. Конструкция Con 8 не содержит интрона IVS2 Δ . Конструкции от Con 1 по Con 3 не продемонстрировали какого-либо влияния с интронной вставкой на экспрессию люциферазы по сравнению с контролем люциферазы без интронной вставки (Con 8). Конструкции от Con 4 по Con 7 с участками более слабого сплайсинга, демонстрировали сниженный уровень экспрессии люциферазы.

[0016] **фиг. 2a.** Схематическое изображение кассеты "интрон-экзон-интрон" с профилями сплайсинга с включением экзона (I) и исключением экзона (II). Звездочка (◆) обозначает стоп-кодон в экзоне 2 DHFR. Если альтернативный экзон DHFR включен в мРНК целевого гена (люциферазы) путем сплайсинга (I), полученный транскрипт содержит внутрирамочный стоп-кодон, который блокирует

экспрессию гена люциферазы. Целевой ген экспрессируется только в тех случаях, когда альтернативный экзон DHFR, содержащий стоп-кодон, исключается из конечной мРНК (II).

[0017] **фиг. 2b.** Влияние включения или исключения альтернативного экзона DHFR на экспрессию гена люциферазы. Анализ люциферазы проводили на клетках НЕК 293, трансфицированных различными репортерными конструкциями люциферазы, содержащими кассету "интрон-экзон-интрон", как показано на Фиг. 2а. Экзон 2 DHFR с последовательностями участков сплайсинга дикого типа (DHFR_wt) сравнивали с мутантами, содержащими экзона DHFR в 5' ss (DHFR_wt5ssC), или с нативными 5' ss, замененными более сильной Con 1 5' ss (DHFR_Con15ss) или слабой 5' ss из Con 4 (DHFR_Con45ss). Конструкция, используемая в полосе 1 в Фиг. 2b и 2c, представляет собой Con 1, которая показана на Фиг. 1 и описана в Примере 1. Вставка экзона 2 DHFR в мРНК люциферазы обуславливала снижение экспрессии люциферазы, которое не происходило, если 5' ss (т.е. донор сплайсинга) экзона 2 DHFR подвергали мутации (сравните DHFR_wt с DHFR_wt5ssC). Когда 5' ss в экзоне DHFR заменяли более сильными 5' ss из Con 1 (конструкция DHFR-Con1 5' ss), включение экзона DHFR усиливалось, что обуславливало уровень экспрессии люциферазы в 545 раз ниже по сравнению с Con 1. Когда слабый 5' ss (из Con 4 в Примере 1) применяли для замены 5' ss дикого типа, сниженный уровень сплайсинга на этом участке предотвращал включение экзона DHFR, тем самым усиливая экспрессию люциферазы.

[0018] **фиг. 2с.** Экзонный энхансер (ESE) или супрессор (ESS) сплайсинга в последовательности экзонов DHFR влияют на сплайсинг альтернативного экзона DHFR и модулируют экспрессию гена-мишени. Мутация участка связывания SRp40 в экзоне 2 DHFR приводила к резкому снижению экспрессии люциферазы: в 2982 раз по сравнению с экспрессией DHFR_wtmtSRp40 и экспрессией из Con 1 (Фиг. 2с DHFR_wtmtSRp40; Таблица 2). Мутация предполагаемого участка связывания для энхансера сплайсинга SC35 с целью создания более сильного участка связывания SC35 (Таблица 2, StrSC35) дополнительно уменьшала экспрессию люциферазы (в 139 раз) по сравнению с Con 1 (Фиг. 2с, DHFR_wtStrSC35), по-видимому, из-за повышенной эффективности включения экзона DHFR. Замена участка связывания для энхансера сплайсинга SC35 с эффектом ингибитора сплайсинга hnRNP A1 (Таблица 2, SC35hnRNPA1) обуславливала

повышение экспрессии люциферазы в 4,3 раза по сравнению с экзоном 2 DHFR дикого типа (Фиг. 2с, DHFR_wt SC35hnRNPA1).

[0019] **Фиг. 3а** Схематическое изображение кассеты "интрон-экзон-интрон", содержащей шпилькообразную структуру в участке 5' ss альтернативного экзона 2 DHFR. Когда участок 5' ss DHFR внедряют в шпилькообразную структуру, экзон DHFR не включается в транскрипт, что позволяет экспрессировать люциферазу (х представляет участок 5' ss экзона DHFR, погруженный в шпильку).

[0020] **Фиг. 3b.** Последовательности и структуры четырех разных шпилек, протестированные в кассете "интрон-экзон-интрон", проиллюстрированы на Фиг. 3а.

[0021] **Фиг. 3с.** Влияние шпилькообразной структуры на участке 5' ss экзона 2 DHFR на экспрессию целевого гена. Конструкция, содержащая экзон DHFR с последовательностью 5' ss Con 1, эффективно подавляет экспрессию люциферазы за счет включения экзона DHFR в сплайсированную мРНК (DHFR_Con15ss, Фиг. 3с). Однако встраивание 5' ss экзона DHFR в шпилькообразную структуру эффективно предотвращает включение экзона DHFR, что позволяет осуществляться экспрессии люциферазы (DHFR_Con15ss_HP15 Фиг. 3с). Последовательность шпильки с поврежденным стеблем не восстанавливает экспрессию люциферазы (Фиг. 3с. DHFR_Con15ss_HP15х). Конструкция DHFR_wtmtSRp40 (Пример 2) не экспрессирует люциферазу, если участок 5' ss экзона DHFR стабильно секвестрирован в шпилькообразной структуре (DHFR_wtmtSRp40_HP15). Дестабилизация шпильки предотвращает экспрессию люциферазы даже при наличии мутантного участка связывания SRp40 с сильной активностью сплайсинга (DHFR_wtmtSRp40_HP15х).

[0022] **Фиг. 4а и Фиг. 4b.** Схематическое изображение процесса регуляции гена с помощью регуляторной кассеты "интрон-экзон-интрон", содержащей синтетический рибосвитч. В отсутствие связывания "аптамер/лиганд", аптамерная последовательность разрушает образование стебля шпильки, оставляя участок 5' ss экзона DHFR доступным и обуславливая включение экзона DHFR, тем самым предотвращая трансляцию и блокируя экспрессию белка (Фиг. 4а). Когда происходит связывание "аптамер/лиганд", зависимые от лиганда конформационные изменения в аптамере стабилизируют образование стебля, секвестрируя участок 5' ss экзона DHFR, что приводит к исключению экзона DHFR и экспрессии гена люциферазы (Фиг. 4b).

[0023] **Фиг. 4с.** Стебель шпильки и теофиллиновые аптамерные конфигурации с разной длиной соединительного стебля. Стебель теофиллинового аптамера непосредственно связывали со стеблем шпильки, секвестрирующей участок 5' ss экзона DHFR, создавая синтетический стебель из 20 п.о. Последовательность стебля усекали, создавая ряд шпилек с различной длиной стебля. Показаны структуры стебля для DHFR_Theo1, 12, 13 и 14 с длиной стебля 20 п.о., 9 п.о., 8 п.о. и 7 п.о. соответственно. Теофиллин обозначен как (▲).

[0024] **Фиг. 4d.** Влияние различных длин стебля с применением теофиллинового аптамера на экспрессию целевого гена при наличии и в отсутствие теофиллина. Диаграмма, иллюстрирующая экспрессию люциферазы, регулируемую регуляторными кассетами, содержащими теофиллиновые аптамеры, которые были получены, как описано в Примере 4 (Фиг. 4с). В конструкциях от Theo 1 до Theo 12 с длиной стебля от 20 п.о. до 9 п.о., стебель шпильки имел достаточную длину, чтобы сформировать устойчивую структуру в отсутствие связывания "аптамер/лиганд". DHFR_Theo13 не образует стабильного стебля шпильки в отсутствие лиганда, поэтому участок 5' ss экзона DHFR не скрыт, что приводит к включению экзона DHFR, блокируя экспрессию люциферазы. При наличии теофиллина шпилька стабилизируется, и участок 5' ss экзона DHFR оказывается недоступен для процесса сплайсинга. Это приводит к исключению экзона DHFR, обеспечивающего экспрессию люциферазы. При наличии 3 мМ теофиллина, DHFR_Theo_13 демонстрирует 43-кратную индукцию по сравнению с неиндуцированным исходным уровнем экспрессии. DHFR_Theo_14 не проявляет экспрессии люциферазы при наличии или в отсутствие теофиллина, что указывает на то, что этот стебель из 7 п.о. слишком короткий, чтобы сформировать стабильную шпильку, даже когда аптамер связывается со своим лигандом. В результате экзон DHFR соединяется с транскриптом, и экспрессия люциферазы блокируется.

[0025] **Фиг. 5а.** Последовательности синтетических стеблей, соединяющих xpt-гуаниновый аптамер и последовательность 5' ss экзона DHFR, создают последовательным усечением стебля шпильки и стебля аптамера P1. Гуанин обозначен как (●).

[0026] **Фиг. 5b.** Влияние длины стебля на способность рибосвитча регулировать экспрессию люциферазы в ответ на связывание аптамера с лигандом. В регуляторную кассету вставляли восемнадцать рибосвитчей со стеблями различной длины, и

конструкции трансфицировали в клетки НЕК 293, которые выращивали при наличии или в отсутствие 500 мкМ гуанина. В отсутствие гуанина конструкции G14-G18 демонстрируют снижение экспрессии люциферазы по сравнению с нерегулируемым контролем Con 1. При наличии гуанина экспрессия люциферазы восстанавливалась в различной степени.

[0027] **Фиг. 5с и 5d.** Дополнительный анализ влияния длины стебля на способность рибосвитча регулировать экспрессию люциферазы в ответ на связывание аптамера с лигандом. Конструкции от G11 до G18 оценивали с помощью анализа люциферазы. Фиг. 5d иллюстрирует исходный и индуцированный уровень люциферазы относительно Con1. В отсутствие гуанина, конструкции от G14 до G17 демонстрируют четкую регуляцию экспрессии люциферазы посредством соединения "аптамер/лиганд" (в данном случае гуаниновый аптамер). В отсутствие гуанина уровни экспрессии люциферазы определяются низкими. При наличии гуанина экспрессия люциферазы значительно активируется. Фиг. 5d демонстрирует % экспрессии контрольной конструкции Con 1, полученный для этих регулируемых конструкций при индукции гуанином.

[0028] **Фиг. 5е.** Регуляторная кассета, содержащая рибосвитч xpt-G17, дает возможность регулировать экспрессию генов в ответ на лиганд в ряде различных типов клеток млекопитающих. DHFR_G17 трансфицировали в клеточные линии HepG2, AML12, RD и C2C12 и анализировали на предмет индуцированной экспрессии люциферазы при воздействии гуанином. Приведены показатели кратности индукции экспрессии люциферазы для случаев, когда клетки выращивались при наличии лиганда, по сравнению с неиндуцированным исходным уровнем экспрессии, когда гуанин не добавляли в среду для культивирования клеток.

[0029] **Фиг. 5f.** Регулирование люциферазы с помощью регуляторной кассеты, содержащей xpt-G17, с применением вирусного вектора. Конструкцию с геном люциферазы, содержащую регуляторную кассету xpt-G17, переносили в основу вектора AAV и применяли для трансфицирования клеток. Клетки выращивали при наличии и в отсутствие гуанина. Приведены показатели кратности индукции люциферазы в присутствии гуанина; при воздействии гуанином регистрировали 1687-кратную индукцию экспрессии.

[0030] **Фиг. 5g.** Регулирование антител с помощью регулирующей кассеты в ответ на связывание аптамера с лигандом.

Регуляторную кассету "интрон-экзон-интрон" с рибосвитчем xpt-G17 вставляли в лидерную пептидную последовательность последовательности антитела анти-KDR и полученную конструкцию трансфицировали в клетки НЕК 293. По результатам анализа ELISA, регистрировали 80-кратную индукцию экспрессии белка антитела после воздействия лигандом на трансфицированные клетки по сравнению с необработанными клетками. Индуцированный уровень экспрессии составил около 40% от контрольной конструкции, содержащей интронную последовательности Con 1.

[0031] **Фиг. 5h.** Регулирование секретируемого белка эритропоэтина (ЕРО) с помощью регуляторной кассеты в ответ на связывание аптамера лигандом. Регуляторную кассету "интрон-экзон-интрон" с рибосвитчем xpt-G17 вставляли в ген эритропоэтина (Еро) мыши и полученную конструкцию трансфицировали в клетки НЕК 293. По результатам анализа ELISA, в отсутствие гуанина регистрировали низкий уровень экспрессии ЕРО. При наличии гуанина наблюдалась 140-кратная индукция экспрессии ЕРО.

[0032] **Фиг. 6a** Структуры различных пуриновых стеблей рибосвитча, анализируемых в регуляторной кассете. Пури́н обозначен как ●.

[0033] **Фиг. 6b-6e.** Эффект дозы конструкций с регуляторными кассетами, содержащими рибосвитчи на основе различных аптамеров (стебли рибосвитчей проиллюстрированы на Фиг. 6a).

[0034] **Фиг. 6b.** Ответ регуляторных кассет, содержащих гуаниновый аптамер, на гуанин.

[0035] **Фиг. 6c.** Ответ регуляторных кассет, содержащих гуаниновый аптамер, на гуанозин.

[0036] **Фиг. 6d.** Ответ регуляторных кассет, содержащих гуаниновый аптамер, на 2'dG.

[0037] **Фиг. 6e.** Ответ регуляторных кассет, содержащих адениновый аптамер, на аденин.

[0038] **Фиг. 7a.** Индукция EGFP с помощью регуляторной кассеты, содержащей xpt-G17, с применением гуанина. Регуляторную кассету "интрон-экзон-интрон" с рибосвитчем xpt-G17 клонировали в ген EGFP. Клетки НЕК 293, стабильно трансфицированные конструкцией, обрабатывали гуанином 500 мкМ и анализировали методом проточной цитометрии на предмет экспрессии GFP через 6 часов после обработки. Обработка гуанином приводила к повышению уровня экспрессии EGFP, Фиг. 7a, (B).

[0039] **Фиг. 7b.** Влияние наличия или отсутствия лиганда на экспрессию целевого гена. Клетки НЕК 293, стабильно трансфицированные EGFP с помощью кассеты "интрон-экзон-интрон", содержащей рибосвитч xpt-G17, обрабатывали в течение 3 дней гуанином 500 мкМ и анализировали методом проточной цитометрии каждые 24 часа в течение 3 дней. Гуанинсодержащие среды вымывали из клеток, а сами клетки продолжали выращивать без воздействия гуанина еще в течение 10 дней, при этом осуществляя мониторинг экспрессии EGFP. Экспрессия EGFP повышалась, когда гуанин присутствовал в среде для культивирования клеток. Без воздействия гуанина экспрессия EGFP прекращалась.

[0040] **Фиг. 8a.** Экспрессию люциферазы регулировали двумя копиями регуляторной кассеты, содержащей xpt-G15. На графике продемонстрирован зависимый от дозы гуанина ответ конструкций с одной регуляторной кассетой, содержащей xpt-G17 или xpt-G15, вставленной в целевой ген, и конструкции с двумя копиями регуляторной кассеты, содержащей xpt-G15 (двойной xpt-G15).

[0041] **Фиг. 8b.** Экспрессия EGFP в клетках культуры тканей, регулируемая различными регуляторными кассетами. Одна копия кассеты, содержащей xpt-G17 (EGFP-xpt-G17), обуславливает низкий уровень неиндуцированной исходной экспрессии (A) и достигает более низкого индуцированного уровня экспрессии по сравнению с клетками, содержащими конструкцию EGFP-xpt-G15 (D). Одна копия кассеты, содержащей xpt-G15 (EGFP-xpt-G15), обуславливает более высокий уровень неиндуцированной исходной экспрессии (B), а также более высокий уровень индуцированной экспрессии (E). С конструкцией, содержащей две копии кассет, содержащих xpt-G15 (двойной EGFP-xpt-G15), фоновая неиндуцированная экспрессия снижается (C), не уменьшая индуцированный уровень экспрессии (F), в результате чего показатель кратности индукции увеличивается. Клетки обрабатывали гуанином и визуализировали через 24 часа после обработки.

[0042] **Фиг. 8с.** Регуляторные кассеты, содержащие рибосвитчи xpt-G15 и xpt-G17, отвечают как на гуанин, так и на гуанозин. Количественную оценку экспрессии EGFP (средняя интенсивность флуоресценции) осуществляли с помощью проточной цитометрии, и показатель кратности индукции рассчитывали как среднюю интенсивность флуоресценции (MFI), полученную при обработке гуанином или гуанозином, деленную на MFI, полученную без обработки. В результате обработки гуанином и гуанозином получали

аналогичные уровни и показатели кратности индукции.

[0043] **Фиг. 8d.** Экспрессия люциферазы в конструкции, содержащей одну копию регуляторной кассеты, содержащей xpt-G17, в дополнение к одной копии регуляторной кассеты, содержащей Ydhl-A5. Клетки НЕК 293, трансфицированные этой конструкцией, обрабатывали либо гуанином, либо аденином, либо и тем, и другим. Самые высокие показатели индукции люциферазы регистрировали при комбинированном применении обоих лигандов в самых высоких концентрациях.

[0044] **Фиг. 9a и 9b.** Влияние усечений интронов на экспрессию люциферазы, регулируемую регуляторной кассетой "интрон-экзон-интрон", содержащей рибосвитч xpt-G17. Фиг. 9a демонстрирует показатели кратности индукции, а 9b демонстрирует процент экспрессии люциферазы по сравнению с Con 1.

[0045] **Фиг. 9c.** Схематическое изображение последовательностей, удаленных из регуляторной конструкции DHFR_G17 "интрон-экзон-интрон". Удаленная последовательность изображена незаштрихованной полоской, оставшаяся последовательность изображена заштрихованной полоской.

[0046] **Фиг. 9d и 9e.** Влияние делеций различных интронов, изображенных на Фиг. 9c, на регуляцию генов. Последовательности внутри интронов, расположенные рядом с альтернативным экзоном DHFR, модифицировали сплайсинг экзонов и относительное регулирование генов. Например, DHFR-G17_2IR_3 демонстрирует делеции интронов, которые приводят к значительному повышению показателя кратности экспрессии целевого гена. Фиг. 9d демонстрирует показатель кратности индукции, тогда как Фиг. 9e демонстрирует абсолютный уровень экспрессии белка по сравнению с контролем Con 1.

[0047] **Фиг. 10a и 10b.** Различные экзоны могут функционировать как альтернативный экзон в регуляторной кассете "интрон-экзон-интрон" для регулирования экспрессии генов. Фиг. 10a демонстрирует, что конструкции с различными экзонами имеют различные неиндуцированные исходные и индуцированные (гуанин 500 мкМ) уровни экспрессии люциферазы. Фиг. 10b демонстрирует показатели кратности индукции с этими конструкциями, с CaMKIId-e16, генерирующим эквивалентные показатели кратности индукции с экзоном DHFR с активирующей мутацией SRp40 (mtHFR).

[0048] **Фиг. 11a-c.** Регулирование экспрессии люциферазы *in vivo* у мышей. Конструкцию, содержащую две копии регуляторной

кассеты xpt-G15 (двойной xpt-G15, Пример 8, Фиг. 8a), вводили в печень мышей с помощью гидродинамической инъекции. Мышам перорально вводили различные дозы гуанозина через 2 часа и 12 часов после введения ДНК, а затем осуществляли визуализацию. Пероральное введение лиганда приводило к дозозависимой активации экспрессии регулируемого целевого гена в печени мышей (Фиг. 11a и Фиг. 11b).

[0049] В другом эксперименте гуанозин вводили внутривенно (Фиг. 11c). Изображения демонстрируют экспрессию люциферазы до и после введения гуанозина либо в дозе 100 мг/кг, либо 300 мг/кг. На графике (Фиг. 11d) активность люциферазы выражена как среднее значение фотон/сек/мм² $\pm$ с. о. (n=5).

[0050] **Фиг. 12.** Трансгенная экспрессия EGFP, опосредованная векторами AAV на основе рибосвитча, в сетчатке мыши. Флуоресцентная фотография глазного дна, иллюстрирующая трансгенную экспрессию EGFP в сетчатке, опосредованную AAV2/8-GTX7, через 8 дней после субретиальной инъекции (время экспозиции: 30 с).

[0051] **Фиг. 13a и 13b.** Репрезентативные изображения глазного дна одного мышинного глаза, в который субретиально вводили AAV2/8-GTX7, иллюстрирующие изменение трансгенной экспрессии EGFP в сетчатке в динамике. A-E: Изображения, сделанные под освещением белым светом, с временем экспозиции 200 мс на 2, 8, 9, 10 и 12 день после введения вектора. Кругом обведена область сетчатки, видимая через зрачок, которая была взята за область интереса (ОИ) для количественной оценки. F-J: Изображения, сделанные под освещением белым светом 475 ± 25 нм, с временем экспозиции 30 с, демонстрирующие флуоресценцию eGFP на 2, 8, 9, 10 и 12 день после введения вектора. K-O: Изображения, сделанные под освещением белым светом 475 ± 25 нм с временем экспозиции 30 с на 2, 8, 9, 10 и 12 день после введения вектора, с подсвеченными пикселями выше порога интенсивности 50 в пределах ОИ (обведено кругом). Фиг. 13b демонстрирует изображения с высоким разрешением до (A) и после (B) индукции.

[0052] **Фиг. 13c.** Трансгенная экспрессия EGFP в сетчатке мыши, количественно определяемая в динамике после субретиальной инъекции AAV2/8-GTX7. Флуоресцентные изображения глазного дна были сделаны в следующие моменты времени: на 2, 8, 9, 10 и 12 день после субретиальной инъекции AAV2/8-GTX7. Экспозиция: 30 с,

порог интенсивности пикселей для анализа:50. Внутрибрюшинную индукцию осуществляли после визуализации на 8, 9 и 10 день после субретинальной инъекции AAV2/8-GTX7. Кроме того, на 11 день после субретинальной инъекции AAV2/8-GTX7 проводили интравитреальную индукцию. Статистическую значимость рассчитывали на основе однофакторного анализа ANOVA с коррекцией Даннета с учетом 8 дня после инъекции в качестве контрольной точки.

[0053] **фиг. 13d.** Трансгенная экспрессия EGFP в сетчатке мыши, количественно определяемая в динамике после субретинальной инъекции AAV2/8-GTX5 (положительный контроль). Флуоресцентные изображения глазного дна были сделаны в следующие моменты времени: на 2, 8, 9, 10 и 12 день после субретинальной инъекции AAV2/8-GTX5. Экспозиция: 10 с, порог интенсивности пикселей для анализа: 190. Внутрибрюшинное введение гуанозина проводили после визуализации на 8, 9 и 10 день после субретинальной инъекции AAV2/8-GTX5. Кроме того, на 11 день после субретинальной инъекции AAV2/8-GTX5 гуанозин вводили интравитреально. Применяли однофакторный анализ ANOVA с коррекцией Бонферрони, при этом статистически значимых различий в экспрессии EGFP при обработке гуанозином не обнаружено.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0054] В данном изобретении предлагается кассета для регулирования гена, которая содержит рибосвитч, расположенный в области 5' интрон - альтернативный экзон - 3' интрон. Кассета для регулирования гена относится к конструкции рекомбинантной ДНК, которая, когда включена в ДНК целевого гена, обеспечивает возможность регулировать экспрессию целевого гена посредством аптамер/лиганд-опосредованного альтернативного сплайсинга полученной пре-мРНК. Рибосвитч в контексте данного изобретения содержит сенсорную область (например, аптамер) и эффекторную область, которые вместе ответственны за обнаружение наличия низкомолекулярного лиганда и изменение сплайсинга с альтернативным экзоном. В одном варианте реализации изобретения уровень экспрессии целевого гена повышается при наличии соединения "лиганд/аптамер" и снижается при отсутствии лиганда.

[0055] **Рибосвитч**

[0056] В данном контексте термин "рибосвитч" относится к регуляторному сегменту полинуклеотида РНК. Рибосвитч в контексте данного изобретения содержит сенсорную область (например,

аптамер) и эффекторную область, которые вместе ответственны за обнаружение наличия лиганда (например, низкомолекулярного лиганда) и изменение сплайсинга с альтернативным экзоном. В одном варианте реализации изобретения рибосвитч является рекомбинантным и содержит полинуклеотиды из двух или более источников. В данном контексте термин "синтетический", применительно к рибосвитчу, относится к рибосвитчу, который не встречается в природе. В одном варианте реализации изобретения сенсорные и эффекторные области соединены с помощью полинуклеотидного линкера. В одном варианте реализации изобретения полинуклеотидный линкер образует стебель РНК (т.е. область полинуклеотида РНК, который является двухцепочечным).

[0057] Эффекторная область

[0058] В одном варианте реализации изобретения эффекторная область содержит последовательность 5'-участка сплайсинга ("5'ss") 3'-интрона (т.е. последовательность участка сплайсинга интрона, которая является непосредственно 3'-альтернативным экзоном). Эффекторная область содержит последовательность участка 5'ss 3'-интрона и последовательность, комплементарную последовательности участка 5'ss 3'-интрона. Когда аптамер связывается со своим лигандом, эффекторная область образует стебель и, таким образом, предотвращает сплайсинг с участком донора сплайсинга на 3'-конце альтернативного экзона (см., например, Фиг. 4b). При определенных условиях (например, когда аптамер не связан со своим лигандом), эффекторная область находится в таком месте, которое обеспечивает доступ к участку донора сплайсинга на 3'-конце альтернативного экзона, что приводит к включению альтернативного экзона в мРНК целевого гена (см., например, Фиг. 4a).

[0059] Стеблевая часть эффекторной области должна иметь достаточную длину (и содержание GC), чтобы по существу предотвращать альтернативный сплайсинг альтернативного экзона при наличии соединения "лиганд/аптамер", а также предоставлять доступ к участку сплайсинга, если количество лиганд является недостаточным. В вариантах реализации изобретения стеблевая часть эффекторной области содержит последовательность стебля в дополнение к последовательности участка 5'ss 3'-интрона и его комплементарной последовательности. В вариантах реализации изобретения эта дополнительная последовательность стебля содержит последовательность из стебля аптамера. Длину и

последовательность стеблевой части можно модифицировать с помощью известных методов для идентификации стеблей, которые обеспечивают приемлемую фоновую экспрессию целевого гена, когда лиганд отсутствует, и приемлемые уровни экспрессии целевого гена, когда лиганд является в наличии (см., например, Примеры 4 и 5 и Фиг. 4с и 4d, 5a, 5b, 5c, 5d). Если стебель, например, слишком длинный, он может прикрывать доступ к последовательности участка 5' ss 3'-интрона при наличии или в отсутствие лиганда. Если длина стебля слишком короткая, может не сформироваться стабильный стебель, способный секвестрировать последовательность участка 5' ss 3'-интрона, и в этом случае альтернативный экзон будет подвергаться сплайсингу в матрицу целевого гена при наличии или в отсутствие лиганда. В одном варианте реализации изобретения общая длина стебля эффекторной области составляет от около 7 пар оснований до около 20 пар оснований. В некоторых вариантах реализации изобретения длина стебля составляет около от около 8 пар оснований до около 11 пар оснований. В некоторых вариантах реализации изобретения длина стебля составляет около от 8 пар оснований до 11 пар оснований. Кроме длины стебля, можно изменить содержание пар оснований GC с целью модификации стабильности стебля.

[0060] Аптамер/лиганд

[0061] В данном контексте термин "аптемер" относится к полинуклеотиду РНК, который специфически связывается с лигандом. Термин "лиганд" относится к молекуле, которая специфически связывается аптамером. В одном варианте реализации изобретения лиганд представляет собой молекулу с низким молекулярным весом (менее около 1000 Да), включающую, например, липиды, моносахариды, вторичные мессенджеры, другие природные продукты и метаболиты, нуклеиновые кислоты, а также, в большинстве случаев, терапевтические препараты. В одном варианте реализации изобретения лиганд представляет собой полинуклеотид с 2 или более основаниями нуклеотидов.

[0062] Аптамеры имеют связывающие области, которые способны образовывать комплексы с заданной целевой молекулой (т.е. лигандом). Специфичность связывания может быть определена по показателях сравнительных констант диссоциации (K_d) аптамера применительно к его лиганду по сравнению с константой диссоциации аптамера применительно к молекулам, не имеющим к нему отношения. Таким образом, лиганд представляет собой

молекулу, которая связывается с аптамером с большей аффинностью, чем с неродственным материалом. Как правило, K_d для аптамера по отношению к его лиганду будет по меньшей мере в около 10 раз меньше, чем K_d для аптамера по отношению к неродственным молекулам. В некоторых вариантах реализации изобретения K_d будет по меньшей мере в около 20 раз меньше, по меньшей мере в около 50 раз меньше, по меньшей мере в около 100 раз меньше, и по меньшей мере в около 200 раз меньше. Аптамер, как правило, будет содержать от около 15 до около 200 нуклеотидов в длину. Чаще всего аптамер будет содержать от около 30 до около 100 нуклеотидов в длину.

[0063] Аптамеры, которые можно включать в состав рибосвитча, могут быть аптамерами естественного происхождения или их модификациями, или аптамерами, которые были разработаны *de novo* или синтетическими скринированными посредством систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением (SELEX). Примеры аптамеров, которые связывают низкомолекулярные лиганды, включают, но не ограничиваются ими, теофиллин, допамин, сульфородамин-В, целлобиозу, канамицин А, ливидомицин, тобрамицин, неомицин В, виомицин, хлорамфеникол, стрептомицин, цитокины, молекулы клеточной поверхности и метаболиты. Для обзора аптамеров, распознающих малые молекулы, см., например, Famulok, Science 9:324-9 (1999) and McKeague, M. & DeRosa, M. C. J. Nuc. Aci. 2012. В другом варианте реализации изобретения аптамер представляет собой комплементарный полинуклеотид.

[0064] В одном варианте реализации изобретения аптамер предназначен для связывания конкретного низкомолекулярного лиганда. Способы конструирования аптамеров включают, например, SELEX. Способы конструирования аптамеров, которые избирательно связывают низкомолекулярные соединения с помощью SELEX, описаны, например, в патентах США №5475096, 5270163, и в работе Abdullah Ozer, et al. Nuc. Aci. 2014, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. Модификации процесса SELEX описаны в патентах США №5580737 и 5567588, которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

[0065] Методики отбора для идентификации аптамеров обычно включают подготовку большого пула молекул ДНК или РНК желаемой длины, которые содержат область, являющуюся рандомизированной или мутагенизированной. Например, пул олигонуклеотидов для отбора аптамеров может содержать область из 20-100

рандомизированных нуклеотидов, граничащих с областями определенной последовательности, которые составляют около 15-25 нуклеотидов в длину и пригодны для связывания праймеров для ПЦР. Пул олигонуклеотидов амплифицируют с помощью стандартных методов ПЦР или других способов, которые позволяют амплифицировать выбранные последовательности нуклеиновых кислот. Пул ДНК можно транскрибировать *in vitro*, чтобы получить пул транскриптов РНК, если необходим аптамер РНК. Затем пул олигонуклеотидов РНК или ДНК подвергают отбору, основанному на их способности специфически связываться с желаемым лигандом. Методики отбора включают, например, аффинную хроматографию, хотя можно применять любой протокол, с помощью которого можно выбрать нуклеиновые кислоты на основе их способности специфически связываться с другой молекулой. Методики отбора для идентификации аптамеров, которые связывают низкомолекулярные структуры и функционируют внутри клетки, могут включать методы скрининга клеток. В случае применения аффинной хроматографии олигонуклеотиды контактируют с целевым лигандом, который был иммобилизован на подложке в колонке или на магнитных частицах. Олигонуклеотид предпочитают выбирать для связывания лиганда при концентрациях соли, температурах и других условиях, которые имитируют нормальные физиологические условия. Олигонуклеотиды в пуле, которые связываются с лигандом, сохраняются на колонке или магнитных частицах, а несвязанные последовательности вымываются. Затем олигонуклеотиды, которые связывают лиганд, амплифицируют (после обратной транскрипции, если применяются транскрипты РНК) с помощью ПЦР (обычно после элюирования). Процесс отбора повторяют на выбранных последовательностях в течение в общей сложности от трех до десяти повторяющихся циклов процедуры отбора. Полученные олигонуклеотиды затем амплифицируют, клонируют и секвенируют с применением стандартных процедур для идентификации последовательностей олигонуклеотидов, которые способны связывать целевой лиганд. Сразу после идентификации последовательности аптамера, аптамер можно дополнительно оптимизировать путем осуществления дополнительных циклов отбора, начиная с пула олигонуклеотидов, содержащих мутагенизированную последовательность аптамера.

[0066] Скрининг аптамера *In vivo* можно применять после одного или более циклов отбора *in vitro* (например, SELEX). Например, в работе Barouch et al. (RNA. 2007, 13(4):614-622,

включенной в настоящий документ посредством ссылки) описана комбинация SELEX и дрожжевой трехгибридной системы для отбора аптамерain vivo.

[0067] **Альтернативный экзон**

[0068] Альтернативный экзон, который является частью полинуклеотидной кассеты для регулирования гена по данному изобретению, может представлять собой любую полинуклеотидную последовательность, которая может быть транскрибирована до пре-мРНК и альтернативно сплайсирована в мРНК целевого гена. Альтернативный экзон, который является частью кассеты для регулирования гена по данному изобретению, содержит по меньшей мере одну последовательность, которая ингибирует трансляцию, так что, когда альтернативный экзон включен в мРНК целевого гена, экспрессия целевого гена из этой мРНК предотвращается или снижается. В предпочтительном варианте реализации изобретения альтернативный экзон содержит стоп-кодон (TGA, TAA, TAG), который находится в рамке с целевым геном, когда альтернативный экзон включен в мРНК целевого гена с помощью сплайсинга. В вариантах реализации изобретения альтернативный экзон содержит в дополнение к стоп-кодону или в качестве альтернативы стоп-кодону другую последовательность, которая уменьшает или по существу предотвращает трансляцию, когда альтернативный экзон включен с помощью сплайсинга в мРНК целевого гена, включая, например, участок связывания микроРНК, который обуславливает расщепление мРНК. В одном варианте реализации изобретения альтернативный экзон содержит последовательность связывания микроРНК, которая приводит к расщеплению мРНК. В одном варианте реализации изобретения альтернативный экзон кодирует полипептидную последовательность, которая снижает стабильность белка, содержащего эту полипептидную последовательность. В одном варианте реализации изобретения альтернативный экзон кодирует полипептидную последовательность, которая направляет белок, содержащий эту полипептидную последовательность, для расщепления.

[0069] Исходный или фоновый уровень сплайсинга альтернативного экзона можно оптимизировать путем изменения последовательностей экзонного энхансера сплайсинга (ESE) и последовательностей экзонного супрессора сплайсинга (ESS) и/или путем введения последовательностей ESE или ESS в альтернативный экзон. Такие изменения в последовательности альтернативного

экзона могут быть выполнены с применением способов, известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, сайт-направленный мутагенез. В альтернативном варианте олигонуклеотиды желаемой последовательности (например, содержащие весь или часть альтернативного экзона) могут быть получены из коммерческих источников и клонированы в кассету регулирования генов. Идентификацию последовательностей ESS и ESE можно осуществить с помощью известных в данной области техники способов, включая, например, применение ESEfinder 3. 0 (Cartegni, L. et al. ESEfinder: веб-ресурс для идентификации экзонных энхансеров сплайсинга. *Nucleic Acid Research*, 2003, 31(13):3568-3571) и/или других доступных ресурсов.

[0070] В одном варианте реализации изобретения альтернативный экзон является экзогенным для целевого гена, хотя он может быть получен из последовательности, происходящей из организма, в котором будет экспрессирован целевой ген. В одном варианте реализации изобретения альтернативный экзон представляет собой синтетическую последовательность (см. Пример 10).

[0071] В одном варианте реализации изобретения альтернативный экзон является природным экзоном (см. Пример 10). В другом варианте реализации изобретения альтернативный экзон получают из всего или части известного экзона (см. Пример 10). В этом контексте термин "производный" относится к альтернативной последовательности, содержащей экзон, которая по существу гомологична экзону естественного происхождения или его части, но может содержать различные мутации, например, для введения стоп-кодона, который будет находиться в рамке с последовательностью целевого гена, или для введения или удаления экзонного энхансера сплайсинга и/или введения или удаления экзонного супрессора сплайсинга. В одном варианте реализации изобретения альтернативный экзон получают из экзона 2 гена дигидрофолатредуктазы человека (DHFR), экзона 5 мутантной опухоли Вильмса 1, дельта экзона 16 кальций/калмодулин-зависимой протеинкиназы II мышцы, или экзона 6 SIRT1.

[0072] **5'- и 3'-интронные последовательности**

[0073] Альтернативный экзон граничит из 5'- и 3'-интронными последовательностями. 5'- и 3'-интронные последовательности, которые могут применяться в кассете для регулирования гена по данному изобретению, могут представлять собой любую

последовательность, которая может быть сплайсирована из целевого гена, образуя при этом либо мРНК целевого гена, либо целевой ген, содержащий альтернативный экзон в мРНК, в зависимости от наличия или отсутствия лиганда, связывающегося с аптамером. Каждый из 5'- и 3'-интронов имеет последовательности, необходимые для осуществления процесса сплайсинга, например, последовательности донора сплайсинга, акцептора сплайсинга и последовательности точек разветвления. В одном варианте реализации изобретения 5'- и 3'-интронные последовательности кассеты для регулирования гена получают из одного или более интронов естественного происхождения или их части. В одном варианте реализации изобретения 5'- и 3'-интронные последовательности получают из укороченного интрона 2 бета-глобина человека (IVS2 Δ). В других вариантах реализации изобретения 5'- и 3'-интронные последовательности получают из интрона мРНК SV40 (применяемого в векторе pCMV-LacZ от компании Clonetech), интрона 6 гена триозофосфатизомеразы человека (TPI) (Nott Ajit, et al. RNA. 2003, 9:6070617) или интрона из фактора IX человека (Sumiko Kurachi et al. J. Bio. Chem. 1995, 270 (10), 5276), собственного эндогенного интрона целевого гена или любого геномного фрагмента или синтетических интронов (Yi Lai, et al. Hum Gene Ther. 2006:17(10):1036), которые содержат элементы, необходимые для регулируемого сплайсинга (Thomas A. Cooper, Methods 2005 (37):331).

[0074] В одном варианте реализации изобретения альтернативный экзон и рибосвитч по данному изобретению сконструированы таким образом, чтобы содержаться в эндогенном интроне целевого гена. Это означает, что интрон (или по существу подобная интронная последовательность) встречается в естественных условиях в этом положении целевого гена. В этом случае интронная последовательность непосредственно перед альтернативным экзоном называется 5'-интронной последовательностью или последовательностью 5'-интрона, а интронная последовательность непосредственно после альтернативного экзона называется 3'-интронной последовательностью или последовательностью 3'-интрона. В этом случае эндогенный интрон модифицируют таким образом, чтобы он содержал последовательность акцептора сплайсинга и последовательность донора донора, граничащими с 5'- и 3'-концами альтернативного экзона.

[0075] Участки донора сплайсинга и акцептора сплайсинга в кассете регулирования гена по данному изобретению могут быть модифицированы с целью усиления или ослабления их функций. Это означает, что участки сплайсинга можно модифицировать таким образом, чтобы они были более подобны с консенсусной последовательностью донора или акцептора сплайсинга, применяя с этой целью стандартные методики клонирования, сайт-направленный мутагенез и тому подобное. Участки сплайсинга, которые в большей степени подобны с консенсусной последовательностью донора или акцептора сплайсинга, как правило, способствуют процессу сплайсинга и, таким образом, укрепляются. Участки сплайсинга, которые в меньшей степени подобны с консенсусной последовательностью донора или акцептора сплайсинга, как правило, тормозят процесс сплайсинга и, таким образом, ослабевают. Консенсусной последовательностью для донора сплайсинга наиболее распространенного класса интронов (U2) является A/C A G || G T A/G A G T (где || обозначает границу экзона/интрона). Консенсусной последовательностью для акцептора сплайсинга является C A G || G (где || обозначает границу экзона/интрона). Частота конкретных нуклеотидов на участках донора сплайсинга и акцептора сплайсинга известна в данной области техники (см., например., Zhang, M. Q., Hum Mol Genet. 1988. 7(5):919-932). Силу 5' ss- и 3'-участков сплайсинга можно скорректировать с целью модулирования сплайсинга альтернативного экзона.

[0076] Дополнительные модификации 5'- и 3'-интронов в кассете для регулирования гена можно осуществить с целью модулирования сплайсинга, включая модификацию, удаление и/или добавление элементов интронного энхансера сплайсинга и/или элементов интронного супрессора сплайсинга и/или модификацию последовательности участка разветвления.

[0077] В одном варианте реализации изобретения 5'-интрон модифицирован с той целью, чтобы содержать стоп-кодон, который будет находиться в рамке с целевым геном. 5'- и 3'-интронные последовательности также можно модифицировать с целью удаления криптоических участков сплайсинга, которые можно идентифицировать с помощью общедоступного программного обеспечения (см., например, Kapustin, Y. et al. Nucl. Acids Res. 2011. 1-8). Длину 5'- и 3'-интронных последовательностей можно отрегулировать, с целью, например, соответствия требованиям к размерам для

конструкций вирусной экспрессии. В одном варианте реализации изобретения 5'- и 3'-интронные последовательности, каждая независимо, содержат от около 50 до около 300 нуклеотидов в длину. В одном варианте реализации изобретения 5'- и 3'-интронные последовательности, каждая независимо, содержат от около 125 до около 240 нуклеотидов в длину.

[0078] **Целевые гены**

[0079] Кассета для регулирования гена по данному изобретению представляет собой платформу, которую можно применять для регулирования экспрессии любого целевого гена, который может быть экспрессирован в целевой клетке, ткани или организме. Термин "целевой ген" относится к полинуклеотиду, который вводится в клетку и способен транскрибироваться в РНК и транслироваться и/или экспрессироваться в соответствующих условиях. В альтернативном варианте, целевой ген является эндогенным по отношению к целевой клетке, а кассета для регулирования гена по данному изобретению помещается в целевой ген (например, в существующий интрон эндогенного целевого гена). Примером целевого гена является полинуклеотид, кодирующий терапевтический полипептид. В одном варианте реализации изобретения, когда целевой ген экспрессируется с применением кассеты для регулирования гена по данному изобретению, целевой ген не экспрессируется в виде химерного белка, содержащего альтернативный экзон. Включение альтернативного экзона сводит к минимуму трансляцию мРНК, например, вызывая расщепление матрицы, содержащей альтернативный экзон, или иным образом предотвращает экспрессию функционального целевого гена, посредством, например, его преждевременного усечения. В одном варианте реализации изобретения целевой ген является экзогенным для клетки, в которой будет транскрибироваться конструкция рекомбинантной ДНК. В другом варианте реализации изобретения целевой ген является эндогенным для клетки, в которой будет транскрибироваться конструкция рекомбинантной ДНК. В одном варианте реализации изобретения альтернативный экзон может содержать стоп-кодон в рамке с кодирующей последовательностью целевого гена. В других вариантах реализации изобретения альтернативный экзон может содержать другие последовательности, которые приводят к расщеплению транскрипта и/или блокированию трансляции целевого гена.

[0080] Целевой ген по данному изобретению может

представлять собой ген, кодирующий белок, или последовательность, кодирующую РНК, не кодирующую белок. Целевым геном может быть, например, ген, кодирующий структурный белок, фермент, белок сигнальной системы клетки, митохондриальный белок, белок "цинковый пальцы", гормон, транспортный белок, фактор роста, цитокин, внутриклеточный белок, внеклеточный белок, трансмембранный белок, цитоплазматический белок, ядерный белок, рецепторную молекулу, РНК-связывающий белок, ДНК-связывающий белок, транскрипционный фактор, трансляционный элемент, канальный белок, моторный белок, молекулу адгезии клеток, митохондриальный белок, метаболический фермент, киназу, фосфатазу, факторы обмена, шапероновый белок и модуляторы любого из вышеперечисленных веществ. В вариантах реализации изобретения целевой ген кодирует эритропоэтин (Ер), гормон роста человека (hGH), эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN), инсулин человека, ассоциированный с CRISPR белок 9 (cas9) или иммуноглобулин (или его часть), включая, например, терапевтическое антитело.

[0081] **Конструкции экспрессии**

[0082] В данном изобретении рассматривается применение рекомбинантного вектора для введения в целевые клетки полинуклеотида, кодирующего целевой ген, и содержащего кассету для регулирования гена по данному изобретению. Во многих вариантах реализации изобретения конструкция рекомбинантной ДНК по данному изобретению включает дополнительные элементы ДНК, включая сегменты ДНК, которые обеспечивают репликацию ДНК в клетке-хозяине и экспрессию целевого гена в этой клетке на соответствующих уровнях. Обычному квалифицированному специалисту в данной области техники известно, что последовательности регулирования экспрессии (промоторы, энхансеры и т. п.) выбирают исходя из их способности стимулировать экспрессию целевого гена в целевой клетке. Термин "вектор" означает рекомбинантную плазмиду, дрожжевую искусственную хромосому (YAC), мини-хромосому, мини-кольцо ДНК или вирус (включая последовательности, полученные из вирусов), которые включают полинуклеотид, который должен быть доставлен в клетку-хозяин, либо *in vitro* либо *in vivo*. В одном варианте реализации изобретения рекомбинантный вектор представляет собой вирусный вектор или комбинацию множества вирусных векторов.

[0083] Вирусные векторы для экспрессии целевого гена в

целевой клетке, ткани или организме известны в данной области техники и включают векторы аденовируса (AV), аденоассоциированного вируса (AAV), ретровируса, лентивируса и вируса простого герпеса 1 типа (HSV1).

[0084] Аденовирусные векторы включают, например, векторы на основе аденовируса человека 2 типа и аденовируса человека 5 типа, характеризующиеся дефективной репликацией из-за делеций в областях E1 и E3. Транскрипционная кассета может быть вставлена в область E1, в результате чего получают рекомбинантный AV-вектор с E1/E3-делецией. Аденовирусные векторы также включают хелпер-зависимые высокоэффективные аденовирусные векторы (также известные как высокоэффективные, "выпотрошенные" или "опустошенные" векторы), которые не содержат вирусных кодирующих последовательностей. Эти векторы содержат цис-активные элементы, необходимые для репликации и упаковки вирусной ДНК, в основном последовательности инвертированного концевой повтора (ITR) и сигнал упаковки (Ψ). Эти хелпер-зависимые геномы AV-векторов могут переносить от нескольких сотен пар оснований до около 36 т. п.о. чужеродной ДНК.

[0085] Рекомбинантные векторы аденоассоциированного вируса "rAAV" включают любой вектор, полученный из любого серотипа аденоассоциированного вируса, включая, без ограничения, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-7 и AAV-8, AAV-9, AAV-10 и т. п. rAAV-векторы могут иметь один или более генов дикого типа AAV, удаленных полностью или частично, предпочтительно генов Rep и/или Cap, но которые при этом сохраняют функциональные фланкирующие последовательности ITR. Функциональные последовательности ITR сохраняются для освобождения, репликации, упаковки и возможной хромосомной интеграции генома AAV. Последовательности ITR не обязательно должны быть нуклеотидными последовательностями дикого типа и могут быть изменены (например, путем вставки, делеции или замещения нуклеотидов), при условии, что последовательности обеспечивают функциональное облегчение, репликацию и упаковку.

[0086] В альтернативных вариантах реализации изобретения можно применять другие системы, такие как лентивирусные векторы. Системы на основе лентивирусов, могут трансдуцировать неделящиеся, а также делящиеся клетки, что делает их пригодными для целевых применений, например, неделящиеся клетки ЦНС. Лентивирусные векторы получают из вируса иммунодефицита

человека; при этом векторы, подобно вирусу иммунодефицита человека, интегрируются в геном хозяина, обеспечивая возможность очень долговременной экспрессии генов.

[0087] Полинуклеотиды, включая плазмиды, YAC, минихромосомы и мини-кольца, несущие целевой ген, содержащий кассету для регулирования гена, также можно вводить в клетку или в организм с помощью невирусных векторных систем, посредством, например, катионных липидов, полимеров или и тех и других носителей. Конъюгированные поли-L-лизиновые (PLL) и полиэтилениминовые (PEI) полимерные системы также можно применять для доставки вектора в клетки. Другие способы доставки вектора в клетки включают гидродинамическую инъекцию и электропорацию и применение ультразвука как для клеточной культуры, так и для организмов. Для обзора вирусных и невирусных систем доставки для доставки генов см. работу Nayerossadat, N. et al. (Adv Biomed Res. 2012; 1:27), включенную в настоящую заявку посредством ссылки.

[0088] Способы модулирования экспрессии целевого гена

[0089] В одном аспекте данного изобретения предлагается способ модулирования экспрессии целевого гена (например, терапевтического гена), включающий (a) вставку кассеты для регулирования гена по данному изобретению в целевой ген, (b) введение целевого гена, содержащего кассету для регулирования гена, в клетку, и (c) воздействие на клетку лигандом, который связывается с аптамером. В одном варианте реализации изобретения лиганд представляет собой низкомолекулярное соединение. В аспектах изобретения экспрессия целевого гена в целевых клетках придает желаемое свойство клетке, в которую ген был введен, или иным образом приводит к желаемому терапевтическому результату.

[0090] В предпочтительном варианте реализации изобретения кассету для регулирования гена вводят в кодирующую белок последовательность целевого гена (а не в 5'- или 3'-нетранслируемые области). В одном варианте реализации изобретения в целевой ген вводят одну кассету для регулирования гена. В других вариантах реализации изобретения в целевой ген вводят 2, 3, 4 или более кассет для регулирования гена. В одном варианте реализации изобретения в целевой ген вводят две кассеты для регулирования гена. Если в целевой ген вводят множество кассет для регулирования гена, каждая из них может содержать один и тот же аптамер, вследствие чего один лиганд можно

применять для модулирования альтернативного сплайсинга на множестве кассет и, тем самым, модулировать экспрессию целевого гена. В других вариантах реализации изобретения в целевой ген вводят множество кассет для регулирования гена, при этом каждая из кассет может содержать отличающийся аптамер, вследствие чего посредством воздействия множества различных низкомолекулярных лигандов модулируется экспрессия целевого гена. В других вариантах реализации изобретения в целевой ген вводят множество кассет для регулирования гена, при этом каждая из кассет содержит последовательности 5'-интрона, альтернативного экзона и 3'-интрона. Это может быть полезно для снижения рекомбинации и улучшения удобства включения в вирусные векторы.

[0091] Способы лечения и фармацевтические композиции

[0092] В одном аспекте данного изобретения предлагается способ регулирования уровня терапевтического белка, применяемого в рамках генной терапии. В этом варианте реализации изобретения "целевой ген" может кодировать терапевтический белок. "Целевой ген" может кодировать белок, который является эндогенным или экзогенным для клетки.

[0093] Последовательность терапевтического гена, содержащая регуляторную кассету с рибосвитчем, приводимым в действие аптамером, доставляется в целевые клетки в организме, например, с помощью вектора. Специфичность клеток "целевого гена" можно контролировать с помощью промотора или других элементов внутри вектора. Первым этапом получения терапевтического белка является доставка векторной конструкции, содержащей целевой ген, и трансфекция целевых тканей, приводящая к устойчивой трансфекции регулируемого целевого гена.

[0094] Однако из-за наличия регуляторной кассеты в последовательности целевого гена, существенных уровней экспрессии целевого гена не наблюдается, то есть ген находится в "выключенном состоянии" в отсутствие специфического лиганда, который связывается с аптамером, содержащимся в рибосвитче регуляторной кассеты. Экспрессия целевого гена активируется только тогда, когда вводят лиганд, являющийся специфическим к аптамеру.

[0095] Доставку векторной конструкции, содержащей целевой ген, и доставку активирующего лиганда, как правило, разделяют во времени. Посредством доставки активирующего лиганда можно будет контролировать периоды экспрессии целевого гена, а также уровни

экспрессии белка. Лиганд можно вводить с помощью нескольких путей введения, включая, но не ограничиваясь ими, пероральный, внутримышечный (в/м), внутривенный (в/в), внутриглазной или топический.

[0096] Выбор времени для введения лиганда будет зависеть от необходимости активации целевого гена. Например, если терапевтический белок, кодируемый целевым геном, требуется постоянно, пероральный низкомолекулярный лиганд можно вводить ежедневно или несколько раз в день для обеспечения непрерывной активации целевого гена и, соответственно, непрерывной экспрессии терапевтического белка. Если целевой ген обладает эффектом длительного действия, индуцирующий лиганд можно вводить с меньшей частотой.

[0097] Данное изобретение позволяет регулировать экспрессию терапевтического трансгена во времени посредством способа, определяемого временными интервалами введения лиганда, специфичного для аптамера, в регуляторной кассете. Экспрессия терапевтического трансгена только при введении лиганда повышает безопасность лечения с применением генной терапии, обеспечивая возможность целевому гену "отключиться" в отсутствие лиганда.

[0098] С целью обеспечения возможности различным лигандам активировать целевые гены можно применять различные аптамеры. В некоторых вариантах реализации изобретения каждый терапевтический ген, содержащий регуляторную кассету, будет иметь специфический аптамер в кассете, который будет активироваться специфическим низкомолекулярным веществом. Это означает, что каждый терапевтический ген может быть активирован только лигандом, специфичным для аптамера, размещенного внутри него. В этих вариантах реализации изобретения каждый лиганд активирует только один терапевтический ген. Это допускает возможность того, что несколько разных целевых генов могут быть введены одному человеку, и каждый из них будет активироваться при введении специфического лиганда для аптамера, содержащегося в регуляторной кассете, размещенной в каждом целевом гене.

[0099] Данное изобретение позволяет любому терапевтическому белку, ген которого может быть введен в организм (например, эритропоэтину (ЕРО) или терапевтическому антителу), продуцироваться в организме при введении активирующего лиганда. Этот способ доставки терапевтического белка может заменить изготовление таких терапевтических белков вне организма, которые

затем вводят путем инъекции или инфузии, например, антител, применяемых в лечении рака, или антител, которые останавливают развитие воспалительного или аутоиммунного заболевания. Организм, содержащий регулируемый целевой ген, становится "фабрикой по изготовлению биологических препаратов", которая начинает работать тогда, когда вводят лиганд, специфический для гена.

[00100] Уровни доз и временные характеристики введения терапевтического белка могут иметь решающее значение для терапевтического эффекта. Например, при введении препарата АВАСТИН® (антитело анти-VEGF) при лечении рака. Данное изобретение повышает простоту подбора схемы введения в ответ на мониторинг уровней и эффектов терапевтического белка.

[00101] В одном варианте реализации изобретения целевой белок может представлять собой нуклеазу, которая может нацеливаться на конкретную последовательность ДНК и редактировать ее. Такие нуклеазы включают Cas9, нуклеазы, содержащие "цинковые пальцы", или TALEN. В случае с этими нуклеазами, нуклеазный белок может потребоваться в течение всего лишь короткого периода времени, достаточного для редактирования целевых эндогенных генов. Однако, если нерегулируемый ген нуклеазы вводят в организм, нуклеазный белок может присутствовать в клетке на протяжении всей ее жизни. В случае с нуклеазами, риск редактирования вне целевого фрагмента возрастает параллельно с продлением периода существования нуклеазы в клетке. Регулирование экспрессии таких белков имеет значительное преимущество в плане безопасности. В этом случае вектор, содержащий целевой ген нуклеазы, содержащий регуляторную кассету, может быть введен в соответствующие клетки организма. В отсутствие лиганда, специфического для кассеты, целевой ген находится в "выключенном состоянии" поэтому нуклеаза не образуется. Нуклеаза образуется только тогда, когда вводят активирующий лиганд. По истечению достаточного времени для надлежащего редактирования, лиганд извлекают и повторно не вводят. Таким образом, ген нуклеазы после этого находится в "выключенном состоянии", дополнительной нуклеазы не образуется и редактирование прекращается. Этот принцип можно применять для коррекции генетических патологических состояний, включая ряд унаследованных ретинопатий, таких как врожденный амавроз Лебера 10 типа (LCA10), обусловленный мутациями в SERP290, и болезнь

Штаргардта, обусловленная мутациями в АВСА4.

[00102] Введение регулируемого целевого гена, кодирующего терапевтический белок, который активируется только при введении специфического лиганда, может применяться для регулирования терапевтических генов при лечении множества различных заболеваний, например, рака с применением терапевтических антител, иммунных нарушений с применением иммуномодулирующих белков или антител, метаболических заболеваний, редких заболеваний, таких как пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH) с применением антител анти-С5 или фрагментов антител в качестве регулируемого гена, или при лечении нарушений глазного ангиогенеза с применением терапевтических антител, и сухой возрастной дегенерации макулы (AMD) с применением иммуномодулирующих белков.

[00103] Для применения в данном изобретении пригодны большое количество специфических целевых генов, назначаемых в лечении широкого спектра специфических заболеваний и патологических состояний. Например, инсулин или аналог инсулина (предпочтительно инсулин человека или аналог инсулина человека) можно применять в качестве целевого гена для лечения диабета I типа, диабета II типа или метаболического синдрома; гормон роста человека можно применять в качестве целевого гена для лечения детей из задержкой роста или взрослых с недостаточностью гормона роста; эритропоэтин (предпочтительно эритропоэтин человека) можно применять в качестве целевого гена для лечения анемии при хроническом заболевании почек, анемии при миелодисплазии или анемии при проведении химиотерапии рака.

[00104] Данное изобретение может быть особенно пригодным при лечении заболеваний, обусловленных дефектами одного гена, таких как кистозный фиброз, гемофилия, мышечная дистрофия, талассемия или серповидноклеточная анемия. Таким образом, β -, γ -, δ - или ζ -глобин человека может применяться в качестве целевого гена для лечения β -талассемии или серповидноклеточной анемии; фактор VIII или фактор IX человека может применяться в качестве целевого гена для лечения гемофилии А или гемофилии В.

[00105] Лиганды, применяемые в данном изобретении, обычно комбинируют с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями для образования фармацевтических композиций, пригодных для введения пациенту. Фармацевтически приемлемые носители включают растворители, связующие вещества, разбавители,

разрыхлители, смазывающие вещества, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты, агенты, задерживающие абсорбцию, и тому подобные вещества, обычно применяемые в фармацевтике. Фармацевтические композиции могут быть в форме таблеток, пилюль, капсул, пастилок и тому подобное, и составлены так, чтобы быть совместимыми с предполагаемым путями их введения. Примеры путей введения включают парентеральный, например, внутривенный, внутрикожный, интраназальный, подкожный, пероральный, ингаляционный, трансдермальный (топический), трансмукозальный и ректальный пути.

[00106] Фармацевтические композиции, содержащие лиганды, вводят пациенту согласно схеме применения, обеспечивающей получение пациентом количества лиганда, достаточного для желаемого регулирования целевого гена. Если лиганд представляет собой низкомолекулярную структуру, а лекарственная форма представляет собой таблетку, пилюлю или тому подобное, предпочтительно фармацевтическая композиция содержит от 0,1 мг до 10 г лиганда; от 0,5 мг до 5 г лиганда; от 1 мг до 1 г лиганда; от 2 мг до 750 мг лиганда; от 5 мг до 500 мг лиганда; или от 10 мг до 250 мг лиганда.

[00107] Фармацевтические композиции можно вводить один раз в сутки или несколько раз в сутки (например, 2, 3, 4, 5 или более раз в сутки). В альтернативном варианте фармацевтические композиции можно вводить реже, чем один раз в сутки, например, один раз каждые 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 дней или один раз в месяц или один раз в несколько месяцев. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции можно вводить пациенту только небольшое количество раз, например один, два, три раза и т. д.

[00108] В данном изобретении предлагается способ лечения пациента, имеющего показания для повышения экспрессии терапевтического белка, кодируемого целевым геном, при этом способ включает введение пациенту фармацевтической композиции, содержащей лиганд для аптамера, причем пациент ранее получал рекомбинантную ДНК, содержащую целевой ген, при этом целевой ген содержит кассету для регулирования гена по данному изобретению, которая обеспечивает возможность регулировать экспрессию целевого гена посредством аптамер/лиганд-опосредованного альтернативного сплайсинга пре-мРНК целевого гена, тем самым

повышая уровень экспрессии терапевтического белка.

[00109] **Готовые изделия и наборы.**

[00110] В данном изобретении также предлагаются наборы или готовые изделия для применения согласно описанным способам. В аспектах данного изобретения наборы включают композиции, описанные в данном документе (например, композиции для доставки вектора, содержащего целевой ген, который в свою очередь содержит кассету для регулирования гена), в пригодной упаковке. Пригодная упаковка для композиций (таких как композиции для инъекций в глаз), описанные в данном документе, известны в данной области техники и включают, например, флаконы (например, герметичные флаконы), сосуды, ампулы, бутылки, банки, гибкую упаковку (например, герметичные пакеты из пленки Майлар или пластиковые пакеты) и тому подобное. Эти готовые изделия могут быть дополнительно стерилизованы и/или герметизированы.

[00111] В данном изобретении также предлагаются наборы, содержащие композиции, описанные в данном документе, и могут дополнительно содержать инструкцию(и) по способам применения композиции, таких как применение, описанное в данном документе. Наборы, описанные в данном документе, могут дополнительно включать другие материалы, желательные с коммерческой и потребительской точек зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и листки-вкладыши в упаковку с инструкциями относительно введения, включая, например, любые способы, описанные в данном документе. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения указанный набор содержит rAAV для экспрессии целевого гена, содержащего кассету для регулирования гена по данному изобретению, фармацевтически приемлемый носитель, пригодный для инъекций, и один или более из элементов:буфер, разбавитель, фильтр, иглу, шприц и листок-вкладыш в упаковку с инструкциями относительно выполнения инъекций. В некоторых вариантах реализации изобретения набор пригоден для внутриглазной инъекции, внутримышечной инъекции, внутривенной инъекции и тому подобное.

[00112] В данном контексте термины "гомология" и "гомологичный" относятся к проценту идентичности между двумя полинуклеотидными последовательностями или между двумя полипептидными последовательностями. Соответствие между двумя последовательностями можно определить с помощью способов, известных в данной области техники. Например, степень гомологии

можно определить путем прямого сравнения двух полипептидных молекул при выравнивании информации последовательности с применением общедоступных компьютерных программ. В альтернативном варианте степень гомологии можно определить путем гибридизации полинуклеотидов в условиях, которые образуют стабильные дуплексы между гомологичными областями, с последующим расщеплением одноцепочечной специфической нуклеазой (ами) и определением размера расщепленных фрагментов. Две полинуклеотидные или две полипептидные последовательности являются "по существу гомологичными" одна с другой, если после оптимального выравнивания с соответствующими вставками или делециями по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90% и по меньшей мере около 95% нуклеотидов или аминокислот, соответственно, совпадают по длине молекул, что определяется с помощью вышеописанных способов.

[00113] "Процент идентичности последовательности" по отношению к эталонной последовательности полипептидов или нуклеиновых кислот определяется как процентное содержание аминокислотных остатков или нуклеотидов в кандидатной последовательности, идентичных аминокислотным остаткам или нуклеотидам в эталонной последовательности полипептидов или нуклеиновых кислот после выравнивания последовательностей и, при необходимости, введения разрывов с целью достижения максимальной процентной идентичности последовательности. Выравнивание для целей определения процентной идентичности последовательностей аминокислот или нуклеиновых кислот можно осуществить различными способами, известными специалистам в данной области техники, например, используя общедоступное компьютерное программное обеспечение, включая программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR).

[00114] В данном контексте термин "полинуклеотид" или "нуклеиновая кислота" относится к полимерной форме нуклеотидов любой длины, либо рибонуклеотидов, либо дезоксирибонуклеотидов. Таким образом, этот термин включает, но не ограничиваясь этим, одно-, двух- или многоцепочечную ДНК или РНК, геномную ДНК, кДНК, гибриды ДНК-РНК или полимер, содержащий пуриновые и пиримидиновые основания, или другие природные, химически или биохимически модифицированные, неприродные или дериватизированные нуклеотидные основания.

[00115] Термин "гетерологичный" или "экзогенный" описывает

объект, полученный из объекта, генотипически отличного от остальной части объекта, с которой объект сравнивают или в которую объект вводят или включают. Например, полинуклеотид, вводимый с помощью методов генной инженерии в другой тип клеток, является гетерологичным полинуклеотидом (и, если он экспрессируется, может кодировать гетерологичный полипептид). Аналогичным образом, клеточная последовательность (например, ген или его часть), которая включена в вирусный вектор, является гетерологичной нуклеотидной последовательностью по отношению к вектору.

[00116] Необходимо понимать и ожидать, что специалисты в данной области техники могут осуществить изменения в принципах изобретения, описанных в данном документе, при этом предполагается, что такие изменения должны быть включены в объем данного изобретения. Следующие Примеры дополнительно иллюстрируют изобретение, и не должны рассматриваться как ограничивающие объем данного изобретения каким-либо образом. Все источники, цитируемые в данном документе, включены в данный документ в полном объеме посредством ссылок.

ПРИМЕРЫ

[00117] **ПРИМЕР 1. Влияние силы участка сплайсинга на экспрессию регулируемых генов**

[00118] **Экспериментальные методики**

[00119] *Конструкции плазмид:Luci-BsaI-акцептор:Фрагмент ДНК, содержащий промотор CMV, высвобождали из вектора PVG-CMV-eGFP-W (Гарвардский университет) с помощью рестрикционных ферментов SpeI и NotI, и клонировали этот фрагмент в вектор pHDM-G (Гарвардский университет), расщепленный с помощью ферментов SpeI и NotI. Фрагмент, содержащий последовательность SV40 Ori в полученном векторе, удаляли путем расщепления с помощью ферментов BsmI и BstXI, удаляя 3'-нависающий конец и лигируя. Последующий вектор подвергали сайт-направленному мутагенезу (Agilent) для удаления участка BsaI в гене AmpR. Полученный вектор затем расщепляли с помощью ферментов NotI и BamHI и лигировали с фрагментом, содержащим участки NotI-BsaI-BamHI, для получения конечного Luci-BsaI-акцепторного вектора. pHDM-G применяли в качестве матрицы для интрона 2 бета-глобина человека ("IVS2Δ"), содержащего делецию средней части, не являющейся основной для сплайсинга (см. Таблицу 5, SEQ ID NO1). pGL3-промотор (Promega) применяли в качестве матрицы для гена*

люциферазы светлячков. Конструкция 8: Ген люциферазы амплифицировали с помощью ПЦР с применением праймеров Luc-For-BsaI и Luci-Rev-BsaI. Продукты ПЦР-расщепляли с помощью BsaI и клонировали в BsaI-расщепленный Luci-BsaI-акцепторный вектор. Конструкции сплайсинга 1-7 (Con 1-7, SEQ ID NO. 1-7), экспрессирующие ген люциферазы, вставленный в интрон IVS2Δ, который имеет разные участки 5' ss и 3' ss на каждом конце интронной последовательности, получали путем лигирования 3 BsaI-расщепленных продуктов ПЦР с BsaI-расщепленным Luci-BsaI-акцептором. рGL3-промоторный вектор применяли в качестве матрицы люциферазы, а pHDM-G применяли в качестве матрицы для IVS2Δ. Праймерные пары, применяемые для амплификации фрагментов ПЦР для Con 1-7, были следующими: Con 1: Luci-For-BsaI/Luci-Splice-Rev_1, IVS2-BsaI-For/IVS2-BsaI-Rev_1 и Luci-Splice-For_1/Luci-Rev-BsaI; Con 2: Luci-For-BsaI/Luci-Splice-Rev_2, IVS2-BsaI-For/IVS2-BsaI-Rev_2, и Luci-Splice-For_2/Luci-Rev-BsaI; Con 3: Luci-For-BsaI/Luci-Splice-Rev_3, IVS2-BsaI-For/IVS2-BsaI-Rev_3, и Luci-Splice-For_3/Luci-Rev-BsaI; Con 4: Luci-For-BsaI/Luci-Splice-Rev_4, IVS2-BsaI-For/IVS2-BsaI-Rev_1, и Luci-Splice-For_4/Luci-Rev-BsaI; Con 5: Luci-For-BsaI/Luci-Splice-Rev_1, IVS2-BsaI-For/IVS2-BsaI-Rev_1 и Luci-Splice-For_5/Luci-Rev-BsaI; Con 6: Luci-For-BsaI/Luci-Splice-Rev_1, IVS2-BsaI-For/IVS2-BsaI-Rev_1 и Luci-Splice-For61/Luci-Rev-BsaI; Con 7: Luci-For-BsaI/Luci-Splice-Rev_1, IVS2-BsaI-For/IVS2-BsaI-Rev_1 и Luci-Splice-For71/Luci-Rev-BsaI. Все конструкции были проверены секвенированием ДНК.

Таблица 1. Участки сплайсинга у конструкциях сплайсинга (Con 1-7). Границы интрона/экзона отмечены ||.

Конструкция	5'-участок сплайсинга	3'-участок сплайсинга
Con 1	AGG GTGAGT	TCTTATCTTCCTCCCACAG C
Con 2	AAA GTAAGC	TCTTATCTTCCTCCCACAG C
Con 3	GCA GTAAGT	TCTTATCTTCCTCCCACAG C
Con 4	GAG GTGTGG	TCTTATCTTCCTCCCACAG C
Con 5	AGG GTGAGT	CTTTACTTCTATGACTGTAG C
Con 6	AGG GTGAGT	GTGACTGTGTGTATGCACAG C
Con 7	AGG GTGAGT	ATTGTGATCGCAGCCAATAG C

[00120] Трансфицирование: Клетки НЕК 293 в количестве 3,5 x10⁴ высевали на 96-луночный планшет с плоским дном лунок за день до трансфицирования. Плазмидную ДНК (500 нг) добавляли в

пробирку или на 96-луночный планшет с U-подобным дном лунок. Отдельно добавляли реагент TransIT-293 (Mirus, 1,4 мкл) в 50 мкл среды Opti-mem I (Life Technologies) и оставляли на 5 минут при комнатной температуре (КТ). Затем 50 мкл этого разбавленного трансфекционного реагента добавляли к ДНК, перемешивали и инкубировали при комнатной температуре ("КТ") в течение 20 мин. Наконец, 7 мкл этого раствора добавляли в лунку к клеткам в 96-луночном планшете.

[00121] *Анализ культивируемых клеток с применением люциферазы светлячков:* Через 24 часа после замены среды планшеты извлекали из инкубатора и уравнивали до КТ в течение нескольких минут на лабораторном столе, а затем аспирировали. Добавляли буфер Glo-lysis (Promega, 100 мкл, КТ), и оставляли планшеты при КТ в течение по меньшей мере 5 минут. Затем содержимое лунки смешивали с 50 мкл путем измельчения до порошкообразного состояния и 20 мкл каждого образца смешивали с 20 мкл реагента bright-glo (Promega), который разбавляли до 10% в буфере glo-lysis. 96 лунок размещали на непрозрачном белом 384-луночном планшете. После 5-минутной инкубации при КТ измеряли уровень люминесценции с помощью устройства Tecan с временем считывания 500 мсек. Активность люциферазы выражали как среднюю относительная световая единица (RLU) $\pm$ С. О.

[00122] Результаты

[00123] Чтобы сконструировать платформу для регулирования гена на основе сплайсинга, мы сначала проанализировали (i) эффект вставки интрона в кодирующую последовательность (CDS) представляющего интерес гена, в этом случае гена люциферазы светлячков (Фиг. 1a) и (ii) эффекты различных участков 5' ss и 3' ss на экспрессию генов. С целью оценки эффективности сплайсинга усеченный интрон 2 бета-глобина человека (IVS2 Δ) с различными участками 5' ss и 3' ss на каждом конце вставляли в кодирующую последовательность гена люциферазы светлячков. Конструкция Con 8 не содержит интрона IVS2 Δ , а Con 1 (SEQ ID NO1) имеет IVS2 Δ с его исходными последовательностями IVS2 5' и 3' ss. Конструкции от Con 2 до Con 7 (SEQ ID No.:2-7) имеют IVS2 Δ с различными последовательностями 5' и 3' ss, перечисленными в Таблице 1. Как проиллюстрировано на Фиг. 1b, вставка IVS2 Δ с нативными участками сплайсинга IVS2 в ген люциферазы не влияла на экспрессию гена (сравните Con 1 и Con 8). Однако замена участков сплайсинга IVS2 в IVS2 Δ последовательностями участков

сплайсинга, имеющих различную силу, значительно снижала экспрессию люциферазы. Как проиллюстрировано на Фиг. 1b, Con 2 и Con 3 с измененными участками 5' ss имеют уровни экспрессии, аналогичные уровням Con 1 и Con 8, однако изменения 5' ss в Con 4 и изменения 3' ss в конструкциях от Con 5 до Con 7 значительно снижали экспрессию люциферазы (сравните конструкции от Con 4 до Con 7 с конструкцией Con 8). Таким образом, различия в участках сплайсинга влияют на экспрессию целевого гена. Con 1 применяли для дальнейшего изучения.

[00124] **ПРИМЕР 2. Кассета "интрон-экзон-интрон" и влияние цис-элементов на сплайсинг при модулирующей экспрессии целевого гена.**

[00125] Экспериментальные методики

[00126] Предполагаемые последовательности экзонного энхансера сплайсинга (ESE) были спрогнозированы с помощью ESEfinder 3.0. Синтезировали (IDT) экзон 2 человеческой дигидрофолатредуктазы (DHFR) дикого типа с интронными фланкирующими последовательностями либо с нативным 5' ss (DHFR-wt; (Таблица 2); SEQ ID NO47), либо с нативным 5' ss с четырьмя нуклеотидами, мутированными до C (DHFR-wt5ssC (Таблица 2); SEQ ID NO.:48), 5' ss-последовательностями из Con 1 (DHFR-Con 15ss; Таблица 2 SEQ ID NO.: 49) или Con4 (DHFR-Con45ss, SEQ ID NO. 50). С целью оценки влияния последовательностей ESE и экзонного супрессора сплайсинга (ESS) в экзоне 2 DHFR синтезировали различные мутанты экзона 2 DHFR (перечисленные в Таблице 2).

[00127] Все эти различные последовательности экзона 2 DHFR клонировали в приблизительный центр интрона IVS2Δ в конструкции Con 1, применяя стратегию клонирования Golden Gate (NEB).

[00128] Конструкции проверяли секвенированием ДНК (Genewiz). ДНК трансфицировали в клетки HEK 293 и анализировали на активность люциферазы, как описано в Примере 1.

Таблица 2. Экзон 2 DHFR, содержащий модифицированные регуляторные последовательности сплайсинга. Подчеркнутая последовательность означает модифицированные регуляторные последовательности сплайсинга в экзоне 2 DHFR.

DHFR-wt	GAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATGACCACAACCTCTTCAGTAGAAG
mtSRp40	GAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATG <u>AAAAAAAAA</u> ATCTTCAGTAGAAG
StrSC35	GAATG <u>CCCCCT</u> GATATTTCCAGAGAATGACCACAACCTCTTCAGTAGAAG

SC35hnRNPA1	GAATGTAGGGAGATATTTCCAGAGAATGACCACAACCTCTTCAGTAGAAG
-------------	--

[00129] Результаты

[00130] Экзон 2 человеческой DHFR дикого типа и примыкающие интронные последовательности (SEQ ID NO.:8) вставляли в приблизительный центр интрона IVS2Δ в конструкции Con 1. Эта конфигурация генерирует платформу, в которой экзогенный экзон в интронной последовательности целевого гена может функционировать как альтернативный экзон, который обеспечивает возможность регулирования экспрессии целевого гена посредством модулирования сплайсинга альтернативного экзона. В этой конфигурации (Фиг. 2а) предположительно возникают явления сплайсинга между 5'-частью целевого гена и экзоном DHFR, а также между экзоном DHFR и 3'-частью целевого гена, что приводит к включению экзона DHFR в мРНК целевого гена. В силу того, что альтернативный экзон DHFR содержит внутрирамочный преждевременный стоп-кодон, когда экзон DHFR включен в мРНК, уровень экспрессии гена люциферазы в этих случаях снижается. Однако, когда участок 5' ss альтернативного экзона DHFR (т.е. участок донора сплайсинга на 5'-конце 3'-интрона) мутирован или недоступен, что предотвращает сплайсинг на этом участке, экзон DHFR исключается из мРНК, мРНК эффективно транслируется, а белок целевого гена экспрессируется (Фиг. 2а).

[00131] На первом этапе мы проанализировали сплайсинг экзона 2 DHFR с его неизменными нативными цис-элементами, а также различными другими версиями, в которых последовательности 5' ss были либо усилены, либо ослаблены. Вставка экзона DHFR с нативными 5' ss и 3'ss (SEQ ID NO.:8) в интронную последовательность в Con 1 для создания DHFR_wt, значительно снижала экспрессию люциферазы по сравнению с Con1, которая не содержит альтернативного экзона DHFR. Уровень экспрессии в конструкции DHFR_wt в 116 раз ниже, чем в Con 1 (Фиг.. 2b).

[00132] Когда 5' ss экзона DHFR мутирован до нефункциональной последовательности (DHFR_wt5ssC; SEQ ID NO.:48), включение экзона DHFR блокируется и экспрессия люциферазы восстанавливается до уровня Con 1 (Фиг. 2aII, 2b, 2c)

[00133] Если участок 5' ss экзона DHFR заменяют более сильным участком 5' ss, в этом случае 5' ss из Con 1 (DHFR_Con1 5ss; SEQ ID NO. 49), включение экзона DHFR повышается, что приводит к 545-кратному снижению уровня экспрессии гена люциферазы по сравнению с Con 1 (Фиг. 2b). Однако, при

применении слабого участка 5' ss из Con 4 (DHFR_Con4 5ss; SEQ ID NO. 50) экзон DHFR не включается и уровень экспрессии люциферазы повышается (Фиг. 2b).

[00134] Элементы экзонного энхансера сплайсинга (ESE) или экзонного супрессора сплайсинга (ESS) играют решающую роль в процессе сплайсинга, а их функции часто являются контекстно-зависимыми. Проанализировано влияние предполагаемых регуляторных последовательностей сплайсинга, расположенных в экзоне DHFR. Когда предполагаемый энхансер сплайсинга, участок связывания SRp40, расположенный в экзоне DHFR, подвергали мутации (Таблица 2, DHFR_mtSRp40; SEQ ID NO.:51), включение экзона DHFR существенно повышалось, что приводило к снижению уровня экспрессии люциферазы в 2982 раза по сравнению с Con 1 (Фиг. 2с, DHFR_wt и DHFR_mtSRp40).

[00135] При применении другого энхансера сплайсинга, когда участок связывания SC35 в экзоне DHFR (спрогнозированный с помощью ESEfinder) подвергали мутации с получением в результате более сильной последовательности, связывающей SC35 (Таблица 2, DHFR_StrSC35; SEQ ID NO52), включение экзона DHFR повышалось, уменьшая экспрессию люциферазы в 139 раз по сравнению с Con1 (Фиг. 2с, DHFR_wtStrSC35). Это уменьшение было немного больше, чем наблюдаемое в конструкции, содержащей нативный экзон DHFR (DHFR_wt Фиг. 2b)

[00136] При применении энхансера сплайсинга, когда участок связывания SC35 подвергали мутации с получением в результате ингибитора сплайсинга (участок связывания hnRNP A1) (Таблица 2, DHFR_wtSC35hnRNPA1; SEQ ID NO53) включение экзона DHFR было менее эффективным, что приводило к повышению уровня экспрессии люциферазы (фиг. 2с, DHFR_wt и DHFR_wtSC35hnRNPA1).

[00137] Была создана кассета "интрон-экзон-интрон", в которой экспрессия целевого гена, в данном случае люциферазы, может быть включена или выключена в зависимости от включения или исключения альтернативного экзона, в этом случае альтернативного экзона DHFR, содержащего внутрирамочный стоп-кодон. Процесс сплайсинга, который приводит к включению альтернативного экзона, снижает уровень экспрессии генов, при том, что уровень экспрессии генов возрастает, когда сплайсинг исключает альтернативный экзон. Сила или ослабление участков 5' ss альтернативных экзонов, а также последовательности в экзоне, которые модулируют сплайсинг, изменяют уровень целевой

экспрессии посредством их влияния на включение или исключение экзогенного экзона.

[00138] ПРИМЕР 3. Влияние шпилькообразной структуры на участке сплайсинга 5' альтернативного экзона на регулирование экспрессии целевого гена.

[00139] Экспериментальные методики

[00140] Синтезировали (IDT) последовательности, содержащие экзон 2 DHFR с нативными 3'- и 5' ss -последовательностями, в которых 5' ss были встроены в шпилькообразную структуру и клонированы в указанный вектор с применением стратегии клонирования Golden Gate (NEB). Конструкции трансфицировали в клетки НЕК 293 и анализировали на активность люциферазы, как описано в Примере 1.

[00141] Результаты

[00142] Мы анализировали, может ли включение участка 5' ss экзона DHFR в структуру стебля шпильки повлиять на сплайсинг и включение альтернативного экзона DHFR и таким образом изменить экспрессию целевого гена (см. Фиг. 3а).

[00143] Включение альтернативного экзона DHFR с последовательностями участка сплайсинга 5' конструкции Con 1 (DHFR_Con15ss; SEQ ID NO.:49) блокировало экспрессию люциферазы по сравнению с Con 1 (Фиг. 3с, DHFR_Con15ss). Шпилькообразная структура из 15 пар оснований (п.о.), встроенная во всю последовательность участка 5' ss, была сконструирована в DHFR_Con 15ss для создания DHFR_Con 15ss_HP15 (SEQ ID NO.:54) (Фиг. 3а). Наличие шпилькообразной структуры из 15 п.о. полностью восстанавливает экспрессию люциферазы до уровня Con 1, свидетельствуя о том, что шпилька блокирует доступность участка 5' ss и тем самым препятствует включению альтернативного экзона DHFR. (Фиг. 3с, Con 1, DHFR_Con15ss и DHFR_Con15ss_HP15)

[00144] Напротив, шпилька из 15 п.о. со "сломанным стеблем" (Фиг. 3b, Con15ss_15HPx; SEQ ID NO.: 55) не имела возможности восстанавливать экспрессию люциферазы (Фиг. 3с, DHFR_Con15ss_HP15x), указывая на то, что неповрежденный стебель является важным компонентом вторичной структуры РНК, регулирующей доступность 5'-участка сплайсинга и тем самым определяет включение или исключение альтернативного экзона.

[00145] Аналогичные эксперименты проводили с применением конструкции, содержащей экзон DHFR с мутантным участком связывания SRp40, который усиливал эффективность сплайсинга

(DHFR_wtmtSRp40, см. Пример 2). Встраивание 5' ss в шпильку восстанавливало экспрессию люциферазы, тогда как нарушение шпильки блокировало экспрессию люциферазы (Фиг. 3с, DHFR_wtmtSRp40, DHFR_wtmtSRp40_HP15 и DHFR_wtmtSRp40_HP15x)

[00146] Таким образом, встраивание участка 5' ss альтернативного экзона в шпилькообразную структуру может восстанавливать экспрессию целевого гена, блокируя доступность указанного участка 5' ss и тем самым предотвращая включение альтернативного экзона в мРНК, что позволяет экспрессироваться белку целевого гена. Создана платформа для экспрессии генов, в которой экспрессию белка целевого гена можно модулировать путем изменения доступности участка 5' ss экзогенного альтернативного экзона посредством вторичной структуры РНК.

[00147] Конструкцию DHFR_wtmtSRp40 (SEQ ID NO.:58) (далее обозначаемую как "mtDHFR") применяли для дальнейшего исследования рибосвитча.

[00148] **ПРИМЕР 4. Применение теофиллинового аптамера для регулирования экспрессии целевого гена посредством альтернативного сплайсинга.**

[00149] Экспериментальные методики

[00150] DHFR-акцепторный вектор сконструировали для облегчения клонирования последовательности аптамеров, прикрепленной к стеблям шпильки разной длины. Последовательность применяемого теофиллинового аптамера была следующей: ggcgatacCAGCCGAAAGGCCCTTGgcagcgtc (SEQ ID NO9). Олигонуклеотиды теофиллинового аптамера ("олиго") с 4 нуклеотидным выступом на 5'-конце синтезировали (IDT), "отжигали" и лигировали с BsaI-расщепленным DHFR-акцепторным вектором. Клетки НЕК 293 трансфицировали с репортерными конструкциями люциферазы с помощью регуляторной кассеты, содержащей теофиллиновый аптамер, как описано в Примере 1. Через четыре часа после трансфицирования среду отсасывали и добавляли новую среду с 3 мМ теофиллина или без него, при этом люциферазу анализировали через 20–24 часа после воздействия теофиллином. Кратность индукции выражали как показатель активности люциферазы, полученный при наличии соединения "аптамер/лиганд", деленный на значение, полученное в отсутствие соединения "аптамер/лиганд". Уровень активности люциферазы выражали в процентах от уровня активности люциферазы (называемой максимальной экспрессией), продуцируемого конструкцией Con1,

которая не содержит интрона IVS2 Δ в CDS гена люциферазы.

[00151] Результаты

[00152] С целью регулирования доступности 5'-участка сплайсинга альтернативного экзона, содержащего стоп-кодон, и тем самым осуществлять регулирование экспрессии белков целевого гена, последовательности аптамеров прикрепляли к стеблю шпилькообразной структуры, которая встраивает интронную часть участка 5' ss DHFR и его комплементарную последовательность. В этой конфигурации введение аптамерных последовательностей нарушает образование стебля шпильки, оставляя доступным участок 5' ss DHFR, что приводит к включению альтернативного экзона DHFR и предотвращению экспрессии белка целевого гена (Фиг. 4a). Когда происходит связывание "аптамер/лиганд", как показано на Фиг. 4b, конформационное изменение в аптамере, вызванное связыванием лиганда, объединяет 5' ss DHFR и его комплементарную последовательность для стабильного образования стебля, таким образом скрывая 5' ss DHFR и приводя к исключению экзона DHFR и экспрессии белка целевого гена.

[00153] Теофиллиновый аптамер анализировали путем связывания нижнего стебля теофиллинового аптамера непосредственно со стеблем шпильки (Фиг. 4c, DHFR_Theo1). Если стебель слишком длинный, он может образовывать стабильную структуру в отсутствие связывания "аптамер/лиганд", а если стебель слишком короткий, он никогда не сможет образовать стабильный стебель, даже при наличии лиганда. Следовательно, длина стебля должна быть оптимизирована таким образом, чтобы стабильная вторичная структура формировалась только при связывании "аптамер/лиганд". С целью определения оптимальной длины стебля, которая даст возможность образовать стебель при наличии, но не отсутствие лиганда, осуществили ряд конструкций, в которых клонированный теофиллиновый аптамер клонировали в mtDHFR (описанный в Примере 2, Таблица 2) и провели последовательные усечения стебля. Фиг. 4c иллюстрирует четыре конструкции с последовательным усечением стебля.

[00154] Фиг. 4d иллюстрирует экспрессию люциферазы в конструкциях с последовательным усечением стебля при наличии и в отсутствие теофиллина. В конструкциях от Theo 1 до Theo 12 с длиной стебля от 20 п.о. до 9 п.о. стебель шпильки имел достаточную длину, чтобы сформировать устойчивую вторичную структуру даже в отсутствие связывания "аптамер/лиганд". Таким

образом, экспрессия люциферазы наблюдается на уровнях, подобных Con 1, как в отсутствие, так и при наличии теофиллина.

[00155] В конструкции DHFR_Theo13 в отсутствие теофиллина экспрессия люциферазы подавляется. Это свидетельствует о доступности участка 5' ss экзона mtDHFR, что приводит к включению альтернативного экзона DHFR и подавлению экспрессии генов. Однако при наличии теофиллина экспрессия люциферазы "включалась", что приводило к 43-кратной индукции по сравнению с уровнем экспрессии без теофиллина и при этом уровень экспрессии составлял 56% от уровня экспрессии люциферазы, наблюдаемого при применении контрольного вектора Con1. Таким образом, сконструирован "рибосвитч для включения" у млекопитающих, который включает экспрессию белка целевого гена при наличии соединения "аптамер/лиганд", в данном случае с применением теофиллинового аптамера.

[00156] **ПРИМЕР 5. Применение xpt-гуанинового аптамера для регулирования экспрессии целевого гена посредством альтернативного сплайсинга.**

[00157] Экспериментальные методики

[00158] Xpt-гуаниновый аптамер со следующей последовательностью: cactcatataatCGCGTGGATATGGCACGCAAGTTTCTACCGGG CACCGTAAATGTCCgactatgggtg (SEQ ID NO.:10) применяли для создания рибосвитча. Олигонуклеотиды, содержащие последовательность гуанинового аптамера и стебля шпильки с 4 нуклеотидным выступом на 5'-конце, синтезировали (IDT), "отжигали" и лигировали с BsaI-расщепленным DHFR-акцепторным вектором. Клетки НЕК 293 трансфицировали, как описано в Примере 1. Через четыре часа после трансфицирования среду отсасывали и добавляли новую среду с 500 мкМ гуанина или без него. Экспрессию люциферазы анализировали через 20-24 часа после обработки гуанином, как описано в Примере 1 и в Примере 4. HepG2, AML12, RD и C2C12 (ATCC) культивировали согласно протоколу, рекомендованному ATCC. Кассету "интрон-экзон-интрон", содержащую рибосвитч xpt-G17 (SEQ ID NO.:15) вводили в лидерные пептидные последовательности гена антитела анти-KDR и в участок StuI в ген эритропоэтина мыши согласно стратегии клонирования Gibson (NEB). Конструкции, содержащие эритропоэтин (Епо) мыши или антитело анти-KDR, трансфицировали в клетки НЕК 293. Через четыре часа после трансфицирования среду отсасывали и добавляли новую среду с 500 мкМ гуанина или без него. Супернатанты подвергали анализу ELISA

для продуцирования либо антитела анти-KDR, либо продуцирования Еро мыши (R&D Systems).

[00159] Результаты

[00160] Применение дополнительных аптамеров/лигандов для контроля экспрессии целевого гена с помощью аптамеропосредованного модулирования альтернативного сплайсинга изучали путем присоединения xpt-гуанинового аптамера, полученного из *Bacillus subtilis*, через стебель P1 к стеблю шпильки (Фиг. 5a, DHFR_G1). Подобно Примеру 4, сконструировали 18 конструкций путем последовательного усечения соединительного стебля (Фиг. 5a и 5b, от G1 до G18 DHFR, также обозначаемого как "от xpt-G1 до G18", содержащего регуляторные кассеты) для получения оптимальной длины стебля шпильки вместе с гуаниновым аптамером, что дает возможность для осуществления взаимодействия соединения "аптамер/лиганд" с доступным участком 5' ss и процессом сплайсинга экзонов. Как проиллюстрировано на Фиг. 5b, в конструкциях от DHFR-G1 до G13 с длиной стебля от 24 п.о. до 12 п.о. экспрессия люциферазы не зависит от вставки альтернативного экзона DHFR и xpt-гуанинового аптамера при наличии или отсутствии соединения "аптамер/лиганд", в данном случае с применением гуанинового аптамера. Из этого можно сделать вывод, что длина стебля является достаточной для образования стабильной структуры как в отсутствие, так и при наличии лиганда, что предотвращает включение альтернативного экзона в мРНК. Однако в конструкциях от DHFR_G14 до DHFR_G18 экспрессия люциферазы подавлялась в отсутствие добавленного гуанина. При добавлении μM гуанина, экспрессия люциферазы в этих конструкциях индуцировалась (Фиг. 5b).

[00161] Дополнительная строгая валидация конструкций от G11 до G18 снова продемонстрировала четкую регуляцию экспрессии люциферазы при воздействии гуанином (Фиг. 5c). Конструкция DHFR_G17, содержащая xpt-G17 (SEQ ID NO.:15) (Фиг. 5a) демонстрировала 2000-кратную индукцию экспрессии, составляющую около 65% от уровня экспрессии люциферазы в конструкции Con1 (называемого уровнем максимальной экспрессии). Такой высокий динамический диапазон индукции является результатом активации экспрессии с очень низкого неиндуцированного исходного уровня в отсутствие лиганда. Конструкция DHFR_G16 (Фиг. 5a) демонстрировала приблизительно 800-кратную индукцию по сравнению с исходным уровнем неиндуцированной экспрессии с достижением

уровня, составляющего 83% максимальной экспрессии (Фиг. 5c и 5d). Кроме того, конструкции DHFR_G14 и G15 демонстрировали практически 100% уровень максимальной экспрессии с более низким показателем кратности индукции из-за более высокого исходного уровня неиндуцированной экспрессии люциферазы.

[00162] С целью оценки общей функциональности и применимости синтетического рибосвитча в кассете "интрон-экзон-интрон", мы трансфицировали конструкцию, содержащую xpt-G17 (DHFR_G17), во множество клеточных линий человека и мыши. В этих различных клеточных линиях обработка гуанином обуславливала значительную индукцию экспрессии генов, более чем 500-кратную индукцию в клетках HepG2 с более низким показателем кратности индукции в других клеточных линиях (Фиг. 5e). Разные показатели кратности индукции в различных клеточных линиях могут отражать различия в эффективности трансфицирования, а также в профиле экспрессии специфического к определенному типу клеток регулятора сплайсинга. Кроме того, ген люциферазы с регуляторной кассетой, содержащей рибосвитч xpt-G17 (DHFR_G17), демонстрировал аналогичный уровень индукции при трансфицировании на основу AAV (Фиг. 5f), что свидетельствует о том, что регуляторный эффект гена не зависит от основы вектора.

[00163] В дополнение к регулированию гена люциферазы регуляторную кассету, содержащую xpt-G17, также оценивали при регулировании секретируемых белков, антитела анти-KDR и эритропоэтина (Еро). Регуляторную кассету, содержащую xpt-G17, вставляли в кодирующую последовательность антитела анти-KDR и эритропоэтина. Как проиллюстрировано на Фигурах 5g и 5h, обработка гуанином обуславливала 80-кратную индукцию при продуцировании антител анти-KDR и 140-кратную индукцию при продуцировании Еро по сравнению с продуцированием каждой молекулы из клеток в отсутствие лиганда.

[00164] Эти результаты демонстрируют общую функциональность и применимость для регулирования экспрессии белка потенциального терапевтического целевого гена, а также применение указанной кассеты для регулирования гена при AAV-опосредованной доставке гена. Таким образом, мы сконструировали синтетический "рибосвитч включения" у млекопитающих, который способен "включать" экспрессию белка целевого гена в ответ на наличие специфичного для аптамера лиганда в клетках млекопитающих.

[00165] **ПРИМЕР 6. С целью регулирования экспрессии целевого**

гена посредством альтернативного сплайсинга можно применять различные пуриновые аптамеры.

[00166] Экспериментальные методики

[00167] В конструкциях рибосвитчей применяли следующие последовательности аптамеров, перечисленные в Таблице 3:

Таблица 3.

Ydh1-G SEQ ID NO.:11	ttgtataacctcaataatatggtttgaggggtgtctaccaggaaccgtaaaatcctgactacaa
Ydh1-A SEQ ID NO.:12	ttgtataacctcaataatatggtttgaggggtgtctaccaggaaccgtaaaatcctgattacaa
addA-G SEQ ID NO.:13	tcatataatcctaataatgatatggtttgggagtttctaccaagagccttaaaactcttgactatga
addA-A SEQ ID NO.:14	tcatataatcctaataatgatatggtttgggagtttctaccaagagccttaaaactcttgattatga

[00168] Результаты

[00169] С целью анализа дополнительных аптамеров в нашей системе для регулирования генов, мы применяли ту же стратегию и способ, которые описаны в предыдущих примерах, и создавали множество реагирующих на гуанин и аденин рибосвитчей, путем связывания различных гуаниновых и адениновых аптамеров с кассетой "интрон-mtDHFR-интрон" (Фиг. 6a). Гуаниновые рибосвитчи, которые были проанализированы, эффективно регулировали экспрессию гена люциферазы в ответ на гуанин (Фиг. 6b). Кроме того, мы обнаружили, что эти гуаниновые рибосвитчи регулировали экспрессию целевого гена в ответ не только на гуанин (Фиг. 6b), но и на гуанозин (Фиг. 6c) и 2'-деоксигуанозин (2'dG) (Фиг. 6d).

[00170] Мы сконструировали ряд адениновых рибосвитчей (Фиг. 6a), а также продемонстрировали функциональность регулирования гена (Фиг. 6e).

[00171] Различия в регуляции экспрессии генов различными анализируемыми конструкциями, содержащими аптамер, могут отражать различия в аффинности связывания "аптамер/лиганд", а также различия во вторичной структуре аптамера, которые могут влиять на доступность участка 5' ss, включение альтернативного

экзона и, следовательно, экспрессию целевого гена. Кассету "интрон-экзон-интрон" для регулирования гена можно оптимизировать путем изменения последовательности аптамеров для достижения желаемого уровня регулирования гена.

[00172] **ПРИМЕР 7. Состояние "включения/выключения" экспрессии целевого гена, регулируемое гуаниновым рибосвитчем у млекопитающего.**

[00173] Экспериментальные методики

[00174] Кассету "интрон-mtDHFR-аптамер-интрон" амплифицировали методом ПЦР и клонировали с применением стратегии клонирования Golden Gate (NEB) в вектор pEGFP-C1. С целью получения клеточной линии, стабильно экспрессирующей EGFP с помощью рибосвитча, клетки НЕК-293 электропорировали с применением 20 нг плазмидной ДНК. Спустя сорок восемь часов после электропорации культуру клеток отбирали с помощью 800 мкг/мл G418 в течение 2 недель с целью получения клеток, которые стабильно экспрессируют кассету. Клетки трипсинизировали, а суспензию клеток подвергали проточному цитометрическому анализу интенсивности флуоресценции GFP с помощью устройства Guava EasyCyte 8HT. Полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения GuavaSoft2. 2. 2.

[00175] Результаты

[00176] Чтобы еще раз продемонстрировать, что экспрессия целевого гена, содержащего разработанную нами регуляторную кассету "интрон-экзон-интрон", может регулироваться посредством воздействия лиганда, специфичного к аптамеру, содержащемуся внутри рибосвитча, кассету "интрон-mtDHFR-интрон", содержащую рибосвитч xpt-G17 (SEQ ID NO.:15) вводили в ген EGFP и стабильно трансфицировали клетки НЕК 293. При наличии гуанина экспрессия EGFP "включалась" (Фиг 7a). Флуоресценция определялась уже через 6 часов после обработки гуанином и увеличивалась в течение 3 дней обработки гуанином, достигая 300-кратной индукции по сравнению с необработанными клетками (Фиг. 7b), что свидетельствует о "включенном" состоянии экспрессии целевого гена при наличии соединения "аптамер/лиганд". Когда гуанин извлекали из среды для культивирования клеток, уровень экспрессии EGFP снижался, указывая на "выключенное" состояние экспрессии целевого гена в отсутствие лиганда, специфического для аптамера (Фиг. 7b). Таким образом, мы создали платформу для регулирования генов, состоящую из кассеты "интрон-экзон-интрон",

содержащей синтетический рибосвитч, с помощью которого регулируется экспрессия в целевых генах клеток млекопитающих, посредством наличия или отсутствия лиганда, специфического для аптамера.

[00177] **ПРИМЕР 8. Влияние множества регуляторных кассет на регулирование экспрессии целевого гена.**

[00178] Экспериментальные методики

[00179] Конструкции были созданы с применением стратегии клонирования Golden Gate (NEB). Клетки НЕК 293 трансфицировали указанными конструкциями, обрабатывали 500 мкМ гуанина или 1 мМ гуанозина (Sigma) через 4 часа после трансфекции. Активность люциферазы анализировали, как описано в Примере 5.

[00180] Результаты

[00181] Конструкция с xpt-G15 (SEQ ID NO.:46), содержащая регуляторную кассету (DHFR_G15, Пример 5), продемонстрировала 60-кратную индукцию экспрессии люциферазы в ответ на обработку гуанином по сравнению с исходным уровнем неиндуцированной экспрессии и достигла почти 100% уровня экспрессии люциферазы, наблюдаемого при применении конструкции Con 1 (Фиг. 8а). Это полезная функция при регулировании терапевтического белка, который необходим у высоких уровнях.

[00182] В отличие от этого, конструкция с регуляторной кассетой, содержащей xpt-G17 (DHFR_G17), характеризовалась значительно более высоким показателем кратности индукции, составляющим 2181 раз, обусловленным более низким исходным уровнем неиндуцированной экспрессии, но имела значительно меньший максимальный уровень экспрессии при индукции по сравнению с конструкцией Con1 (Фиг. 8а).

[00183] Для того, чтобы проанализировать, смогут ли две копии регуляторной кассеты, содержащей xpt-G15 (двойной xpt-G15; SEQ ID NO.:64) снизить исходные уровни экспрессии без ущерба для максимального уровня экспрессии люциферазы при индукции, две копии регуляторной кассеты, содержащей xpt-G15, встраивали в ген люциферазы, при этом каждую копию встраивали в другом месте последовательности гена. При наличии двух копий регуляторной кассеты, содержащей xpt-G15, исходный уровень неиндуцированной экспрессии снижался, что приводило к значительно более высокому показателю кратности индукции (от 60 до 1008 раз) без ущерба для максимального уровня экспрессии (Фиг. 8а).

[00184] Значение EC50 гуанина для кассеты с двойным xpt-G15

(двойной xpt-G15; SEQ ID NO.:64) регистрировалось в 5 раз ниже значения EC50 гуанина для конструкции, содержащей одну копию более точной кассеты, содержащей xpt-G17 (43 мкМ против 206 мкМ), что повышает чувствительность реакции лиганда (Фиг. 8a).

[00185] Принцип двух копий менее точной регуляторной кассеты для повышения кратности индукции и экспрессии максимально индуцированного гена также применяли к гену EGFP. Как проиллюстрировано на Фиг. 8b и 8c, согласно результатам регуляции люциферазы (Фиг. 8a), одна копия регуляторной кассеты xpt-G15 в гене EGFP (EGFP-xpt-G15) генерировала более высокий исходный уровень неиндуцированной экспрессии EGFP по сравнению с конструкцией, содержащей регуляторную кассету xpt-G17 (EGFP-xpt-G17). Однако, когда две копии регуляторной кассеты xpt-G15 вставляли в ген EGFP в разных местах (двойной EGFP-xpt-G15), исходный уровень неиндуцированной экспрессии снижался до уровня EGFP-xpt-G17 с индуцированным уровнем EGFP даже в большей степени, чем при применении контрольной конструкции Con1-EGFP (Фиг. 8c).

[00186] Кроме того, в ген люциферазы встраивали одну копию регуляторной кассеты, содержащей xpt-G17, и одну копию регуляторной кассеты, содержащей адениновый рибосвитч Ydh1-A5. Экспрессию люциферазы индуцировали либо добавлением аденина (в 25 раз), либо добавлением гуанина (в 120 раз), однако значительно более высокий уровень индукции (до 2966 раз) получали при совместном применении аденина и гуанина в максимальной концентрации каждого (Фиг. 8d). Эти результаты демонстрируют модульный принцип функционирования рибосвитчей на основе альтернативного сплайсинга при регулировании экспрессии целевого гена.

[00187] С целью снижения рекомбинации и упрощения изготовления вирусных векторов, содержащих две или более регуляторных кассеты, в одном целевом гене могут применяться регуляторные кассеты с различными интронными и экзонными последовательностями, которые могут содержать либо одинаковые, либо различные аптамеры, реагирующие на лиганд.

[00188] **ПРИМЕР 9. Влияние размера и последовательности интрона на регулирование экспрессии целевого гена посредством аптамер-опосредованного альтернативного сплайсинга.**

[00189] Экспериментальные методики

[00190] Конструкцию Con1 применяли в качестве матрицы для

ПЦР-амплификации интронных фрагментов, которые имеют делеции интронов, расположенных либо перед, либо после участка инициации транскрипции. Для создания конструкций, которые имеют одиночные делеции интрона, продукты ПЦР клонировали в конструкции, содержащие рибосвитч xpt-G17, применяя стратегию клонирования Golden Gate (NEB). Для создания конструкций, которые имеют делеции интронов, расположенных и перед и после участка инициации транскрипции, фрагменты, высвобожденные с помощью EcoRI и BamHI из конструкций с одиночными делециями в последовательности интрона, расположенного после участка инициации транскрипции, клонировали в конструкции, расщепленные посредством EcoRI и BamHI, с одиночными делециями в последовательности интрона, расположенного перед участком инициации транскрипции.

[00191] Результаты

[00192] Интроны содержат элементы, которые могут либо стимулировать (интронный энхансер сплайсинга, ISE), либо подавлять (интронный супрессор сплайсинга, ISS) сплайсинг экзонов. Из всех сконструированных рибосвитчей, xpt-G17 продемонстрировал лучшую регулируемую способность как по показателю кратности индукции, так и по уровню индуцированной экспрессии генов. С целью дальнейшей оптимизации системы мы осуществили серию модификаций в последовательностях и длине интронов, а также на участках сплайсинга, используя рибосвитч xpt-G17 в кассете "интрон-экзон-интрон".

[00193] Сначала влияние модификации интрона анализировали путем введения одиночных делеций в последовательности интрона, размещенного либо перед, либо после экзона mtDHFR (Фиг. 9a, 9b). Создали 16 конструкций (от xpt-G17-IR-1 до xpt-G17-IR-16) с рибосвитчем, содержащем xpt-G17 (последовательности из 13 этих конструкций приведены в Таблице 5, SEQ ID NOS:16-28). Затем делеции интронов, расположенных перед и после участка инициации транскрипции, объединяли для получения более крупных делеций интронов, как показано на Фиг. 9c. Как проиллюстрировано на Фиг. 9d и 9e, из 16 конструкций, выполненных с двумя делециями интрона (2IR), конструкции от 2IR-1 до 2IR-10 (SEQ ID NOS:29-38) продемонстрировали значительно более высокие показатели кратности индукции без ущерба для уровня индуцированной экспрессии люциферазы, при этом конструкция 2IR-3 характеризовалась наибольшим улучшением показателя кратности

индукции (4744 раза). Кроме того, мы также создали конструкции с мутантными участками 3' ss, расположенными перед экзоном mtDHFR, а также уменьшили размер интрона, расположенного после экзона mtDHFR. Как проиллюстрировано на Фигурах 9d и 9e (конструкции от DHFR_3ssC_1 до DHFR_3ssC_5), эти модификации дополнительно улучшали показатель относительной кратности индукции, однако в этом случае наблюдалось снижение уровня индуцированной экспрессии (от 64% до 32% для 3ssC_3).

[00194] Эти результаты свидетельствуют о том, что характеристики регуляторной способности кассеты "интрон-экзон-аптамер-интрон" можно оптимизировать путем модификации интронных последовательностей, граничащих с альтернативным экзоном, с целью достижения желаемого уровня регуляции генов.

[00195] **ПРИМЕР 10. Применение множества природных, а также синтетических экзонов, в кассете для регулирования генов.**

[00196] Экспериментальные методики

[00197] Последовательности экзона 5 из мутантной человеческой опухоли Вильмса 1 (mutWT1-e5, SEQ ID NO.:61), экзона 6 SIRT1 (SIRT1-e6, SEQ ID NO.:62), экзона 16 или 17 кальций/калмодулин-зависимой протеинкиназы II мыши (Camk2d-e16 or e17, SEQ ID NOs.:59, 60) и синтетического экзона ENEEE (SEQ ID NO.:63) синтезировали (IDT) и клонированы в вектор DHFR-G17 вместо экзона DHFR с применением набора для клонирования Gibson (NEB). Плазмидную ДНК трансфицировали в клетки HEK 293, обрабатывали 500 мкМ гуанина и проводили анализ люциферазы, как описано в Примере 1. Последовательности каждого экзона с 5'- и 3'-участками сплайсинга указаны с экзонными последовательностями с помощью прописных букв (Таблица 5, SEQ ID NO59-63).

[00198] Результаты

[00199] Чтобы определить, что регуляторная функция разработанной нами кассеты "интрон-экзон-аптамер-интрон" не ограничивается конкретной экзонной последовательностью, мы заменили экзон mtDHFR в конструкции, содержащей рибосвитч с гуанином xpt-G17 (DHFR-xpt-G17), на множество различных природных и мутантных экзонов, а также синтетических экзонов, которые содержат известные последовательности экзонных энхансеров сплайсинга (ESE). Как проиллюстрировано на Фиг. 10, регуляторная кассета с экзоном CamkIId-e16 генерирует практически эквивалентный показатель кратности индукции по сравнению с DHFR-xpt-G17, но с более низким уровнем как

исходной, так и индуцированной экспрессии люциферазы. Кассеты, содержащие другие экзоны, также продемонстрировали различные уровни как исходной, так и индуцированной экспрессии люциферазы. Таким образом, кассета для регулирования генов на основе аптамер-опосредованного альтернативного сплайсинга не является экзоноспецифической, и не ограничивается экзоном mDHFR-e2.

[00200] Экзоны, которые могут генерировать эффективные процессы альтернативного сплайсинга, являются пригодными для кассеты с аптамер-опосредованной регуляцией генов. Эти результаты дополнительно свидетельствуют о том, что характеристики регуляторной способности кассеты "интрон-экзон-аптамер-интрон" можно оптимизировать путем модификации последовательностей в альтернативном экзоне, а также в окружающих интронных последовательностях, например, получая в результате этого изменения силы сплайсинга последовательностей участков 5' ss и 3' ss альтернативных экзонов, а также последовательностей ESE и ESS в альтернативном экзоне, как описано в данном документе.

[00201] **ПРИМЕР 11. Регулирование экспрессии целевого гена посредством аптамер-опосредованного альтернативного сплайсинга *in vivo* у мышей.**

[00202] Экспериментальные методики

[00203] Введение гидродинамической ДНК и воздействие препаратом: 5 мкг или 10 мкг плазмидной ДНК без эндотоксина, содержащей ген люциферазы с двумя копиями регуляторной кассеты с xpt-G15 (двойной xpt-G15; SEQ ID NO.:64; Пример 8, Фиг. 8a), разведенной в солевом растворе (набор Qiagen Endofree), вводили в хвостовую вену самкам мышей CD-1 в возрасте 6-7 недель в объеме 10% веса тела в течение от 5 до 10 секунд. Гуанозин (Sigma) суспендировали в 0,5% метилцеллюлозе/0,25% Твин 80 (Sigma) и вместе со свежей водой вводили перорально через 2 часа и 12 часов после инъекции ДНК или путем внутрибрюшинной инъекции (в/б) через 5 часов, 12 часов, 16 часов и 24 часа после введения ДНК.

[00204] Неинвазивная прижизненная биолюминесцентная визуализация у животных: перед получением изображений мышей анестезировали 2% изофлураном и вводили люциферин 150 г/кг веса, после этого делали снимки в течение 2-5 минут после инъекции люциферина с применением системы Bruker Xtreme в указанный момент времени после инъекции ДНК. Активность люциферазы

выражали как среднее значение фотон/сек $\pm$ с. о. Показатель кратности индукции рассчитывали путем деления значения фотон/сек, полученного у мышей, получавших гуанозин, на значение фотон/сек, полученное у мышей, не получавших гуанозин.

[00205] Результаты

[00206] Мы оценивали функциональные характеристики кассеты "интрон-экзон-интрон" относительно регулирования генов у мышей *in vivo*. Не содержащую эндотоксина плазмидную ДНК в составе конструкции, включающей две копии рибосвитча xpt-G15 в гене люциферазы (двойной xpt-G15), вводили в печень мышей посредством гидродинамической инъекции с параллельным внутрибрюшинным введением гуанозина. Мы проанализировали два пути введения гуанозина. В одном эксперименте (Фиг. 11a и 11b) мышам перорально вводили различные дозы гуанозина через 2 часа и 12 часов после введения ДНК, а затем осуществляли визуализацию. Как проиллюстрировано на Фиг. 11a, у мышей, получавших гуанозин, регистрировали более высокие уровни экспрессии люциферазы через 9 часов после введения ДНК. Экспрессия люциферазы у мышей, получавших гуанозин, повышалась в динамике, достигая наивысшего уровня через 48 часов после инъекции ДНК, после чего уровень экспрессии снижался.

[00207] В отдельном эксперименте (Фиг. 11c и Фиг. 11d) гуанозин вводили внутрибрюшинно. Через 4 часа после инъекции ДНК (п/и) и до введения гуанозина у мышей в каждой группе регистрировали одинаковый уровень исходной активности люциферазы (Фигура 11). Затем мышам вводили либо несущую среду в качестве контроля, либо гуанозин. Через 11 часов после инъекции ДНК активность люциферазы повышалась у всех мышей, что согласуется с данными о том, что экспрессия гена люциферазы достигает пика через 12 часов после введения гидродинамической ДНК в печень. Однако у мышей, получавших гуанозин, уровень экспрессии люциферазы регистрировался значительно выше, чем у мышей, не получавших гуанозин; при этом показатели кратности индукции составляли 4,7 раз и 16,2 раз по сравнению с неиндуцированной исходной экспрессией при введении 100 мг/кг и 300 мг/кг гуанозина, соответственно.

[00208] Таким образом, продемонстрировано, что кассета для регулирования генов посредством сплайсинга, регулирует экспрессию гена *in vivo* у животных в дозозависимый способ и в ответ на введение лиганда, специфичного для аптамера,

содержащегося в регуляторной кассете.

[00209] **ПРИМЕР 12. Доставка конструкций рибосвитча в сетчатку мыши посредством векторов аденоассоциированного вируса (AAV).**

[00210] **Экспериментальные методики**

[00211] *Конструкции плазмид AAV:* Две конструкции с экспрессией рибосвитча (описанные в Таблице ниже) адаптировали с помощью молекулярного клонирования в формат, который можно было упаковать в виде генома AAV.

Таблица 4.

Название	Индуктируемый элемент рибосвитча	Промотор	Трансгенный репортер
GTX5	Нет (контроль)	CMV	Усиленный зеленый флуоресцентный белок (eGFP)
GTX7	G15	CMV	Усиленный зеленый флуоресцентный белок (eGFP)

[00212] Экспрессирующие конструкции на основе трансгена EGFP (GTX 5–7) расщепляли рестрикционными ферментами MfeI и NheI, высвобождая фрагмент ДНК размером ~1400 н. о., содержащий индуцируемый элемент рибосвитча и трансген EGFP. Геномную плазмиду pD10 AAV также расщепляли ферментами MfeI и NheI, высвобождая фрагмент 4475 н. о., содержащий AAV ITR, промотор CMV и сигнал полиаденилирования SV40. Эти два фрагмента лигировали с применением T4 DNA-лигазы, в результате чего получали плазмиды, содержащие последовательность со следующей структурой, которые можно было упаковать в виде генома AAV2:

[ITR] – [CMV] – [5' EGFP] – [Элемент рибосвитча] – [3' EGFP] – [SV40] – [ITR]

[00213] Все полученные конструкции плазмид верифицировали секвенированием ДНК и называли согласно следующему условному обозначению: pD10-GTX#.

[00214] *Продукция и титрование вектора AAV:* Аденоассоциированный вирус (AAV) получали *in vitro* путем временного трансфицирования клеток HEK-293T тремя плазмидами.

(i) Плазмида вирусного генома на основе остова pD10

(ii) Упаковывание плазмиды AAV, содержащей ген AAV2 Rep78 и вирусный капсидный ген. Путем изменения последовательности капсидного гена можно получить множество различных серотипов AAV, но в этом случае использовали капсид AAV8.

(iii) Вспомогательная плазмида (pHGTI-Adenol). Эта плазмида обеспечивает почти минимальный набор генов аденовируса, которые необходимы AAV для упаковки и сборки.

[00215] Эти плазмиды трансфицировали в клетки HEK-293T в соотношении 1:1:3; в общей сложности 50 мкг плазмидной ДНК трансфицировали на 80-90% конфлюэнтного планшета с площадью 150 см². Типичный цикл продукции состоял из 20 таких планшето. В качестве реагента для трансфицирования применяли полиэтилененимин (PEI) при соотношении PEI к ДНК 2,25:1 (вес/вес). Через семьдесят два часа после трансфицирования клетки физически отделяли от планшето и осаждали путем центрифугирования; полученный осадок клеток ресуспендировали в 20 мл плотномерного буфера TRIS. Затем осадок лизировали с помощью повторных циклов замораживания/оттаивания/перемешивания вихревым способом, и любую не упакованную ДНК, оставшуюся в лизате, разрушали путем расщепления бензоназой. Затем лизат освещали с помощью "тупикового" фильтрования и центрифугирования перед разбавлением до общего объема 50 мл.

[00216] Затем освещенный лизат очищали с помощью жидкостной хроматографии быстрого разрешения (FPLC) на основе аффинности, с применением колонки AVB на устройстве АКТА Pure (оба - от компании GE Healthcare), выполняемой согласно предварительно запрограммированным протоколам. Конечный, содержащий AAV элюат из колонки FPLC, концентрировали до объема ~ 200 мкл путем центрифугирования при 5000 x g в центробежном концентраторе Vivaspin 4 с порогом отсечения 10 000 МВт (GE Healthcare), добавляли 2 мл PBS-МК (чтобы разбавить элюирующий буфер с высоким содержанием соли), и снова концентрировали элюат до ~ 200 мкл с применением того же концентратора. Этот материал представлял собой очищенный вирус AAV; материал аликвотировали по мере необходимости и хранили при -80°C.

[00217] Титр вектора устанавливали с применением ПЦР (колич) (нацеленной на сигнал полиаденилирования SV40) непосредственно в образце очищенного вектора. Полученное пороговое значение цикла сравнивали с известной стандартной кривой и подсчитывали количество векторных геномов на мл.

[00218] Векторы рибосвитча AAV называли согласно следующему условному обозначению: AAV2/[капсидный серотип #]-GTX#

[00219] Субретинальные инъекции для мышей: Инъекции вектора в субретинальное пространство выполняли мышам под общей

анестезией с помощью управляемой вручную иглы 10 мм, 34 калибра, надетой на шприц Гамильтона объемом 5 мкл. Кончик иглы направляли в положение впрыска, наблюдая за сетчаткой через операционный микроскоп. С целью введения вектора в каждый глаз выполняли инъекции 2×2 мкл, причем одну инъекцию выполняли в верхнее полушарие глаза, а другую – в нижнее полушарие. После инъекции регистрировали характеристики возникшей отслойки сетчатки и любого возвратного оттока вводимого материала.

[00220] *Флуоресцентное фотографирование глазного дна:* После субретинальной инъекции периодически оценивали экспрессию трансгена EGFP посредством фотографирования глазного дна с применением щелевой лампы (SC-16, Keeler) с прикрепленной цифровой камерой Leica DC500. Животные получали общую анестезию, при этом их зрачки расширяли с помощью местного применения 1% тропикамида. Преломляющую способность роговицы нейтрализовали, поместив покровное стекло на роговицу, покрытую раствором связующей среды (Viscotears). Под ярким белым светом инструмент регулировали, а животное располагали так, чтобы сетчатка находилась в четком фокусе, а оптический диск центрировали в поле зрения, затем делали изображение яркого поля с временем экспозиции 200 мс. Флюоресценцию трансгена (EGFP) оценивали путем фильтрования источника света (475 ± 25 нм) и получения двух дополнительных изображений с экспозицией 10 и 30 секунд.

[00221] Результаты

[00222] Конструкции рибосвитча (Табл. 4) были успешно клонированы в формат, который может быть упакован в виде генома AAV, что подтверждалось ДНК-секвенированием продуктов лигирования. Из полученных конструкций pd10-GTX7 и pd10-GTX5 в дальнейшем получали вирусные векторы AAV2/8. С помощью ПЦР(колич) показано, что полученные векторы имеют следующие титры:

AAV2/8-GTX7: $1,17 \times 10^{13}$ векторных геномов/мл

AAV2/8-GTX5: $1,73 \times 10^{13}$ векторных геномов/мл

[00223] Эти два вектора затем вводили субретинентально и оставляли на 8 дней для развития экспрессии трансгена EGFP перед оценкой уровня экспрессии с помощью флуоресцентной фотографии глазного дна. Фиг. 12 иллюстрирует, что EGFP экспрессируется в сетчатке, в которую вводили AAV2/8-GTX7. Уровень трансгенной экспрессии является низким, но значительную экспрессию от AAV2/8-GTX7 можно было ожидать только после индукции посредством

аптамер-опосредованного альтернативного сплайсинга в ответ на лиганд (который не был добавлен).

[00224] **ПРИМЕР 13. Регулирование экспрессии целевого гена посредством альтернативного сплайсинга, опосредованного кассетой *in vivo*, в сетчатке мышей после введения AAV.**

[00225] Процедуры

[00226] *Количественная оценка флуоресцентной фотографии глазного дна (сигнал EGFP):* Все манипуляции и анализ изображений выполняли с применением программы GNU Image Manipulation Program (GIMP, доступный ресурс). Как описано выше, три фотографии каждой сетчатки были сделаны в каждой точке изображения: белый свет (200 мс), 475 ± 25 нм (10 с) и 475 ± 25 нм (30 с). Сначала эти три изображения накладывали в виде слоев и, используя изображение белого света в качестве ориентира, определяли область интереса (ОИ) с целью охвата всей сетчатки, видимой через зрачок. Для двух изображений 475 ± 25 нм (флуоресценция EGFP) пороговый инструмент применяли для подсвечивания только тех пикселей, величина интенсивности которых была выше определенного порога. Пороговое значение выбирали на основе определения четкого отделения сигнала EGFP от фона и предоставления соответствующего динамического диапазона для анализа. Количество пикселей выше порога в пределах ОИ регистрировали для каждого изображения. Для поправки на переменную дилатацию зрачка, приводящую к изменению в области сетчатки, видимой между глазами, количество пикселей выше порога разделяли на общее количество пикселей в пределах ОИ.

[00227] *Индукция:* Опосредованную рибосвитчем индукцию экспрессии целевого гена осуществляли с помощью двух путей введения, как описано ниже:

[00228] *Внутрибрюшинная инъекция (в/б):* Объем 100 мкл [75 мг/мл гуанозина+0,5% вес/об. метилцеллюлозы+0,25% об. /об. Твин 80 в воде] вводили во внутрибрюшинную полость с помощью иглы 13 мм, 30 калибра. Это эквивалентно дозе гуанозина 300 мг/кг для взрослой мыши весом 25 г.

[00229] *Интравитреальная инъекция (и/витр):* Объем 2 мкл [1 мМ гуанозина+2,5% ДМСО в PBS-МК] вводили интравитреально с помощью управляемой вручную иглы 10 мм, 34 калибра. Положение иглы при инъекции было ниже линзы непосредственно над оптическим диском; иглу направляли в это положение, наблюдая за сетчаткой через операционный микроскоп.

[00230] Результаты

[00231] В общей сложности в 9 глаз субретинально вводили препарат, как описано в Примере 12 и согласно описанию ниже в день 00:

- в 6 глаз вводили AAV2/8-GTX7 (экспрессия трансгена EGFP от промотора CMV, регулируемая элементом рибосвитча G15)

- в 3 глаза вводили AAV2/8-GTX5 (конструкция в качестве положительного контроля; нерегулируемая экспрессия трансгена EGFP от промотора CMV)

[00232] Флуоресцентное фотографирование глазного дна, как описано в Примере 12, выполняли в дни 02, 08, 09, 10 и 12.

[00233] Для всех глаз проводили индукцию посредством внутрибрюшинной инъекции после флуоресцентного фотографирования в дни 08, 09 и 10. Для всех глаз проводили индукцию посредством внутрибрюшинной инъекции после флуоресцентного фотографирования в дни 11. Флуоресцентный сигнал определяли количественно, как описано выше; типовые изображения приведены на Фиг. 13а.

[00234] Индукцию не проводили в течение первых 8 дней после инъекции вектора, поскольку, как известно, период, необходимый для достижения максимального уровня экспрессии гена из AAV2/8, занимает до 7 дней. Таким образом, уровень экспрессии на день 8 принимали за исходный уровень доиндукционной экспрессии. На день 10 после инъекции вектора после 2 циклов в/б индукции, экспрессия трансгена увеличилась на ~ 3,5х по сравнению с этим исходным уровнем ($P \leq 0,05$, однофакторный анализ ANOVA, критерий Дуннетта), как проиллюстрировано на Фиг. 13с и Фиг. 13а (L по сравнению с N).

[00235] На день 12 после инъекции вектора, через 24 часа после интравитреальной индукции и через 48 часов после последней в/б индукции, экспрессия трансгена увеличилась на ~ 9 х по сравнению с исходным уровнем ($P \leq 0,001$, однофакторный анализ ANOVA, критерий Дуннетта), как проиллюстрировано на Фиг. 13с и Фиг. 13а (L по сравнению с O). Этот полученный существенно больший показатель после интравитреальной индукции дает основания предположить (но не доказывает окончательно), что этот путь индукции может быть более эффективным, чем внутрибрюшинная инъекция.

[00236] Изображения с более высоким разрешением, демонстрирующие отличия в экспрессии трансгена EGFP до и после индукции, приведены на Фиг. 13b.

[00237] В течение того же периода времени и при одном и том же индукционном режиме уровни экспрессии EGFP, опосредуемые нерегулируемым контрольным вектором AAV2/8-GTX5, достоверно не изменялись (однофакторный анализ ANOVA с поправкой Бонферрони), оставаясь приблизительно постоянными, как проиллюстрировано на Фиг. 13d. Учитывая существенные отличия в уровне экспрессии, опосредуемой GTX7 по сравнению с GTX5, для каждого набора изображений необходимо разное время экспозиции (30 с и 10 с, соответственно) и порог экспозиции (50 и 190, соответственно).

[00238] Полученные данные четко демонстрируют, что трансгенная экспрессия из конструкции GTX7 на основе G15 в сетчатке мыши регулировалась посредством аптамер-опосредованного альтернативного сплайсинга. Максимальный уровень трансгенной экспрессии, индуцированной GTX7, регистрировался ниже, чем при применении неиндуцируемой конструкции GTX5 в качестве положительного контроля.

Таблица 5. Описание и ассоциированные последовательности. Последовательность экзона представлена заглавными буквами, а последовательность интрона представлена строчными буквами, если не указано иное.

SEQ ID NO.	Описание	Последовательность
SEQ ID NO.:1	Luci-IVSΔ-Luci в конструкции Con1 Интрон 2 бета-глобина человека, содержащий делецию ("IVS2Δ"), представлен строчными буквами, а фланкирующая последовательность люциферазы представлена заглавными буквами.	GAGGTTCCATCTGCCAGGTATCAGGgtgagtctatgggaccc ttgatgttttctttccccttcttttctatggttaagttcatg tcataggaaggggagaagtaacaggggtacacatattgaccaa atcagggtaatgttgcatgttgtaattttaaaaaatgctttct tcttttaataatacttttttggttatcttattttctaatacttt ccctaactctctttctttcagggaataatgatacaatgtatc atgcctctttgcaccattctaaagaataacagtgataatttc tgggttaaggcaatagcaatattttctgcatataaatattttct gcatataaattgtaactgatgtaagaggtttcatattgctaa tagcagctacaatccagctaccattctgcttttattttatgg ttgggataaggctggattattctgagtccaagctaggccctt ttgctaatacatgttcatacctcttatcttcctcccacagCAA GGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTCT
SEQ ID NO.:2	Luci-IVSΔ-Luci в конструкции Con2	GATTACACCCGAGGGGGATGATAAAGtaagcctatgggaccc ttgatgttttctttccccttcttttctatggttaagttcatg tcataggaaggggagaagtaacaggggtacacatattgaccaa atcagggtaatgttgcatgttgtaattttaaaaaatgctttct tcttttaataatacttttttggttatcttattttctaatacttt

SEQ ID NO.	Описание	Последовательность
		ccctaattctctttctttcagggcaataatgatacaatgtatc atgcctctttgcaccattctaaagaataacagtgataatttc tgggttaaggcaatagcaatatttctgcatataaataatttct gcatataaattgtaactgatgtaagagggttcatattgctaa tagcagctacaatccagctaccattctgcttttattttatgg ttgggataaggctggattattctgagtcgaagctaggccctt ttgctaatacatgttcatacctcttatcttctcccacagCCG GGCGCGGTTCGGTAAAGT
SEQ ID NO.:3	Luci-IVSΔ-Luci конструкции Con3	В TTCTTCGCCAAAAGCAgtaagtctatgggacccttgatgttt tctttccccttcttttctatgggttaagttcatgtcataggaa ggggagaagtaacagggtacacataattgaccaaatacagggt atatttgatttgtaattttaaaaaatgctttcttctttta atacttttttgtttatcttatttctaatactttccctaact ctttctttcagggcaataatgatacaatgtatcatgcctctt tgaccattctaaagaataacagtgataatttctgggttaag gcaatagcaatatttctgcatataaataatttctgcatataaa ttgtaactgatgtaagagggttcatattgctaatagcagcta caatccagctaccattctgcttttattttatgggtgggataa ggctggattattctgagtcgaagctaggcccttttgctaata atgttcatacctcttatcttctcccacagCTCTGATTGACA AATACG
SEQ ID NO.:4	Luci-IVSΔ-Luci конструкции Con4	В AAGAGCTGTTTCTGAGGAGgtgtggctatgggacccttgatg ttttctttccccttcttttctatgggttaagttcatgtcatag gaaggggagaagtaacagggtacacataattgaccaaatacagg gtaattttgcatttgtaattttaaaaaatgctttcttctttt aatatacttttttgtttatcttatttctaatactttccctaa tctctttctttcagggcaataatgatacaatgtatcatgcct ctttgcaccattctaaagaataacagtgataatttctgggtt aaggcaatagcaatatttctgcatataaataatttctgcatat aaattgtaactgatgtaagagggttcatattgctaatagcag ctacaatccagctaccattctgcttttattttatgggtggga taaggctggattattctgagtcgaagctaggcccttttgcta atcatgttcatacctcttatcttctcccacagCCTTCAGGA TTACAAGATTCAA
SEQ ID NO.:5	Luci-IVSΔ-Luci конструкции Con5	В CATCTGCCAGGTATCAGGgtgagtctatgggacccttgatgt tttctttccccttcttttctatgggttaagttcatgtcatagg aaggggagaagtaacagggtacacataattgaccaaatacagg taattttgcatttgtaattttaaaaaatgctttcttctttta atatacttttttgtttatcttatttctaatactttcccta

SEQ ID NO.	Описание	Последовательность
		ctctttctttcagggcaataatgatacaatgtatcatgcctc tttgcaccattctaaagaataacagtgataatttctgggtta aggcaatagcaatatttctgcatataaatatttctgcatata aattgtaactgatgtaagagggttcatattgctaatagcagc tacaatccagctaccattctgcttttattttatggttgggat aaggctggattatttctgagtccaagctaggcccttttgctaa tcatgttcataccctttacttctatgactgtagCAAGGATAT GGGCTCACTGAGACT
SEQ ID NO.:6	Luci-IVSΔ-Luci конструкции Con6	В TCCATCTGCCAGGTATCAGGgtgagtctatgggacccttgat gttttctttccccttcttttctatgggttaagttcatgtcata ggaaggggagaagtaacagggtacacatattgaccaaatacag ggtaattttgcatttgtaattttaaaaaatgctttcttcttt taatatactttttgtttatcttatttctaatactttcccta atctctttctttcagggcaataatgatacaatgtatcatgcc tctttgcaccattctaaagaataacagtgataatttctgggt taaggcaatagcaatatttctgcatataaatatttctgcata taaattgtaactgatgtaagagggttcatattgctaatagcag gtacaatccagctaccattctgcttttattttatggttggg ataaggctggattatttctgagtccaagctaggcccttttgct aatcatgttcataccgtgactgtgtgtatgcacagCAAGGAT ATGGGCTCACTGAGACT
SEQ ID NO.:7	Luci-IVSΔ-Luci конструкции Con7	В ATCTGCCAGGTATCAGGgtgagtctatgggacccttgatgtt ttctttccccttcttttctatgggttaagttcatgtcatagga aggggagaagtaacagggtacacatattgaccaaatacagggt aattttgcatttgtaattttaaaaaatgctttcttcttttaa tatactttttgtttatcttatttctaatactttccctaatac tctttctttcagggcaataatgatacaatgtatcatgcctct ttgcaccattctaaagaataacagtgataatttctgggttaa ggcaatagcaatatttctgcatataaatatttctgcatataa attgtaactgatgtaagagggttcatattgctaatagcagct acaatccagctaccattctgcttttattttatggttgggata aggctggattatttctgagtccaagctaggcccttttgctaat catgttcataccattgtgatcgagccaatagCAAGGATATG GGCTCACTGAGACT
SEQ ID NO.:8	Экзон 2 DHFR с фланкирующей интронной последовательностью	gagtaacgctgtttctctaacttgtagGAATGAATTCAGATA TTTCCAGAGAATGACCACAACCTCTTCAGTAGAAGgtaatgt g
SEQ ID	Теофиллиновый аптамер	ggcgataccagccgaaaggcccttggcagcgtc

SEQ ID NO.	Описание	Последовательность
NO.:9		
SEQ ID NO.:10	Xpt-гуаниновый аптамер	cactcatataatcgcggtggatattggcacgcaagtttctaccg ggcaccgtaaatgtccgactatgggtg
SEQ ID NO.:11	Ydh1-гуаниновый аптамер	ttgtataacctcaataatatggtttgagggtgtctaccagga accgtaaaatcctgactacaa
SEQ ID NO.:12	Ydh1-адениновый аптамер	ttgtataacctcaataatatggtttgagggtgtctaccagga accgtaaaatcctgattacaa
SEQ ID NO.:13	addA-гуаниновый аптамер	tcatataatcctaataatgatattggtttgagggtgtctaccaaga gccttaaactcttgactatga
SEQ ID NO.:14	addA-адениновый аптамер	tcatataatcctaataatgatattggtttgagggtgtctaccaaga gccttaaactcttgattatga
SEQ ID NO.:15	Рибосвитч xpt-G17 Аптамер выделен подчеркиванием, а стебель выделен двойным подчеркиванием. Модифицированный экзон 2 DHFR обозначен заглавными буквами.	gtgagtcctatgggacccttgatgttttctttcccttctttt ctatgggttaagttcatgtcataggaaggggagaagtaacagg gtacacatattgaccaaatacagggttaattttgcatttgtaaat tttaaaaaatgcttttcttttataataactttttgtttat cttattttctaatactttccctaatactcttttctttcagggtcaa taatgatacaatgtatcatgccgagtaacgctgtttctctaa cttgtagGAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATGAAAAAA AATCTTCAGTAGAAGGtaaatgtataatcgcggtggatattggca cgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactacattac gcaccattctaaagaataacagtgataattttctgggttaagg caatagcaatattttctgcatataaatattttctgcatataaat tgtaactgatgtaagaggtttcatattgctaatagcagctac aatccagctaccattctgcttttattttatgggtgggataag gctggattattctgagtcgaagctaggcccttttgctaataca tgttcatacctcttatcttctctccacag
SEQ ID NO.:16	xpt-G17-IR-1	gtgagtcctatgggacccttgatgttttctttccctgctcaaa tcagggttaattttgcatttgtaatttttaaaaaatgctttctt cttttaataatactttttgtttatcttattttctaatactttc cctaatactcttttctttcagggtcaataatgatacaatgtatca tgccgagtaacgctgttttcttaacttgtagGAATGAATTCAG ATATTTCCAGAGAATGAAAAAAATCTTCAGTAGAAGGta atgtataatcgcggtggatattggcacgcaagtttctaccgggc accgtaaaatgtccgactacattacgcaccattctaaagaata acagtgataattttctgggttaaggcaatagcaatattttctgc atataaatattttctgcatataaattgtaactgatgtaagagg tttcatattgctaatagcagctacaataccagctaccattctg

SEQ ID NO.	Описание	Последовательность
		cttttattttatggttgggataaggctggattattctgagtc caagctaggcccttttgctaatacatgttcataacctcttatct tcctcccacag
SEQ ID NO.:17	xpt-G17-IR-2	gtgagtctatgggacccttgatgttttctttccctgctcttt cagggcaataatgatacaatgtatcatgccgagtaacgctgt ttctctaacttgtagGAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAAT GAAAAAAAATCTTCAGTAGAAGgtaatgtataatcgcgtagg atatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaagtgtccgac tacattacgcaccattctaaagaataacagtgataatttctg ggttaaggcaatagcaatatttctgcatataaatatttctgc atataaattgtaactgatgtaagaggtttcatattgctaata gcagctacaatccagctaccattctgcttttattttatgggtt gggataaggctggattattctgagtcgaagctaggccctttt gctaatacatgttcataacctcttatcttctctcccacag
SEQ ID NO.:18	xpt-G17-IR-3	gtgagtctatgggacccttgatgttttctttcccttctttt ctatgggtaagttcatgtgctcaaatcagggtaattttgcat ttgtaattttaaaaaatgcttttcttcttttaataacttttt tgtttatcttatttctaatactttccctaactctctttctttc agggcaataatgatacaatgtatcatgccgagtaacgctgtt tctctaacttgtagGAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATG AAAAAAAATCTTCAGTAGAAGgtaatgtataatcgcgtagga tatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaagtgtccgact acattacgcaccattctaaagaataacagtgataatttctgg gtaaggcaatagcaatatttctgcatataaatatttctgca tataaattgtaactgatgtaagaggtttcatattgctaatag cagctacaatccagctaccattctgcttttattttatgggtg ggataaggctggattattctgagtcgaagctaggcccttttg ctaatacatgttcataacctcttatcttctctcccacag
SEQ ID NO.:19	xpt-G17-IR-4	gtgagtctatgggacccttgatgttttctttcccttctttt ctatgggtaagttcatgtgctctttcagggcaataatgatac aatgtatcatgccgagtaacgctgttttctctaacttgtagGA ATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATGAAAAAAAATCTTCAG TAGAAGgtaatgtataatcgcgtaggatatggcacgcaagttt ctaccgggcaccgtaaagtgtccgactacattacgcaccattc taaagaataacagtgataatttctgggttaaggcaatagcaa tatttctgcatataaatatttctgcatataaattgtaactga tgtaagagggttcatattgctaatagcagctacaatccagct accattctgcttttattttatgggtgggataaggctggatta ttctgagtcgaagctaggcccttttgctaatacatgttcatac

SEQ ID NO.	Описание	Последовательность
		ctcttatcttctctccacag
SEQ ID NO.:20	xpt-G17-IR-5	gtgagtctatgggacccttgatgttttctttcccttctttt ctatgggtaagttcatgtcataggaaggggagaagtaacagg gtactgctcaaatacagggttaattttgcatttgtaattttaaa aaatgctttcttcttttaataatactttttgtttatcttatt tctaatactttccctaatactctttctttcagggcaataatga tacaatgtatcatgccgagtaacgctgtttctctaacttgta gGAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATGAAAAAAAATCTT CAGTAGAAGgtaatgtataatcgctggatatggcacgcaag tttctaccgggcaccgtaaatgtccgactacattacgcacca ttctaagaataacagtgataatttctgggttaaggcaatag caatatttctgcatataaatatttctgcatataaattgtaac tgatgtaagagggttcatattgctaatagcagctacaatcca gctaccattctgcttttattttatgggtgggataaggctgga ttattctgagtccaagctaggcccttttgctaatacatgttca tacctcttatcttctctccacag
SEQ ID NO.:21	xpt-G17-IR-6	gtgagtctatgggacccttgatgttttctttcccttctttt ctatgggtaagttcatgtcataggaaggggagaagtaacagg gtactgctctttcagggcaataatgatacaatgtatcatgcc gagtaacgctgtttctctaacttgtagGAATGAATTCAGATA TTTCCAGAGAATGAAAAAAAATCTTCAGTAGAAGgtaatgt ataatcgctggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccg taaatgtccgactacattacgcaccattctaagaataacag tgataatttctgggttaaggcaatagcaatatttctgcatat aaatatttctgcatataaattgtaactgatgtaagagggttc atattgctaatagcagctacaatccagctaccattctgcttt tattttatgggtgggataaggctggattattctgagtccaag ctaggcccttttgctaatacatgttcatactcttatcttctc ccacag
SEQ ID NO.:22	xpt-G17-IR-7	gtgagtctatgggacccttgatgttttctttcccttctttt ctatgggtaagttcatgtcataggaagtgtcaaatacagggt aattttgcatttgtaattttaaaaaatgctttcttcttttaa tatactttttgtttatcttatttctaatactttccctaatac tctttctttcagggcaataatgatacaatgtatcatgccgag taacgctgtttctctaacttgtagGAATGAATTCAGATATTT CCAGAGAATGAAAAAAAATCTTCAGTAGAAGgtaatgtata atcgctggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaa atgtccgactacattacgcaccattctaagaataacagtgga taatttctgggttaaggcaatagcaatatttctgcatataaa

SEQ ID NO.	Описание	Последовательность
		tatttctgcatataaattgtaactgatgtaagaggtttcata ttgctaatagcagctacaatccagctaccattctgcttttat tttatgggtgggataaggctggattattctgagtcgaagcta ggcccttttgctaatacatgttcatacctcttatcttcctccc acag
SEQ ID NO.:23	xpt-G17-IR-8	gtgagtctatgggacccttgatgttttctttcccttctttt ctatgggtaagtcatgtcataggaagtgtcttttcagggca ataatgatacaatgtatcatgccgagtaacgctgtttctcta acttgtagGAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATGAAAAA AAATCTTCAGTAGAAGgtaatgtataatcgcggtggatatggc acgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactacatta cgcaccattctaaagaataacagtgataatttctgggttaag gcaatagcaatatttctgcatataaatatttctgcatataaa ttgtaactgatgtaagaggtttcatattgctaatagcagcta caatccagctaccattctgcttttattttatgggtgggataa ggctggattattctgagtcgaagctaggcccttttgctaatac atgttcatacctcttatcttcctcccacag
SEQ ID NO.:24	xpt-G17-IR-9	gtgagtctatgggacccttgatgttttctttcccttctttt ctatgggtaagtcatgtcataggaaggggagaagtaacagg gtacacatatgaccaaatacagggttaattttgcatttgtaat tttaaaaaatgctttcttcttttaataatacttttttgtttat cttatttctaatactttccctaatactcttttctttcagggcaa taatgatacaatgtatcatgccgagtaacgctgtttctctaa cttgtagGAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATGAAAAA AATCTTCAGTAGAAGgtaatgtataatcgcggtggatatggca cgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactacattac gcaccattctaaagaataacagtgataatttctgggttaagg caatagctgctgctggattattctgagtcgaagctaggccct tttgctaatacatgttcatacctcttatcttcctcccacag
SEQ ID NO.:25	xpt-G17-IR-10	gtgagtctatgggacccttgatgttttctttcccttctttt ctatgggtaagtcatgtcataggaaggggagaagtaacagg gtacacatatgaccaaatacagggttaattttgcatttgtaat tttaaaaaatgctttcttcttttaataatacttttttgtttat cttatttctaatactttccctaatactcttttctttcagggcaa taatgatacaatgtatcatgccgagtaacgctgtttctctaa cttgtagGAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATGAAAAA AATCTTCAGTAGAAGgtaatgtataatcgcggtggatatggca cgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactacattac gcaccattctaaagaataacagtgataatttctgggttaagg caatagcaatatttctgcatataaatatttctgcatataaat

SEQ ID NO.	Описание	Последовательность
		tgtaactgatgtaagagggtttcatattgctaatagcagctac aatccagctgctgctggattattctgagtcgaagctaggccc ttttgctaatacatgttcatacctcttatcttctctccacag
SEQ ID NO.:26	xpt-G17-IR-11	gtgagtctatgggacccttgatgttttctttcccttctttt ctatggttaagttcatgtcataggaaggggagaagtaacagg gtacacatatattgaccaaatacagggttaattttgcatttgtaat tttaaaaaatgctttcttcttttaataatactttttgtttat cttattttctaatactttccctaatactcttttctttcagggcaa taatgatacaatgtatcatgccgagtaacgctgtttctctaa cttgtagGAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATGAAAAAA AATCTTCAGTAGAAGgtaatgtataatcgcgtagtatggca cgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactacattac gcaccattctaaagaataacagtgataatttctgggttaagg caatagctgctgaggtttcatattgctaatagcagctacaat ccagctaccattctgcttttattttatgggtgggataaggct ggattattctgagtcgaagctaggcccttttgctaatacatgt tcatacctcttatcttctctccacag
SEQ ID NO.:27	xpt-G17-IR-13	gtgagtctatgggacccttgatgttttctttcccttctttt ctatggttaagttcatgtcataggaaggggagaagtaacagg gtacacatatattgaccaaatacagggttaattttgcatttgtaat tttaaaaaatgctttcttcttttaataatactttttgtttat cttattttctaatactttccctaatactcttttctttcagggcaa taatgatacaatgtatcatgccgagtaacgctgtttctctaa cttgtagGAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATGAAAAAA AATCTTCAGTAGAAGgtaatgtataatcgcgtagtatggca cgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactacattac gcaccattctaaagaataacagtgataatttctgggttaagg caatagctgctctaccattctgcttttattttatgggtggga taaggctggattattctgagtcgaagctaggcccttttgcta atcatgttcatacctcttatcttctctccacag
SEQ ID NO.:28	xpt-G17-IR-15	gtgagtctatgggacccttgatgttttctttcccttctttt ctatggttaagttcatgtcataggaaggggagaagtaacagg gtacacatatattgaccaaatacagggttaattttgcatttgtaat tttaaaaaatgctttcttcttttaataatactttttgtttat cttattttctaatactttccctaatactcttttctttcagggcaa taatgatacaatgtatcatgccgagtaacgctgtttctctaa cttgtagGAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATGAAAAAA AATCTTCAGTAGAAGgtaatgtataatcgcgtagtatggca cgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactacattac gcaccattctaaagaataacagtgataatttctgggttaagg

SEQ ID NO.	Описание	Последовательность
		caatagctgctgcagctacaatccagctaccattctgctttt attttatggttgggataaggctggattattctgagtcgaagc taggcccttttgctaatacatgttcatacctcttatcttcctc ccacag
SEQ ID NO.:29	xpt-G17-2IR-1	gtgagtctatgggacccttgatgttttctttccctgctcaaa tcagggttaattttgcatttgtaattttaaaaaatgctttctt cttttaataatacttttttgtttatcttatttctaatactttc cctaatactcttttctttcagggaataatgatacaatgtatca tgccgagtaacgctgtttctctaacttgtagGAATGAATTCA GATATTTCCAGAGAATGAAAAAAAAATCTTCAGTAGAAGgta atgtataatcgctggatatggcacgcaagtttctaccgggc accgtaaagtccgactacattacgcaccattctaaagaata acagtataatttctgggttaaggcaatagctgctgctggat tattctgagtcgaagctaggcccttttgctaatacatgttcat acctcttatcttcctccacag
SEQ ID NO.:30	xpt-G17-2IR-2	gtgagtctatgggacccttgatgttttctttccctgctcaaa tcagggttaattttgcatttgtaattttaaaaaatgctttctt cttttaataatacttttttgtttatcttatttctaatactttc cctaatactcttttctttcagggaataatgatacaatgtatca tgccgagtaacgctgtttctctaacttgtagGAATGAATTCA GATATTTCCAGAGAATGAAAAAAAAATCTTCAGTAGAAGgta atgtataatcgctggatatggcacgcaagtttctaccgggc accgtaaagtccgactacattacgcaccattctaaagaata acagtataatttctgggttaaggcaatagcaatatttctgc atataaatatttctgcatataaattgtaactgatgtaagagg tttcatattgctaatagcagctacaatccagctgctgctgga ttattctgagtcgaagctaggcccttttgctaatacatgttca tacctcttatcttcctccacag
SEQ ID NO.:31	xpt-G17-2IR-3	gtgagtctatgggacccttgatgttttctttccctgctcaaa tcagggttaattttgcatttgtaattttaaaaaatgctttctt cttttaataatacttttttgtttatcttatttctaatactttc cctaatactcttttctttcagggaataatgatacaatgtatca tgccgagtaacgctgtttctctaacttgtagGAATGAATTCA GATATTTCCAGAGAATGAAAAAAAAATCTTCAGTAGAAGgta atgtataatcgctggatatggcacgcaagtttctaccgggc accgtaaagtccgactacattacgcaccattctaaagaata acagtataatttctgggttaaggcaatagctgctgaggttt catattgctaatagcagctacaatccagctaccattctgctt ttattttatggttgggataaggctggattattctgagtcgaa gctaggcccttttgctaatacatgttcatacctcttatcttcc

SEQ ID NO.	Описание	Последовательность
		tcccacag
SEQ ID NO.:32	xpt-G17-2IR-4	gtgagtctatgggacccttgatgttttctttccctgctcaaa tcagggttaattttgcatttgtaattttaaaaaatgctttctt cttttaataatacttttttgtttatcttatttctaatactttc cctaactctctttctttcagggaataatgatacaatgtatca tgccgagtaacgctgtttctctaacttgtagGAATGAATTCA GATATTTCCAGAGAATGAAAAAAAATCTTCAGTAGAAGgta atgtataatcgctggatatggcacgcaagtttctaccgggc accgtaaagtccgactacattacgcaccattctaagaata acagtataatttctgggttaaggcaatagctgctctacat tctgcttttattttatggttgggataaggctggattattctg agtccaagctaggcccttttgctaatacatgttcatacctctt atcttctctcccacag
SEQ ID NO.:33	xpt-G17-2IR-5	gtgagtctatgggacccttgatgttttctttccctgctcaaa tcagggttaattttgcatttgtaattttaaaaaatgctttctt cttttaataatacttttttgtttatcttatttctaatactttc cctaactctctttctttcagggaataatgatacaatgtatca tgccgagtaacgctgtttctctaacttgtagGAATGAATTCA GATATTTCCAGAGAATGAAAAAAAATCTTCAGTAGAAGgta atgtataatcgctggatatggcacgcaagtttctaccgggc accgtaaagtccgactacattacgcaccattctaagaata acagtataatttctgggttaaggcaatagctgctgcagcta caatccagctaccattctgcttttattttatggttgggataa ggctggattattctgagtccaagctaggcccttttgctaatac atgttcatacctcttatcttctctcccacag
SEQ ID NO.:34	xpt-G17-2IR-6	gtgagtctatgggacccttgatgttttctttcccttctttt ctatgggttaagttcatgtgctcaaatacagggttaattttgcat ttgtaattttaaaaaatgctttcttcttttaataatacttttt tgtttatcttatttctaatactttccctaactctctttctttc agggaataatgatacaatgtatcatgccgagtaacgctgtt tctctaacttgtagGAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATG AAAAAAAATCTTCAGTAGAAGgtaatgtataatcgctggga tatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaagtccgact acattacgcaccattctaagaataacagtataatttctgg gttaaggcaatagctgctgctggattattctgagtccaagct aggcccttttgctaatacatgttcatacctcttatcttctctcc cacag
SEQ ID NO.:35	xpt-G17-2IR-7	gtgagtctatgggacccttgatgttttctttcccttctttt ctatgggttaagttcatgtgctcaaatacagggttaattttgcat ttgtaattttaaaaaatgctttcttcttttaataatacttttt

SEQ ID NO.	Описание	Последовательность
		tgtttatcttattttctaatactttccctaactctctttctttc agggcaataatgatacaatgtatcatgccgagtaacgctggt tctctaacttgtagGAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATG AAAAAAAAAATCTTCAGTAGAAGgtaatgtataatcgcggtgga tatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaagtccgact acattacgcaccatttctaagaataacagtgataatttctgg gttaaggcaatagcaatatttctgcatataaatatttctgca tataaattgtaactgatgtaagaggtttcatattgctaatag cagctacaatccagctgctgctggattattctgagtcgaagc taggcccttttgctaactcatgttcatacctcttatcttcctc ccacag
SEQ ID NO.:36	xpt-G17-2IR-8	gtgagtctatgggacccttgatgttttctttcccttctttt ctatggttaagttcatgtgctcaaatacagggttaattttgcat ttgtaatttttaaaaaatgctttcttcttttaataacttttt tgtttatcttattttctaatactttccctaactctctttctttc agggcaataatgatacaatgtatcatgccgagtaacgctggt tctctaacttgtagGAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATG AAAAAAAAAATCTTCAGTAGAAGgtaatgtataatcgcggtgga tatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaagtccgact acattacgcaccatttctaagaataacagtgataatttctgg gttaaggcaatagctgctgagggtttcatattgctaatagcag ctacaatccagctaccattctgcttttattttatgggtggga taaggctggattattctgagtcgaagctaggcccttttgcta atcatgttcatacctcttatcttcctcccacag
SEQ ID NO.:37	xpt-G17-2IR-9	gtgagtctatgggacccttgatgttttctttcccttctttt ctatggttaagttcatgtgctcaaatacagggttaattttgcat ttgtaatttttaaaaaatgctttcttcttttaataacttttt tgtttatcttattttctaatactttccctaactctctttctttc agggcaataatgatacaatgtatcatgccgagtaacgctggt tctctaacttgtagGAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATG AAAAAAAAAATCTTCAGTAGAAGgtaatgtataatcgcggtgga tatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaagtccgact acattacgcaccatttctaagaataacagtgataatttctgg gttaaggcaatagctgctctaccattctgcttttattttatg gttgggataaggctggattattctgagtcgaagctaggccct tttgctaactcatgttcatacctcttatcttcctcccacag
SEQ ID NO.:38	xpt-G17-2IR-10	gtgagtctatgggacccttgatgttttctttcccttctttt ctatggttaagttcatgtgctcaaatacagggttaattttgcat ttgtaatttttaaaaaatgctttcttcttttaataacttttt tgtttatcttattttctaatactttccctaactctctttctttc

SEQ ID NO.	Описание	Последовательность
		agggcaataatgatacaatgtatcatgccgagtaacgctgtt tctctaacttgtagGAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATG AAAAAAAAAATCTTCAGTAGAAGgtaatgtataatcgcggtgga tatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgact acattacgcaccatttctaagaataacagtgataatctctgg gttaaggcaatagctgctgcagctacaatccagctaccattc tgcttttattttatggttgggataaggctggattattctgag tccaagctaggcccttttgctaatacatgttcatacctcttat cttcctcccacag
SEQ ID NO.: 39	xpt-G17-2IR-11	gtgagtctatgggacccttgatgttttctttccctgctcttt cagggcaataatgatacaatgtatcatgccgagtaacgctgt ttctctaacttgtagGAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAAT GAAAAAAAAATCTTCAGTAGAAGgtaatgtataatcgcggtg atatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgac tacattacgcaccatttctaagaataacagtgataatctctg ggtaaggcaatagctgctgctggattattctgagccaagc taggcccttttgctaatacatgttcatacctcttatcttcctc ccacag
SEQ ID NO.: 40	xpt-G17-2IR-12	gtgagtctatgggacccttgatgttttctttccctgctcttt cagggcaataatgatacaatgtatcatgccgagtaacgctgt ttctctaacttgtagGAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAAT GAAAAAAAAATCTTCAGTAGAAGgtaatgtataatcgcggtg atatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgac tacattacgcaccatttctaagaataacagtgataatctctg ggtaaggcaatagctgctctaccattctgcttttattttat ggttgggataaggctggattattctgagccaagctaggccc ttttgctaatacatgttcatacctcttatcttcctcccacag
SEQ ID NO.: 41	xpt-G17-2IR-13	gtgagtctatgggacccttgatgttttctttcccttctttt ctatgggtaagtcatgtgctctttcagggcaataatgatac aatgtatcatgccgagtaacgctgttttctctaacttgtagGA ATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATGAAAAAAAAATCTTCAG TAGAAGgtaatgtataatcgcggtgatatggcacgcaagttt ctaccgggcaccgtaaatgtccgactacattacgcaccattc taaagaataacagtgataatctctgggtaaggcaatagctg ctgctggattattctgagccaagctaggcccttttgctaata catgttcatacctcttatcttcctcccacag
SEQ ID NO.: 42	xpt-G17-2IR-14	gtgagtctatgggacccttgatgttttctttcccttctttt ctatgggtaagtcatgtgctctttcagggcaataatgatac aatgtatcatgccgagtaacgctgttttctctaacttgtagGA ATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATGAAAAAAAAATCTTCAG

SEQ ID NO.	Описание	Последовательность
		TAGAAGgtaatgtataatcgcggtggatatggcacgcaagttt ctaccgggcaccgtaaagtccgactacattacgcaccattc taaagaataacagtgataatttctgggttaaggcaatagctg ctctaccattctgcttttattttatggttgggataaggctgg attattctgagtcgaagctaggcccttttgctaatacatgttc atacctcttatcttctctccacag
SEQ ID NO.: 43	xpt-G17-2IR-15	gtgagtctatgggacccttgatgttttctttcccttctttt ctatgggttaagttcatgtcataggaaggggagaagtaacagg gtactgctctttcagggaataatgatacaatgtatcatgcc gagtaacgctgtttctctaacttgtagGAATGAATTCAGATA TTTCAGAGAATGAAAAAAAAATCTTCAGTAGAAGgtaatgt ataatcgcggtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccg taaagtccgactacattacgcaccattctaaagaataacag tgataatttctgggttaaggcaatagctgctgctggattatt ctgagtcgaagctaggcccttttgctaatacatgttcatacct cttatcttctctccacag
SEQ ID NO.: 44	xpt-G17-2IR-16	gtgagtctatgggacccttgatgttttctttcccttctttt ctatgggttaagttcatgtcataggaaggggagaagtaacagg gtactgctctttcagggaataatgatacaatgtatcatgcc gagtaacgctgtttctctaacttgtagGAATGAATTCAGATA TTTCAGAGAATGAAAAAAAAATCTTCAGTAGAAGgtaatgt ataatcgcggtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccg taaagtccgactacattacgcaccattctaaagaataacag tgataatttctgggttaaggcaatagctgctctaccattctg cttttattttatggttgggataaggctggattattctgagtc caagctaggcccttttgctaatacatgttcatacctcttatct tctctccacag
SEQ ID NO.: 45	xpt-G17-3ssC-1	gtgagtctatgggacccttgatgttttctttcccttctttt ctatgggttaagttcatgtcataggaaggggagaagtaacagg gtacacatatgaccaaatacagggttaattttgcatttgtaat tttaaaaaatgctttcttcttttaataacttttttgtttat cttattttctaatactttccctaatactcttttctttcaggga taatgatacaatgtatcatgccgagtaacgctgtttctctaa cttccccGAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATGAAAAA AATCTTCAGTAGAAGgtaatgtataatcgcggtggatatggca cgcaagtttctaccgggcaccgtaaagtccgactacattac gcaccattctaaagaataacagtgataatttctgggttaagg caatagcaatatttctgcatataaatatttctgcatataaat tgtaactgatgtaagaggtttcatattgctaatagcagctac aatccagctaccattctgcttttattttatggttgggataag

SEQ ID NO.	Описание	Последовательность
		gctggattattctgagtcgaagctaggcccttttgctaatcattgttcatacctcttatcttcctccacag
SEQ ID NO.:46	Рибосвитч xpt-G15	gtgagctctatgggacccttgatgttttctttcccttctttctatgggttaagttcatgtcataggaaggggagaagtaacagggtacacatatgtgaccaaatacagggttaattttgcatttgtaattttaaaaaatgctttctttttaataatactttttgtttatcttattttctaatactttccctaatactctttctttcagggtcaataatgatacaatgtatcatgccgagtaacgctgtttctctaaattgttagGAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATGAAAAAAATCTTCAGTAGAAGgtaatgtgtataatcgctggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactacacattacgcaccattctaaagaataacagtgtataattttctgggttaaggcaatagcaatattttctgcatataaatattttctgcatataaattgtactgatgtaagaggtttcatattgctaatagcagctacaatccagctaccattctgcttttattttatgggtgggataaggctggattattctgagtcgaagctaggcccttttgctaatacatgttcatacctcttatcttcctccacag
SEQ ID NO.:47	5' одноцепочечная DHFR дикого типа	gagtaacgctgtttctctaacttgtagGAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATGACCACAACCTCTTCAGTAGAAGgtaatgtg
SEQ ID NO.:48	DHFR 5' одноцепочечная C	gagtaacgctgtttctctaacttgtagGAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATGACCACAACCTCTTCAGTAGAAGcccctgtg
SEQ ID NO.:49	DHFR-Con1 5' одноцепочечная	gagtaacgctgtttctctaacttgtagGAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATGACCACAACCTCTTCAGTAGAGGgtgagttg
SEQ ID NO.:50	DHFR-Con4 5' одноцепочечная	gagtaacgctgtttctctaacttgtagGAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATGACCACAACCTCTTCAGTAGGAGgtgtggtg
SEQ ID NO.:51	DHFR дикого типа mtSRp40	gagtaacgctgtttctctaacttgtagGAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATGAAAAAAAATCTTCAGTAGAAGgtaatgtg
SEQ ID NO.:52	DHFR дикого типа сильнаяSC35	gagtaacgctgtttctctaacttgtagGAATGGCCCCCTGATATTTCCAGAGAATGACCACAACCTCTTCAGTAGAAGgtaatgtg
SEQ ID NO.:53	DHFR дикого типа SC35hnRNPA1	gagtaacgctgtttctctaacttgtagGAATGTAGGGAGATATTTCCAGAGAATGACCACAACCTCTTCAGTAGAAGgtaatgtg
SEQ ID	DHFR-Con1 5'	gagtaacgctgtttctctaacttgtagGAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATGACCACAACCTCTTCAGTAGAGGgtgagtt

SEQ ID NO.	Описание	Последовательность
NO.:54	одноцепочечная HP15	ggcgaaagccaaactcaccctct
SEQ ID NO.:55	DHFR-Con1 5' одноцепочечная HP15x	gagtaacgctgtttctctaacttgtagGAATGAATTCAGATA TTTCCAGAGAATGACCACAACCTCTTCAGTAGAGGgtgagtt ggcgaaaaacagcataaagtat
SEQ ID NO.:56	DHFR дикого типа mtSRp40 HP15	gagtaacgctgtttctctaacttgtagGAATGAATTCAGATA TTTCCAGAGAATGAAAAAAAAATCTTCAGTAGAAGgtaatgt ggcgaaagccacattaccttct
SEQ ID NO.:57	DHFR дикого типа mtSRp40 HP15X	gagtaacgctgtttctctaacttgtagGAATGAATTCAGATA TTTCCAGAGAATGAAAAAAAAATCTTCAGTAGAAGgtaatgt ggcgaaaaacagaactgagtat
SEQ ID NO.:58	Мутантная DHFR-e2 (mtDHFR)	gagtaacgctgtttctctaacttgtagGAATGAATTCAGATA TTTCCAGAGAATGAAAAAAAAATCTTCAGTAGAAGgtaatgt
SEQ ID NO.:59	Camk2d-e16	gagtaacgctgtttctctaacttgtagTGAGCCCCAACTAC TGTAATCCACAACCCTGACGGAAACAAGgtaatgt
SEQ ID NO.:60	Camk2d-e17	gagtaacgctgtttctctaacttgtagGAGTCAACTGAGAGC TCAAACACCACCATTGAGGATGAAGACGTGAAAGgtaatgt
SEQ ID NO.:61	mutWT1-e5	gagtaacgctgtttctctaacttgtagAGTTGCTGCTGAGAG CTCCAGCTCAGTGAAATGGACAGAAGGGCAGAGCAAgtaatg t
SEQ ID NO.:62	SIRT1-e6	tgtggtgtgttcaagaaacagaaataacttctttaataaagca tatatatgttgtttgttttttagGTTCCTTTGCAACAGCATCT TGCCTGATTTGTAAATACAAAGTTGACTGTGAAGCTGTACGA GGAGATATTTTTTAATCAGgtaatgt
SEQ ID NO.:63	Синтетический экзон	gagtaacgctgtttctctaacttgtagACAATCCTCGAACCA AACAACCAACAACCAACAATCCTCGAACCAACAATCCTC GAACCAACAATCCTCGAACCAAgtaatgt
SEQ ID NO.:64	Двойной xpt-G15	GCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATCAGGgtgagtcctatgg gacccttgatgttttctttcccttcttttctatgggttaagt tcatgtcataggaaggggagaagtaacagggtacacatatgtg accaaatacagggtatgtttgcatttgtaattttaaaaaatgc tttcttcttttaataatactttttgtttatcttattttcta actttccctaatactctttctttcagggaataatgatacaat gtatcatgccgagtaacgctgtttctctaacttgtagGAATG AATTCAGATATTTCCAGAGAATGAAAAAAAAATCTTCAGTAG AAGgtaatgtgtataatcgctggatatggcacgcaagtttc taccgggcaccgtaaatgtccgactacacattacgcaccatt ctaaagaataacagtgataatttctgggttaaggcaatagca atatttctgcatataaatatttctgcatataaattgtaactg

SEQ ID NO.	Описание	Последовательность
		atgtaagagggtttcatattgctaatagcagctacaatccagc taccattctgctttttattttatggttgggataaggctggatt attctgagtcgaagctaggcccttttgctaatacatgttcata cctcttatcttcctccacagCAAGGATATGGGCTCACTGAG ACTACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGGATGATAAA CCGGGCGCGGTCCGTAAAGTTGTTCCATTTTTTGAAGCGAAG GTTGTGGATCTGGATACCGGGAAAACGCTGGGCGTTAATCAA AGAGGCCAACTGTGTGTGAGAGGTCCTATGATTATGTCCGGT TATGTAAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAG GATGGATGGCTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAA GACGAACACTTCTTCATCGTTGACCGCCTGAAGTCTCTGATT AAGTACAAAGGgtgagtctatgggacccttgatgttttcttt cccccttcttttctatggttaagttcatgtcataggaagggga gaagtaacagggtacacatattgaccaaatacagggttaatttt gcatttgtaatttttaaaaaatgctttcttcttttaataact tttttgttatcttatttctaatactttccctaatactcttttc tttcagggaataatgatacaatgtatcatgccgagtaacgc tgtttctctaaactttagGAATGAATTCAGATATTTCCAGAG AATGAAAAAAAAATCTTCAGTAGAAGgtaatgtgtataatcg cgtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgt ccgactacacattacgcaccattctaagaataacagtgata atctctgggttaaggcaatagcaatatttctgcatataaata tttctgcatataaattgtaactgatgtaagagggtttcatatt gctaatagcagctacaatccagctaccattctgcttttattt tatggttgggataaggctggattattctgagtcgaagctagg cccttttgctaatacatgttcatacctcttatcttcctccac agCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCCATCTTGCTC C

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Meiragtx Limited

<120> РЕГУЛИРОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПОСРЕДСТВОМ АПТАМЕР-ОПОСРЕДОВАННОГО МОДУЛИРОВАНИЯ АЛЬТЕРНАТИВНОГО СПЛАЙСИНГА

<130> 162027.46176

<140> РСТ/US2016/016234

<141> 2016-02-02

<150> US 62/110,919

<151> 2015-02-02

<160> 64

<170> Патент в версии 3.5

<210> 1

<211> 539

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Luc1-IVSдельта-Luc1 в конструкции Con1 с интроном 2 бета-глобина человека, содержащем делецию («IVS2delta») обозначена строчными буквами, а фланкирующая последовательность люциферазы обозначена заглавными буквами.

<400> 1

gaggttccat ctgccaggta tcagggtgag tctatgggac ccttgatggt ttctttcccc 60

ttcttttcta tggttaagtt catgtcatag gaaggggaga agtaacaggg tacacatatt 120

gaccaaатca gggtaатттt gcатттgтаa ттттаааааа tgctттcttc ттттаатата	180
ctттттtgтт tatcttаттт cтаатactтт ccctaатctc тттctттcag ggcaатаатg	240
atacaатgта tcatgcctct ttgcaccatt cтааagaата acagtгатаa тттctgggтт	300
aaggcaатag caататттct gcatataаат атттctgcat атааатtgта actgatgтаa	360
gaggtттcat атtgctaата gcagctacaа tccagctacc аттctgctтт татттtatgg	420
ttgggатаag gctggattat tctgagtcca agctaggccc тттtgctaат catgttcата	480
cctcttatct tcctcccaca gcaaggatat gggctcactg agactacatc agctattct	539

<210> 2

<211> 521

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Luc1-IVSдельта-Luc1 в конструкции Con2

<400> 2

gattacaccc gagggggatg атааagтаag cctatgggac ccttgatgтт ttctттcccc	60
ttctттtcta tggттаagтт catgtcatag gaaggggaga agтаacaggg tacacatatt	120
gaccaaатca gggtaатттt gcатттgтаa ттттаааааа tgctттcttc ттттаатата	180
ctттттtgтт tatcttаттт cтаатactтт ccctaатctc тттctттcag ggcaатаатg	240

atacaatgta tcatgcctct ttgcaccatt ctaaagaata acagtgataa tttctgggtt	300
aaggcaatag caatatttct gcatataaat atttctgcat ataaattgta actgatgtaa	360
gaggtttcat attgctaata gcagctacaa tccagctacc attctgcttt tattttatgg	420
ttgggataag gctggattat tctgagtcca agctaggccc ttttgctaata catgttcata	480
cctcttatct tcctcccaca gccgggcgcg gtcggtaaag t	521

<210> 3

<211> 510

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Luc1-IVSдельта-Luc1 в конструкции Con3

<400> 3

ttcttcgcca aaagcagtaa gtctatggga cccttgatgt tttctttccc cttcttttct	60
atgggttaagt tcatgtcata ggaaggggag aagtaacagg gtacacatat tgaccaaatc	120
agggtaattt tgcatttgta attttaaaaa atgctttctt cttttaatat acttttttgt	180
ttatcttatt tctaatactt tccctaactt ctttctttca gggcaataat gatacaatgt	240
atcatgcctc tttgcacat tctaaagaat aacagtgata atttctgggt taaggcaata	300
gcaatatttc tgcataaaa tatttctgca tataaattgt aactgatgta agaggtttca	360

tattgcta at agcagctaca atccagctac cattctgctt ttattttatg gttgggataa	420
ggctggatta ttctgagtc aagctaggcc cttttgctaa tcatgttcat acctcttata	480
ttcctccac agctctgatt gacaaatacg	510
<210> 4	
<211> 517	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Luci-IVSдельта-Luci в конструкции Con4	
<400> 4	
aagagctgtt tctgaggagg tgtggctatg ggacccttga tgttttcttt ccccttcttt	60
tctatgggta agttcatgtc ataggaaggg gagaagtaac agggtaacata tattgaccaa	120
atcagggtta ttttgcatth gtaattttta aaaatgcttt cttcttttta tatacttttt	180
tgtttatctt atttctaata ctttccctaa tctctttctt tcagggaat aatgatacaa	240
tgatcatgc ctctttgcac cattctaaag aataacagtg ataatttctg ggttaaggca	300
atagcaatat ttctgcatat aaatatttct gcatataaat tgtaactgat gtaagaggtt	360
tcatattgct aatagcagct acaatccagc taccattctg cttttatttt atgggtggga	420
taaggctgga ttattctgag tccaagctag gcccttttgc taatcatgtt catacctctt	480

atcttctctcc cacagccttc aggattacaa gattcaa

517

<210> 5

<211> 519

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> LucI-IVSдельта-LucI в конструкции Con5

<400> 5

catctgccag gtatcagggg gagtctatgg gacccttgat gttttctttc cccttctttt 60

ctatgggttaa gttcatgtca taggaagggg agaagtaaca gggtaacacat attgaccaaa 120

tcagggtaat tttgcatttg taattttaaa aaatgctttc ttcttttaaat atactttttt 180

gtttatctta tttctaatac tttccctaata ctctttcttt cagggcaata atgatacaat 240

gtatcatgcc tctttgcacc attctaaaga ataacagtga taatttctgg gttaaggcaa 300

tagcaatatt tctgcatata aatatttctg catataaatt gtaactgatg taagagggtt 360

catattgcta atagcagcta caatccagct accattctgc ttttatttta tgggtgggat 420

aaggctggat tattctgagt ccaagctagg cccttttget aatcatgttc atacccttta 480

cttctatgac tgtagcaagg atatgggctc actgagact 519

<210> 6

<211> 521

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Luci-IVSдельта-Luci в конструкции Con6

<400> 6

tccatctgcc aggtatcagg gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tcccccttctt 60

ttctatgggt aagttcatgt cataggaagg ggagaagtaa cagggtacac atattgacca 120

aatcagggta attttgcatt tgtaatttta aaaaatgctt tcttctttta atatactttt 180

ttgtttatct tatttctaata actttcccta atctctttct ttcaggggcaa taatgatata 240

atgtatcatg cctctttgca ccattctaaa gaataacagt gataatttct gggttaaggc 300

aatagcaata tttctgcata taaatatttc tgcataataa ttgtaactga tgtaagaggt 360

ttcatattgc taatagcagc tacaatccag ctaccattct gcttttattt tatgggtggg 420

ataaggctgg attattctga gtccaagcta ggcccttttg ctaatcatgt tcataccgtg 480

actgtgtgta tgcacagcaa ggatatgggc tactgagac t 521

<210> 7

<211> 518

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Luci-IVSдельта-Luci в конструкции Con7

<400> 7

atctgccagg tatcaggggtg agtctatggg acccttgatg ttttctttcc ctttcttttc	60
tatgggtaag ttcatgtcat aggaagggga gaagtaacag ggtacacata ttgaccaa	120
cagggttaatt ttgcatttgt aattttaaaa aatgctttct tcttttaata tacttttttg	180
tttatcttat ttctaatact ttccctaate tctttctttc agggcaataa tgatacaatg	240
tatcatgcct ctttgcacca ttctaaagaa taacagtgat aatttctggg ttaaggcaat	300
agcaatattt ctgcatataa atatttctgc atataaattg taactgatgt aagaggtttc	360
atattgctaa tagcagctac aatccagcta ccattctgct tttattttat ggttgggata	420
aggctggatt attctgagtc caagctaggc ctttttgcta atcatgttca taccattgtg	480
atcgagcca atagcaagga tatgggctca ctgagact	518

<210> 8

<211> 85

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Экзон 2 DHFR с фланкирующей интронной последовательностью

<400> 8

gagtaacgct gtttctctaa cttgtaggaa tgaattcaga tatttccaga gaatgaccac 60

aacctcttca gtagaaggta atgtg 85

<210> 9

<211> 33

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Теофиллиновый аптамер

<400> 9

ggcgatacca gccgaaaggc ccttggcagc gtc 33

<210> 10

<211> 69

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Хрт-гуаниновый аптамер

<400> 10

cactcatata atcgcggtgga tatggcacgc aagtttctac cgggcaccgt aaatgtccga 60

ctatgggtg 69

<210> 11

<211> 63
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Ydh1-гуаниновый аптамер

<400> 11

ttgtataacc tcaataatat ggtttgaggg tgtctaccag gaaccgtaaa atcctgacta 60

саа 63

<210> 12
<211> 63
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Ydh1-адениновый аптамер

<400> 12

ttgtataacc tcaataatat ggtttgaggg tgtctaccag gaaccgtaaa atcctgatta 60

саа 63

<210> 13
<211> 63
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> addA-гуаниновый аптамер

<400> 13

tcatataatc ctaatgatat ggtttgggag tttctaccaa gagccttaaa ctcttgacta 60

tga 63

<210> 14

<211> 63

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> addA-адениновый аптамер

<400> 14

tcatataatc ctaatgatat ggtttgggag tttctaccaa gagccttaaa ctcttgatta 60

tga 63

<210> 15

<211> 617

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> xpt-G17 рибосвитч

<400> 15

gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tccccttctt ttctatgggt aagttcatgt 60

cataggaagg ggagaagtaa caggggtacac atattgacca aatcagggta attttgcatt	120
tgtaatttta aaaaatgctt tcttctttta atatactttt ttgtttatct tatttcta	180
actttcccta atctctttct ttcagggcaa taatgatata atgtatcatg ccgagtaacg	240
ctgtttctct aacttgtagg aatgaattca gatatttcca gagaatgaaa aaaaaatctt	300
cagtagaagg taatgtataa tcgctggat atggcacgca agtttctacc gggcacgta	360
aatgtccgac tacattacgc accattctaa agaataacag tgataatttc tgggttaagg	420
caatagcaat atttctgcat ataaatattt ctgcatataa attgtaactg atgtaagagg	480
tttcatattg ctaatagcag ctacaatcca gctaccattc tgcttttatt ttatggttgg	540
gataaggctg gattattctg agtccaagct aggccctttt gctaatacatg ttcataacctc	600
ttatcttcct cccacag	617

<210> 16

<211> 557

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> xpt-G17-IR-1

<400> 16

gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tccctgctca aatcagggta attttgcatt	60
---	----

tgtaatttta aaaaatgctt tcttctttta atatactttt ttgtttatct tattttcta	120
actttcccta atctctttct ttcagggcaa taatgatata atgtatcatg ccgagtaacg	180
ctgtttctct aacttgtagg aatgaattca gatatttcca gagaatgaaa aaaaaatctt	240
cagtagaagg taatgtataa tcgctggat atggcacgca agtttctacc gggcacgta	300
aatgtccgac tacattacgc accattctaa agaataacag tgataatttc tgggttaagg	360
caatagcaat atttctgcat ataaatattt ctgcatataa attgtaactg atgtaagagg	420
tttcatattg ctaatagcag ctacaatcca gctaccattc tgcttttatt ttatggttgg	480
gataaggctg gattattctg agtccaagct aggccctttt gctaatacatg ttcatacctc	540
ttatcttcct cccacag	557

<210> 17

<211> 457

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> xpt-G17-IR-2

<400> 17

gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tccctgctct ttcagggcaa taatgatata	60
atgtatcatg ccgagtaacg ctgtttctct aacttgtagg aatgaattca gatatttcca	120

gagaatgaaa aaaaaatctt cagtagaagg taatgtataa tcgctggat atggcacgca	180
agtttctacc gggcacgta aatgtccgac tacattacgc accattctaa agaataacag	240
tgataatttc tgggttaagg caatagcaat atttctgcat ataaatattt ctgcatataa	300
attgtaactg atgtaagagg tttcatattg ctaatagcag ctacaatcca gctaccattc	360
tgcttttatt ttatggttgg gataaggctg gattattctg agtccaagct aggccctttt	420
gctaatacatg ttcataacctc ttatcttcct cccacag	457

<210> 18

<211> 582

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> xpt-G17-IR-3

<400> 18

gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tccccttctt ttctatgggtt aagttcatgt	60
gctcaaatca gggtaatttt gcatttgtaa ttttaaaaaa tgctttcttc ttttaatata	120
cttttttggtt tatcttattt ctaatacttt ccctaacttc tttctttcag ggcaataatg	180
atacaatgta tcatgccgag taacgctggt tctctaactt gtaggaatga attcagatat	240
ttccagagaa tgaaaaaaaa atcttcagta gaaggtaatg tataatcgcg tggatatggc	300

acgcaagttt ctaccgggca ccgtaaattgt ccgactacat tacgcaccat tctaaagaat	360
aacagtgata atttctgggt taaggcaata gcaatatttc tgcatataaa tatttctgca	420
tataaattgt aactgatgta agaggtttca tattgctaata agcagctaca atccagctac	480
cattctgctt ttattttatg gttgggataa ggctggatta ttctgagtcc aagctaggcc	540
cttttgctaa tcatgttcat acctcttata ttctctccac ag	582

<210> 19

<211> 482

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> xpt-G17-IR-4

<400> 19

gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tccccttctt ttctatgggt aagttcatgt	60
gctctttcag ggcaataatg atacaatgta tcatgccgag taacgctggt tctctaactt	120
gtaggaatga attcagatat ttccagagaa tgaaaaaaaa atcttcagta gaaggtaatg	180
tataatcgcg tggatatggc acgcaagttt ctaccgggca ccgtaaattgt ccgactacat	240
tacgcaccat tctaaagaat aacagtgata atttctgggt taaggcaata gcaatatttc	300
tgcatataaa tatttctgca tataaattgt aactgatgta agaggtttca tattgctaata	360

agcagctaca atccagctac cattctgctt ttattttatg gttgggataa ggctggatta 420

ttctgagtcc aagctaggcc cttttgctaa tcatgttcat acctcttata ttcctcccac 480

ag 482

<210> 20

<211> 611

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> xpt-G17-IR-5

<400> 20

gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tccccttctt ttctatgggt aagttcatgt 60

cataggaagg ggagaagtaa cagggtactg ctcaaatacag ggtaattttg catttgtaat 120

tttaaaaaat gcttttcttct tttaataatac ttttttggtt atcttatttc taatactttc 180

cctaactctt ttctttcagg gcaataatga tacaatgtat catgccgagt aacgctgttt 240

ctctaacttg taggaatgaa ttcagatatt tccagagaat gaaaaaaaaa tcttcagtag 300

aaggtaatgt ataatcgctt ggatatggca cgcaagtttc taccgggcac cgtaaagtgc 360

cgactacatt acgcaccatt ctaaagaata acagtataa tttctggggt aaggcaatag 420

caatatttct gcatataaat atttctgcat ataaattgta actgatgtaa gaggtttcat 480

attgctaata gcagctacaa tccagctacc attctgcttt tatttttatgg ttgggataag 540

gctggattat tctgagtcca agctaggccc ttttgctaata catgttcata cctcttatct 600

tcctcccaca g 611

<210> 21

<211> 511

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> xpt-G17-IR-6

<400> 21

gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tccccttctt ttctatgggt aagttcatgt 60

cataggaagg ggagaagtaa cagggtactg ctctttcagg gcaataatga tacaatgtat 120

catgccgagt aacgctgttt ctctaacttg taggaatgaa ttcagatatt tccagagaat 180

gaaaaaaaaa tcttcagtag aaggtaatgt ataatcgctg ggatatggca cgcaagtttc 240

taccgggcac cgtaaagtgc cgactacatt acgcaccatt ctaaagaata acagtgataa 300

tttctgggtt aaggcaatag caatatttct gcatataaat atttctgcat ataaattgta 360

actgatgtaa gaggtttcat attgctaata gcagctacaa tccagctacc attctgcttt 420

tatttttatgg ttgggataag gctggattat tctgagtcca agctaggccc ttttgctaata 480

catgttcata cctcttatct tcctcccaca g

511

<210> 22

<211> 592

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> xpt-G17-IR-7

<400> 22

gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tccccctctt ttctatgggt aagttcatgt 60

cataggaagt gctcaaatca gggtaatttt gcatttgtaa ttttaaaaaa tgctttcttc 120

ttttaatata cttttttgtt tatcttattt ctaatacttt ccctaattct tttctttcag 180

ggcaataatg atacaatgta tcatgccgag taacgctgtt tctctaactt gtaggaatga 240

attcagatat ttccagagaa tgaaaaaaaa atcttcagta gaaggtaatg tataatcgcg 300

tggatatggc acgcaagttt ctaccgggca ccgtaaagt ccgactacat tacgcaccat 360

tctaaagaat aacagtgata atttctgggt taaggcaata gcaatatttc tgcatataaa 420

tatttctgca tataaattgt aactgatgta agaggtttca tattgctaат agcagctaca 480

atccagctac cattctgctt ttattttatg gttgggataa ggctggatta ttctgagtcc 540

aagctaggcc cttttgctaa tcatgttcat acctcttctc tcctcccac ag 592

<210> 23

<211> 492

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> xpt-G17-IR-8

<400> 23

gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tccccttctt ttctatgggt aagttcatgt 60

cataggaagt gctctttcag ggcaataatg atacaatgta tcatgccgag taacgctggt 120

tctctaactt gtaggaatga attcagatat ttccagagaa tgaaaaaaaa atcttcagta 180

gaaggtaatg tataatcgcg tggatatggc acgcaagttt ctaccgggca ccgtaaattgt 240

ccgactacat tacgcaccat tctaaagaat aacagtgata atttctgggt taaggcaata 300

gcaatatttc tgcatataaa tatttctgca tataaattgt aactgatgta agaggtttca 360

tattgctaат agcagctaca atccagctac cattctgctt ttattttatg gttgggataa 420

ggctggatta ttctgagtcc aagctaggcc cttttgctaa tcatgttcat acctcttatac 480

ttcctccac ag 492

<210> 24

<211> 502

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> xpt-G17-IR-9

<400> 24

gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tccccttctt ttctatgggt aagttcatgt 60

cataggaagg ggagaagtaa caggggtacac atattgacca aatcagggtta attttgcatt 120

tgtaatttta aaaaatgctt tcttctttta atatactttt ttgtttatct tatttctaata 180

actttcccta atctctttct ttcagggcaa taatgataca atgtatcatg ccgagtaacg 240

ctgtttctct aacttgtagg aatgaattca gatatttcca gagaatgaaa aaaaaatctt 300

cagtagaagg taatgtataa tcgcgtggat atggcacgca agtttctacc gggcaccgta 360

aatgtccgac tacattacgc accattctaa agaataacag tgataatttc tgggttaagg 420

caatagctgc tgctggatta ttctgagtcc aagctaggcc cttttgctaa tcatgttcat 480

acctcttatc ttctccac ag 502

<210> 25

<211> 587

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> xpt-G17-IR-10

<400> 25

gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tccccttctt ttctatgggt aagttcatgt 60

cataggaagg ggagaagtaa caggggtacac atattgacca aatcagggtta attttgcatt 120

tgtaatttta aaaaatgctt tcttctttta atatactttt ttgtttatct tatttctaata 180

actttcccta atctctttct ttcagggtcaa taatgatata atgtatcatg ccgagtaacg 240

ctgtttctct aacttgtagg aatgaattca gatatttcca gagaatgaaa aaaaaatctt 300

cagtagaagg taatgtataa tcgctgtgat atggcacgca agtttctacc gggcaccgta 360

aatgtccgac tacattacgc accattctaa agaataacag tgataatttc tgggttaagg 420

caatagcaat atttctgcat ataaatattt ctgcatataa attgtaactg atgtaagagg 480

tttcatattg ctaatagcag ctacaatcca gctgctgctg gattattctg agtccaagct 540

aggccctttt gctaatacatg ttcataacctc ttatcttcct cccacag 587

<210> 26

<211> 572

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> xpt-G17-IR-11

<400> 26

gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tcccccttctt ttctatgggtt aagttcatgt 60

cataggaagg ggagaagtaa caggggtacac atattgacca aatcagggtta attttgcatt 120

tgtaatttta aaaaatgctt tcttctttta atatactttt ttgtttatct tattttctaatt 180

actttcccta atctctttct ttcagggcaa taatgatata atgtatcatg ccgagtaacg 240

ctgtttctct aacttgtagg aatgaattca gatatttcca gagaatgaaa aaaaaatctt 300

cagtagaagg taatgtataa tcgctgggat atggcacgca agtttctacc gggcaccgta 360

aatgtccgac tacattacgc accattctaa agaataacag tgataatttc tgggttaagg 420

caatagctgc tgaggtttca tattgctaatt agcagctaca atccagctac cattctgctt 480

ttattttatg gttgggataa ggctggatta ttctgagtcc aagctaggcc cttttgctaa 540

tcatgttcat acctcttctc ttcctccac ag 572

<210> 27

<211> 537

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> xpt-G17-IR-13

<400> 27

gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tcccccttctt ttctatgggtt aagttcatgt 60

cataggaagg ggagaagtaa caggggtacac atattgacca aatcagggta attttgcatt	120
tgtaatttta aaaaatgctt tcttctttta atatactttt ttgtttatct tatttcta	180
actttcccta atctctttct ttcagggcaa taatgatata atgtatcatg ccgagtaacg	240
ctgtttctct aactttagg aatgaattca gatatttcca gagaatgaaa aaaaatctt	300
cagtagaagg taatgtataa tcgctggat atggcacgca agtttctacc gggcacgta	360
aatgtccgac tacattacgc accattctaa agaataacag tgataatttc tgggttaagg	420
caatagctgc tctaccattc tgcttttatt ttatggttgg gataaggctg gattattctg	480
agtccaagct aggccctttt gctaatacatg ttcatacctc ttatcttctt cccacag	537

<210> 28

<211> 552

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> xpt-G17-IR-15

<400> 28

gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tcccccttctt ttctatgggtt aagttcatgt	60
cataggaagg ggagaagtaa caggggtacac atattgacca aatcagggta attttgcatt	120
tgtaatttta aaaaatgctt tcttctttta atatactttt ttgtttatct tatttcta	180

actttcccta atctctttct ttcagggcaa taatgatata atgtatcatg ccgagtaacg	240
ctgtttctct aacttgtagg aatgaattca gatatttcca gagaatgaaa aaaaaatctt	300
cagtagaagg taatgtataa tcgcgtggat atggcacgca agtttctacc gggcaccgta	360
aatgtccgac tacattacgc accattctaa agaataacag tgataatttc tgggttaagg	420
caatagctgc tgcagctaca atccagctac cattctgctt ttattttatg gttgggataa	480
ggctggatta ttctgagtcc aagctaggcc cttttgctaa tcatgttcat acctcttacc	540
ttctctccac ag	552

<210> 29

<211> 442

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> xpt-G17-2IR-1

<400> 29

gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tccctgctca aatcagggtta attttgcatt	60
tgtaatttta aaaaatgctt tcttctttta atatactttt ttgtttatct tattttcta	120
actttcccta atctctttct ttcagggcaa taatgatata atgtatcatg ccgagtaacg	180
ctgtttctct aacttgtagg aatgaattca gatatttcca gagaatgaaa aaaaaatctt	240

cagtagaagg taatgtataa tcgcgtggat atggcacgca agtttctacc gggcaccgta 300

aatgtccgac tacattacgc accattctaa agaataacag tgataatttc tgggttaagg 360

caatagctgc tgctggatta ttctgagtc aagctaggcc cttttgctaa tcatgttcat 420

acctcttatc ttcctcccac ag 442

<210> 30

<211> 527

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> xpt-G17-2IR-2

<400> 30

gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tccctgctca aatcagggtta attttgcatt 60

tgtaatttta aaaaatgctt tcttctttta atatactttt ttgtttatct tattttcta 120

actttcccta atctctttct ttcagggcaa taatgatata atgtatcatg ccgagtaacg 180

ctgtttctct aacttgtagg aatgaattca gatatttcca gagaatgaaa aaaaaatctt 240

cagtagaagg taatgtataa tcgcgtggat atggcacgca agtttctacc gggcaccgta 300

aatgtccgac tacattacgc accattctaa agaataacag tgataatttc tgggttaagg 360

caatagcaat atttctgcat ataaatattt ctgcatataa attgtaactg atgtaagagg 420

tttcatattg ctaatagcag ctacaatcca gctgctgctg gattattctg agtccaagct 480

aggccctttt gctaatacatg ttcataacctc ttatcttcct cccacag 527

<210> 31

<211> 512

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> xpt-G17-2IR-3

<400> 31

gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tccctgctca aatcagggtg attttgcatt 60

tgtaatttta aaaaatgctt tcttctttta atatactttt ttgtttatct tatttctaata 120

actttcccta atctctttct ttcagggtcaa taatgatata atgtatcatg ccgagtaacg 180

ctgtttctct aacttgtagg aatgaattca gatatttcca gagaatgaaa aaaaaatctt 240

cagtagaagg taatgtataa tcgctgggat atggcacgca agtttctacc gggcaccgta 300

aatgtccgac tacattacgc accattctaa agaataacag tgataatttc tgggttaagg 360

caatagctgc tgaggtttca tattgctaata agcagctaca atccagctac cattctgctt 420

ttattttatg gttgggataa ggctggatta ttctgagtcc aagctaggcc cttttgctaa 480

tcatgttcat acctcttatc ttcctccac ag 512

<210> 32

<211> 477

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> xpt-G17-2IR-4

<400> 32

gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tccctgctca aatcagggtg attttgcatt 60

tgtaatttta aaaaatgctt tcttctttta atatactttt ttgtttatct tatttctaata 120

actttcccta atctctttct ttcagggtgca taatgatata atgtatcatg ccgagtaacg 180

ctgtttctct aacttgtagg aatgaattca gatattttcca gagaatgaaa aaaaaatctt 240

cagtagaagg taatgtataa tcgctgtgat atggcacgca agtttctacc gggcacctga 300

aatgtccgac tacattacgc accattctaa agaataacag tgataatttc tgggttaagg 360

caatagctgc tctaccattc tgcttttatt ttatgggttg gataaggctg gattattctg 420

agtccaagct aggccctttt gctaatacatg ttcataacctc ttatcttcct cccacag 477

<210> 33

<211> 492

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> xpt-G17-2IR-5

<400> 33

gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tccctgctca aatcagggtta attttgcatt 60

tgtaatttta aaaaatgctt tcttctttta atatactttt ttgtttatct tatttctaata 120

actttcccta atctctttct ttcagggtcaa taatgataca atgtatcatg ccgagtaacg 180

ctgtttctct aacttgtagg aatgaattca gatatttcca gagaatgaaa aaaaaatctt 240

cagtagaagg taatgtataa tcgctgggat atggcacgca agtttctacc gggcaccgta 300

aatgtccgac tacattacgc accattctaa agaataacag tgataatttc tgggttaagg 360

caatagctgc tgcagctaca atccagctac cattctgctt ttattttatg gttgggataa 420

ggctggatta ttctgagtcc aagctaggcc cttttgctaa tcatgttcat acctcttatac 480

ttcctccac ag 492

<210> 34

<211> 467

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> xpt-G17-2IR-6

<400> 34

gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tcccccttctt ttctatgggt aagttcatgt 60

gctcaaatca gggtaatttt gcatttgtaa ttttaaaaaa tgctttcttc ttttaatata 120

cttttttggt tatcttattt ctaatacttt ccctaattctc tttctttcag ggcaataatg 180

atacaatgta tcatgccgag taacgctggt tctctaactt gtaggaatga attcagatat 240

ttccagagaa tgaaaaaaaa atcttcagta gaaggtaatg tataatcgcg tggatatggc 300

acgcaagttt ctaccgggca ccgtaaagt cgcactacat tacgcaccat tctaaagaat 360

aacagtgata atttctgggt taaggcaata gctgctgctg gattattctg agtccaagct 420

aggccctttt gctaatactg ttcataacctc ttatcttcct cccacag 467

<210> 35

<211> 552

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> xpt-G17-2IR-7

<400> 35

gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tcccccttctt ttctatgggt aagttcatgt 60

gctcaaatca gggtaatttt gcatttgtaa ttttaaaaaa tgctttcttc ttttaatata 120

cttttttggt tatcttattt ctaatacttt ccctaattctc tttctttcag ggcaataatg 180

atacaatgta tcatgccgag taacgctggt tctctaactt gtaggaatga attcagatat	240
ttccagagaa tgaaaaaaaa atcttcagta gaaggtaatg tataatcgcg tggatatggc	300
acgcaagttt ctaccgggca ccgtaaagt cgcactacat tacgcaccat tctaaagaat	360
aacagtgata atttctgggt taaggcaata gcaatatttc tgcataataa tatttctgca	420
tataaattgt aactgatgta agaggtttca tattgctaata agcagctaca atccagctgc	480
tgctggatta ttctgagtc aagctaggcc cttttgctaa tcatgttcat acctcttatt	540
ttctctccac ag	552

<210> 36

<211> 537

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> xpt-G17-2IR-8

<400> 36

gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tccccttctt ttctatgggt aagttcatgt	60
gctcaaata gggtaatttt gcatttgtaa ttttaaaaaa tgctttcttc ttttaataata	120
cttttttggt tatcttattt ctaatacttt ccctaattct tttctttcag ggcaataatg	180
atacaatgta tcatgccgag taacgctggt tctctaactt gtaggaatga attcagatat	240

ttccagagaa tgaaaaaaa atcttcagta gaaggtaatg tataatcgcg tggatatggc	300
acgcaagttt ctaccgggca ccgtaaagt cgcactacat tacgcacat tctaaagaat	360
aacagtgata atttctgggt taaggcaata gctgctgagg ttcatattg ctaatagcag	420
ctacaatcca gctaccattc tgcttttatt ttatggttg gataaggctg gattattctg	480
agtccaagct aggcctttt gctaattcatg ttcatactc ttatcttct cccacag	537

<210> 37

<211> 502

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> xpt-G17-2IR-9

<400> 37

gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tccccttctt ttctatggtt aagttcatgt	60
gctcaaatca gggtaatttt gcatttgtaa ttttaaaaaa tgctttcttc ttttaatata	120
cttttttggt tatcttattt ctaatacttt ccctaacttc tttctttcag ggcaataatg	180
atacaatgta tcatgccgag taacgctgtt tctctaactt gtaggaatga attcagatat	240
ttccagagaa tgaaaaaaa atcttcagta gaaggtaatg tataatcgcg tggatatggc	300
acgcaagttt ctaccgggca ccgtaaagt cgcactacat tacgcacat tctaaagaat	360

aacagtgata atttctgggt taaggcaata gctgctctac cattctgctt ttattttatg 420

gttgggataa ggctggatta ttctgagtc aagctaggcc cttttgctaa tcatgttcat 480

acctcttatc ttctctccac ag 502

<210> 38

<211> 517

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> xpt-G17-2IR-10

<400> 38

gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tccccttctt ttctatgggt aagttcatgt 60

gctcaaatca gggtaatttt gcatttgtaa ttttaaaaaa tgctttcttc ttttaatata 120

cttttttggt tatcttatct ctaatacttt ccctaattct tttctttcag ggcaataatg 180

atacaatgta tcatgccgag taacgctgtt tctctaactt gtaggaatga attcagatat 240

ttccagagaa tgaaaaaaaa atcttcagta gaaggtaatg tataatcgcg tggatatggc 300

acgcaagttt ctaccgggca ccgtaaagt cgcactacat tacgcaccat tctaaagaat 360

aacagtgata atttctgggt taaggcaata gctgctgcag ctacaatcca gctaccattc 420

tgcttttatt ttatgggttg gataaggctg gattattctg agtccaagct aggccctttt 480

gctaatacatg ttcatacctc ttatcttcct cccacag

517

<210> 39

<211> 342

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> xpt-G17-2IR-11

<400> 39

gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tccttgcctt ttcagggcaa taatgataca 60

atgtatcatg ccgagtaacg ctgtttctct aacttgtagg aatgaattca gatatttcca 120

gagaatgaaa aaaaaatctt cagtagaagg taatgtataa tcgcgtggat atggcacgca 180

agtttctacc gggcacgta aatgtccgac tacattacgc accattctaa agaataacag 240

tgataatttc tgggttaagg caatagctgc tgctggatta ttctgagtc aagctaggcc 300

cttttgctaa tcatgttcat acctcttacc ttcttccac ag 342

<210> 40

<211> 377

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> xpt-G17-2IR-12

<400> 40

gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tccctgctct ttcagggcaa taatgataca 60

atgtatcatg ccgagtaacg ctgtttctct aacttgtagg aatgaattca gatatttcca 120

gagaatgaaa aaaaaatctt cagtagaagg taatgtataa tcgctgtggat atggcacgca 180

agtttctacc gggcacgta aatgtccgac tacattacgc accattctaa agaataacag 240

tgataatttc tgggttaagg caatagctgc tctaccattc tgcttttatt ttatggttgg 300

gataaggctg gattattctg agtccaagct aggccttttt gctaatacatg ttcataacctc 360

ttatcttcct cccacag 377

<210> 41

<211> 367

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> xpt-G17-2IR-13

<400> 41

gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tcccccttctt ttctatgggtt aagttcatgt 60

gctctttcag ggcaataatg atacaatgta tcatgccgag taacgctggt tctctaactt 120

gtaggaatga attcagatat ttccagagaa tgaaaaaaaa atcttcagta gaaggtaatg 180

tataatcgcg tggatatggc acgcaagttt ctaccgggca ccgtaaagt ccgactacat 240

tacgcaccat tctaaagaat aacagtgata atttctgggt taaggcaata gctgctgctg 300

gattattctg agtccaagct aggccctttt gctaatacatg ttcataacctc ttatcttctt 360

cccacag 367

<210> 42

<211> 402

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> xpt-G17-2IR-14

<400> 42

gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tccccttctt ttctatgggt aagttcatgt 60

gctctttcag ggcaataatg atacaatgta tcatgccgag taacgctggt tctctaactt 120

gtaggaatga attcagatat ttccagagaa tgaaaaaaaa atcttcagta gaaggtaatg 180

tataatcgcg tggatatggc acgcaagttt ctaccgggca ccgtaaagt ccgactacat 240

tacgcaccat tctaaagaat aacagtgata atttctgggt taaggcaata gctgctctac 300

cattctgctt ttattttatg gttgggataa ggctggatta ttctgagtc aagctaggcc 360

cttttgctaa tcatgttcat acctcttctc ttctctccac ag 402

<210> 43
<211> 396
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> xpt-G17-2IR-15

<400> 43

gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tccccttctt ttctatgggt aagttcatgt 60

cataggaagg ggagaagtaa caggggtactg ctcttttcagg gcaataatga tacaatgtat 120

catgccgagt aacgctgttt ctctaacttg taggaatgaa ttcagatatt tccagagaat 180

gaaaaaaaaa tcttcagtag aaggtaatgt ataatcgctg ggatatggca cgcaagtttc 240

taccgggcac cgtaaagtgc cgactacatt acgcaccatt ctaaagaata acagtgataa 300

tttctgggtt aaggcaatag ctgctgctgg attattctga gtccaagcta ggcccttttg 360

ctaatcatgt tcatacctct tatcttcctc ccacag 396

<210> 44

<211> 431

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> xpt-G17-2IR-16

<400> 44

gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tccccttctt ttctatgggt aagttcatgt 60

cataggaagg ggagaagtaa caggggtactg ctctttcagg gcaataatga tacaatgtat 120

catgccgagt aacgctgttt ctctaacttg taggaatgaa ttcagatatt tccagagaat 180

gaaaaaaaaa tcttcagtag aaggtaatgt ataatcgct ggatatggca cgcaagtttc 240

taccgggcac cgtaaattgc cgactacatt acgcaccatt ctaaagaata acagtgataa 300

tttctgggtt aaggcaatag ctgctctacc attctgcttt tattttatgg ttgggataag 360

gctggattat tctgagtcca agctaggccc ttttgctaata catgttcata cctcttatct 420

tcctcccaca g 431

<210> 45

<211> 617

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> xpt-G17-3ssC-1

<400> 45

gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tccccttctt ttctatgggt aagttcatgt 60

cataggaagg ggagaagtaa caggggtacac atattgacca aatcagggtta attttgcatt 120

tgtaatttta aaaaatgctt tcttctttta atatactttt ttgtttatct tattttcta	180
actttcccta atctctttct ttcagggcaa taatgatata atgtatcatg ccgagtaacg	240
ctgtttctct aacttccccg aatgaattca gatatttcca gagaatgaaa aaaaaatctt	300
cagtagaagg taatgtataa tcgctgggat atggcacgca agtttctacc gggcaccgta	360
aatgtccgac tacattacgc accattctaa agaataacag tgataatttc tgggttaagg	420
caatagcaat atttctgcat ataaatattt ctgcatataa attgtaactg atgtaagagg	480
tttcatattg ctaatagcag ctacaatcca gctaccattc tgcttttatt ttatgggttg	540
gataaggctg gattattctg agtccaagct aggccctttt gctaatacatg ttcatacctc	600
ttatcttcct cccacag	617

<210> 46

<211> 621

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> хрт-G15 рибосвитч

<400> 46

gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tccccttctt ttctatgggt aagttcatgt	60
cataggaagg ggagaagtaa caggggtacac atattgacca aatcagggta attttgcatt	120

tgtaatttta aaaaatgctt tcttctttta atatactttt ttgtttatct tattttcta	180
actttcccta atctctttct ttcagggcaa taatgatata atgtatcatg ccgagtaacg	240
ctgtttctct aacttgtagg aatgaattca gatatttcca gagaatgaaa aaaaaatctt	300
cagtagaagg taatgtgtat aatcgctggg atatggcacg caagtttcta ccgggcaccg	360
taaatgtccg actacacatt acgcaccatt ctaaagaata acagtgataa tttctgggtt	420
aaggcaatag caatatttct gcatataaat atttctgcat ataaattgta actgatgtaa	480
gaggtttcat attgctaata gcagctacaa tccagctacc attctgcttt tattttatgg	540
ttgggataag gctggattat tctgagtcca agctaggccc ttttgctaata catgttcata	600
cctcttatct tcctcccaca g	621

<210> 47

<211> 85

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> DHFR дикого типа 5' одноцепочечная

<400> 47

gagtaacgct gtttctctaa cttgtaggaa tgaattcaga tatttccaga gaatgaccac	60
---	----

aacctcttca gtagaaggta atgtg	85
-----------------------------	----

<210> 48

<211> 85

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> DHFR 5' одноцепочечнаяС

<400> 48

gagtaacgct gtttctctaa cttgtaggaa tgaattcaga tatttccaga gaatgaccac 60

aacctcttca gtagaagccc ctgtg 85

<210> 49

<211> 85

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> DHFR-Con1 5' одноцепочечная

<400> 49

gagtaacgct gtttctctaa cttgtaggaa tgaattcaga tatttccaga gaatgaccac 60

aacctcttca gtagagggtg agttg 85

<210> 50

<211> 85

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> DHFR-Con4 5' одноцепочечная

<400> 50

gagtaacgct gtttctctaa cttgtaggaa tgaattcaga tatttccaga gaatgaccac 60

aacctcttca gtaggaggtg tgggtg 85

<210> 51

<211> 85

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> DHFR дикого типа mtSRp40

<400> 51

gagtaacgct gtttctctaa cttgtaggaa tgaattcaga tatttccaga gaatgaaaaa 60

aaaatcttca gtagaaggta atgtg 85

<210> 52

<211> 85

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> DHFR дикого типа strongSC35

<400> 52

gagtaacgct gtttctctaa cttgtaggaa tggcccctga tatttccaga gaatgaccac 60

aacctcttca gtagaaggta atgtg 85

<210> 53

<211> 85

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> DHFR дикого типа SC35hnRNPA1

<400> 53

gagtaacgct gtttctctaa cttgtaggaa tgtagggaga tatttccaga gaatgaccac 60

aacctcttca gtagaaggta atgtg 85

<210> 54

<211> 106

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> DHFR-Con1 5' одноцепочечная HP15

<400> 54

gagtaacgct gtttctctaa cttgtaggaa tgaattcaga tatttccaga gaatgaccac 60

aacctcttca gtagagggtg agttggcgaa agccaactca ccttct 106

<210> 55

<211> 106

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> DHFR-Con1 5' одноцепочечная HP15x

<400> 55

gagtaacgct gtttctctaa cttgtaggaa tgaattcaga tatttccaga gaatgaccac 60

aacctcttca gtagagggtg agttggcgaa aaacagcata aagtat 106

<210> 56

<211> 106

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> DHFR дикого типа mtSRp40 HP15

<400> 56

gagtaacgct gtttctctaa cttgtaggaa tgaattcaga tatttccaga gaatgaaaaa 60

aaaatcttca gtagaaggta atgtggcgaa agccacatta ccttct 106

<210> 57
<211> 106
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> DHFR дикого типа mtSRp40 HP15X

<400> 57

gagtaacgct gtttctctaa cttgtaggaa tgaattcaga tatttccaga gaatgaaaaa 60

aaaatcttca gtagaaggta atgtggcgaa aaacagaact gagtat 106

<210> 58
<211> 84
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Мутантная DHFR-e2 (mtDHFR)

<400> 58

gagtaacgct gtttctctaa cttgtaggaa tgaattcaga tatttccaga gaatgaaaaa 60

aaaatcttca gtagaaggta atgt 84

<210> 59
<211> 77
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Camk2d-e16

<400> 59

gagtaacgct gtttctctaa cttgtagtga gcccctaaact actgtaatcc acaaccctga 60

cggaacaag gtaatgt 77

<210> 60

<211> 83

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Camk2d-e17

<400> 60

gagtaacgct gtttctctaa cttgtaggag tcaactgaga gctcaaacac caccattgag 60

gatgaagacg tgaaaggtaa tgt 83

<210> 61

<211> 85

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mutWT1-e5

<400> 61

gagtaacgct gtttctctaa cttgtagagt tgctgctgag agctccagct cagtgaaatg 60

gacagaaggg cagagcaagt aatgt 85

<210> 62

<211> 151

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> SIRT1-e6

<400> 62

tgtgggtgtgt tcaagaaaca gaaatacttc tttaataaag catatatatg ttgtttgttt 60

ttaggttcct ttgcaacagc atcttgctg atttgtaaat acaaagttga ctgtgaagct 120

gtacgaggag atatttttta tcaggtaatg t 151

<210> 63

<211> 114

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ENEEE синтетический экзон

<400> 63

gagtaacgct gtttctctaa cttgtagaca atcctcgaac caaacaacca aacaaccaaa 60

caatcctcga accaaacaat cctcgaacca aacaatcctc gaaccaagta atgt 114

<210> 64

<211> 1639

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> хрт-G15-двойной

<400> 64

gccaagaggt tccatctgcc aggtatcagg gtgagtctat gggacccttg atgttttctt 60

tccccttctt ttctatgggt aagttcatgt cataggaagg ggagaagtaa cagggtagac 120

atattgacca aatcagggtta attttgcatt tgtaatttta aaaaatgctt tcttctttta 180

atatactttt ttgtttatct tattttctaact actttcccta atctctttct ttcagggcaa 240

taatgataca atgtatcatg ccgagtaacg ctgtttctct aacttgtagg aatgaattca 300

gatattttcca gagaatgaaa aaaaaatctt cagtagaagg taatgtgtat aatcgcgtagg 360

atatggcacg caagtttcta ccgggcaccg taaatgtccg actacacatt acgcaccatt 420

ctaaagaata acagtgataa tttctggggt aaggcaatag caatatttct gcatataaat 480

atttctgcat ataaattgta actgatgtaa gaggtttcat attgctaata gcagctacaa 540

tccagctacc attctgcttt tattttatgg ttgggataag gctggattat tctgagtcca 600

agctaggccc ttttgcta	catgttcata cctcttatct	tcctcccaca gcaaggatat	660
gggctcactg agactacatc	agctattctg attacacccg	agggggatga taaaccgggc	720
gcggtcggta aagttgttcc	atTTTTTgaa gcgaaggttg	tggatctgga taccgggaaa	780
acgctgggcg ttaatcaaag	aggcgaactg tgtgtgagag	gtcctatgat tatgtccggt	840
tatgtaaaca atccggaagc	gaccaacgcc ttgattgaca	aggatggatg gctacattct	900
ggagacatag cttactggga	cgaagacgaa cacttcttca	tcgttgaccg cctgaagtct	960
ctgattaagt acaaaggggtg	agtctatggg acccttgatg	TTTTTcttcc ccttcttttc	1020
tatggttaag ttcatgtcat	aggaagggga gaagtaacag	ggtacacata ttgaccaa	1080
cagggtaatt ttgcatttgt	aattttaaaa aatgctttct	tctttttaata tacttttttg	1140
tttatcttat ttctaatact	ttccctaate tctttctttc	agggcaataa tgatacaatg	1200
tatcatgccg agtaacgctg	tttctctaac ttgtaggaat	gaattcagat atttccagag	1260
aatgaaaaaa aaatcttcag	tagaaggtaa tgtgtataat	cgcgtggata tggcacgcaa	1320
gtttctaccg ggcaccgtaa	atgtccgact acacattacg	caccattcta aagaataaca	1380
gtgataatTT ctgggttaag	gcaatagcaa tatttctgca	tataaatatt tctgcatata	1440
aattgtaact gatgtaagag	gtttcatatt gctaatagca	gctacaatcc agctaccatt	1500
ctgctttttat tttatggttg	ggataaggct ggattattct	gagtccaagc taggcccttt	1560

tgctaatcat gttcatacct cttatcttcc tcccacagct atcaggtggc tcccgtgaa 1620

ttggaatcca tcttgctcc 1639

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полинуклеотидная кассета для регулирования экспрессии целевого гена, содержащая

а. рибосвитч

б. альтернативно сплайсированный экзон, граничащий с 5'-интроном и 3'-интроном,

при этом рибосвитч содержит (i) эффекторную область, содержащую стебель, который включает 5'-участок сплайсинга 3'-интрона, и (ii) аптамер,

при этом альтернативно сплайсированный экзон содержит стоп-кодон, который находится внутри рамки (считывания) с целевым геном, когда альтернативно сплайсированный экзон сплайсирован в мРНК целевого гена.

2. Полинуклеотидная кассета по п. 1, отличающаяся тем, что аптамер специфически связывается с низкомолекулярным лигандом.

3. Полинуклеотидная кассета по п. 1, отличающаяся тем, что 5'- и 3'-интроны получают из эндогенного интрона из целевого гена.

4. Полинуклеотидная кассета по п. 1, отличающаяся тем, что 5'- и 3'-интроны являются экзогенными для целевого гена.

5. Полинуклеотидная кассета по п. 1, отличающаяся тем, что 5'- и 3'-интроны получают из интрона 2 гена β -глобина человека.

6. Полинуклеотидная кассета по п. 1, отличающаяся тем, что 5'-интрон содержит стоп-кодон в рамке с целевым геном.

7. Полинуклеотидная кассета по п. 1, отличающаяся тем, что 5'- и 3'-интроны, каждый независимо, содержат от около 50 до около 300 нуклеотидов в длину.

8. Полинуклеотидная кассета по п. 1, отличающаяся тем, что 5'- и 3'-интроны, каждый независимо, содержат от около 125 до около 240 нуклеотидов в длину.

9. Полинуклеотидная кассета по п. 1, отличающаяся тем, что стебель эффекторной области содержит от около 7 до около 20 пар оснований в длину.

10. Полинуклеотидная кассета по п. 1, отличающаяся тем, что стебель эффекторной области содержит от 8 до 11 пар оснований в длину.

11. Полинуклеотидная кассета по п. 1, отличающаяся тем, что альтернативно сплайсированный экзон выбирают из группы, включающей экзон 2 гена дигидрофолатредуктазы человека, экзон 5

мутантной опухоли Вильмса 1, экзон 16 кальций/калмодулин-зависимой протеинкиназы II дельта мышцы, или экзон 6 SIRT1.

12. Полинуклеотидная кассета по п. 1, отличающаяся тем, что альтернативно сплайсированный экзон представляет собой модифицированный экзон 2 из DHFR человека из SEQ ID NO 15.

13. Полинуклеотидная кассета по п. 1, отличающаяся тем, что альтернативно сплайсированный экзон является синтетическим.

14. Полинуклеотидная кассета по п. 1, отличающаяся тем, что альтернативно сплайсированный экзон модифицирован посредством одного или более процессов, выбранных из группы, состоящей из изменения последовательности экзонного энхансера сплайсинга, изменения последовательности экзонного сайленсера сплайсинга, добавления экзонного энхансера сплайсинга и добавления экзонного сайленсера сплайсинга.

15. Способ модулирования экспрессии целевого гена, включающий

а. вставку полинуклеотидной кассеты по пп. 1-14 в целевой ген

б. введение целевого гена, содержащего полинуклеотидную кассету, в клетку, а также

с. воздействие на клетку низкомолекулярным лигандом, который специфически связывается с аптамером в количестве, эффективном для индуцирования экспрессии целевого гена.

16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что полинуклеотидную кассету вставляют в область целевого гена, кодирующую белок.

17. Способ по п. 15, отличающийся тем, что уровень экспрессии целевого гена при наличии низкомолекулярного лиганда выше примерно в 5 раз по сравнению с уровнями экспрессии при отсутствии низкомолекулярного лиганда.

18. Способ по п. 15, отличающийся тем, что уровень экспрессии целевого гена при наличии низкомолекулярного лиганда выше примерно в 10 раз по сравнению с уровнями экспрессии при отсутствии низкомолекулярного лиганда.

19. Способ по п. 15, отличающийся тем, что в целевой ген вставляют две или более полинуклеотидных кассеты.

20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что две или более полинуклеотидных кассеты содержат различные аптамеры, которые специфически связываются с различными низкомолекулярными лигандами.

21. Способ по п. 19, отличающийся тем, что две или более полинуклеотидных кассеты содержат одинаковый аптамер.

22. Способ по п. 15, отличающийся тем, что целевой ген, содержащий полинуклеотидную кассету, вводят в вектор для экспрессии целевого гена.

23. Способ по п. 22, отличающийся тем, что указанный вектор представляет собой вирусный вектор.

24. Способ по п. 22, отличающийся тем, что вирусный вектор выбирают из группы, состоящей из аденовирусного вектора, вектора аденоассоциированного вируса и лентивирусного вектора.

25. Способ модулирования экспрессии целевого гена в глазу млекопитающего, включающий:

а. введение в глаз вектора, содержащего целевой ген, который содержит полинуклеотидную кассету, содержащую (i) рибосвитч и (ii) альтернативно сплайсированный экзон, граничащий с 5'-интроном и 3'-интроном, при этом рибосвитч содержит эффекторную область, содержащую стебель, который содержит 5'-участок сплайсинга 3'-интрона, и аптамер, который связывается с низкомолекулярным лигандом, при этом альтернативно сплайсированный экзон содержит стоп-кодон, который находится внутри рамки с целевым геном.

б. воздействие на млекопитающего низкомолекулярным лигандом в количестве, эффективном для индуцирования экспрессии целевого гена.

26. Способ по п. 25, отличающийся тем, что вектор вводят в глаз с помощью внутриглазной инъекции.

27. Способ по п. 25, отличающийся тем, что указанный вектор представляет собой вирусный вектор.

28. Способ по п. 27, отличающийся тем, что вирусный вектор выбирают из группы, состоящей из аденовирусного вектора, вектора аденоассоциированного вируса и лентивирусного вектора.

29. Способ по п. 25, отличающийся тем, что полинуклеотидную кассету помещают в кодирующую белок последовательность целевого гена.

30. Способ по п. 25, отличающийся тем, что 5'- и 3'-интроны получают из эндогенного интрона из целевого гена.

31. Способ по п. 25, отличающийся тем, что 5'- и 3'-интроны являются экзогенными для целевого гена.

32. Способ по п. 25, отличающийся тем, что 5'- и 3'-интроны являются производными от элементов группы, состоящей из экзона 2

гена β -глобина человека, экзона 5 мутантной опухоли Вильмса 1, экзона 16 кальций/калмодулин-зависимой протеинкиназы II дельта мышцы, или экзона 6 SIRT1.

33. Способ по п. 25, отличающийся тем, что 5'-интрон содержит стоп-кодон в рамке с целевым геном.

34. Способ по п. 25, отличающийся тем, что 5'- и 3'-интроны, каждый независимо, имеют от около 50 до около 300 нуклеотидов в длину.

35. Способ по п. 25, отличающийся тем, что 5'- и 3'-интроны, каждый независимо, имеют от около 125 до около 240 нуклеотидов в длину.

36. Способ по п. 25, отличающийся тем, что стебель эффекторной области имеет от около 7 до около 20 пар оснований в длину.

37. Способ по п. 25, отличающийся тем, что стебель эффекторной области имеет от около 8 до около 11 пар оснований в длину.

38. Способ по п. 25, отличающийся тем, что альтернативно сплайсированный экзон получают из экзона 2 гена дигидрофолатредуктазы человека.

39. Способ по п. 25, отличающийся тем, что альтернативно сплайсированный экзон модифицирован посредством одного или более процессов, выбранных из группы, состоящей из изменения последовательности экзонного энхансера сплайсинга, изменения последовательности экзонного сайленсера сплайсинга, добавления экзонного энхансера сплайсинга и добавления экзонного сайленсера сплайсинга.

40. Способ по п. 25, отличающийся тем, что альтернативно сплайсированный экзон представляет собой модифицированный экзон 2 DHFR из SEQ ID NO 15.

41. Рекомбинантный полинуклеотид, содержащий целевой ген с полинуклеотидной кассетой по пп. 1-14.

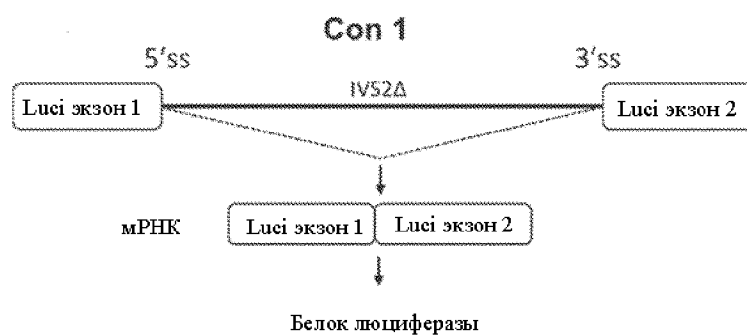
42. Рекомбинантный полинуклеотид по п. 41, отличающийся тем, что полинуклеотидную кассету помещают в кодирующую белок последовательность целевого гена.

43. Вектор, содержащий целевой ген, который содержит полинуклеотидную кассету по пп. 1-14.

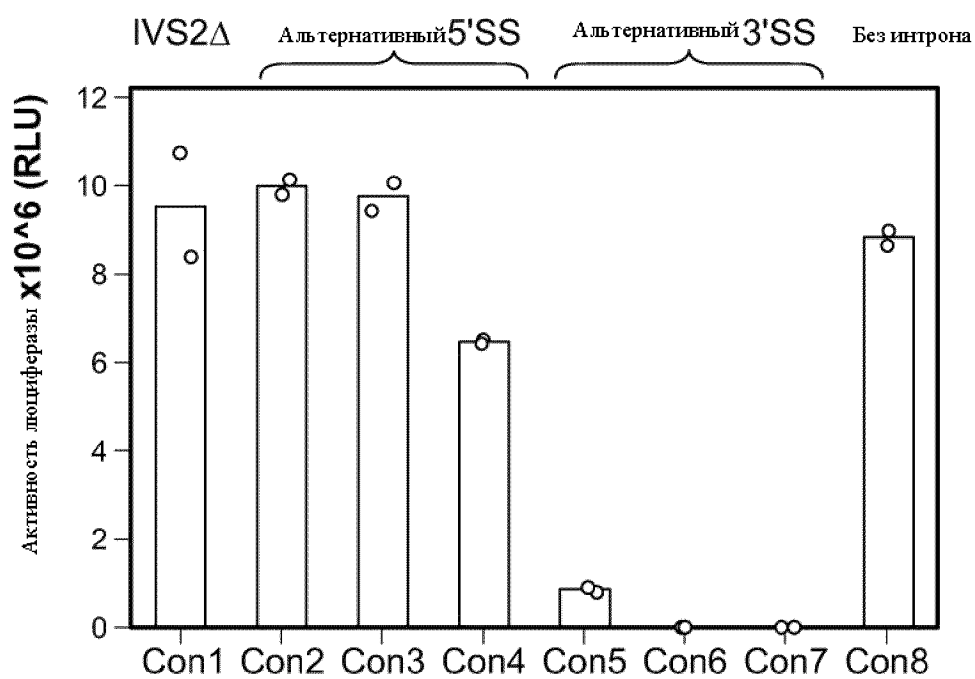
44. Вектор по п. 43, отличающийся тем, что указанный вектор представляет собой вирусный вектор.

45. Вектор по п. 44, отличающийся тем, что вирусный вектор выбирают из группы, состоящей из аденовирусного вектора, вектора аденоассоциированного вируса и лентивирусного вектора.

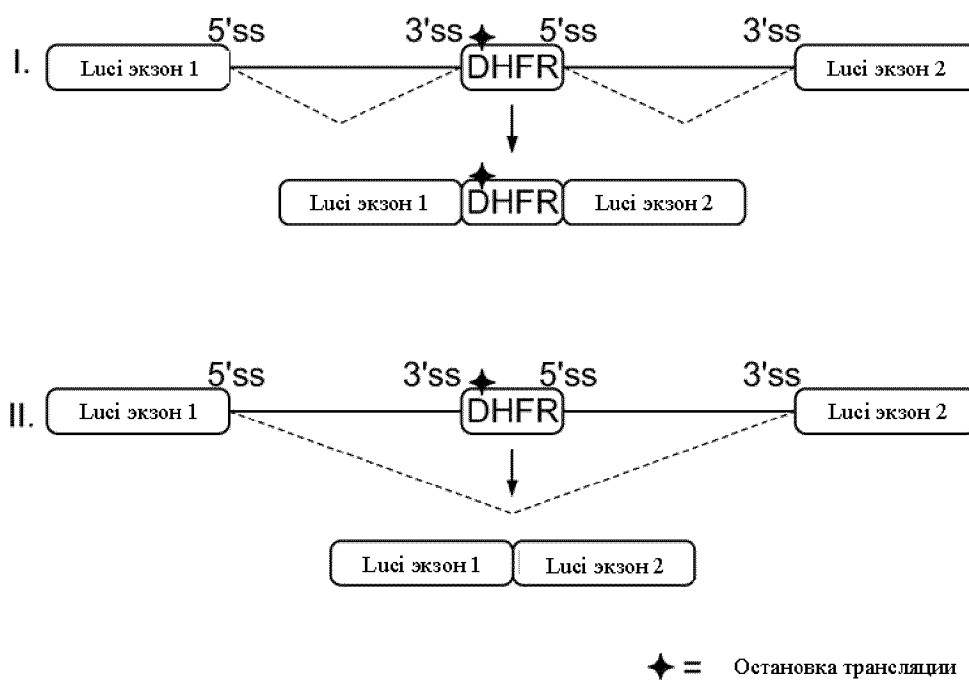
По доверенности



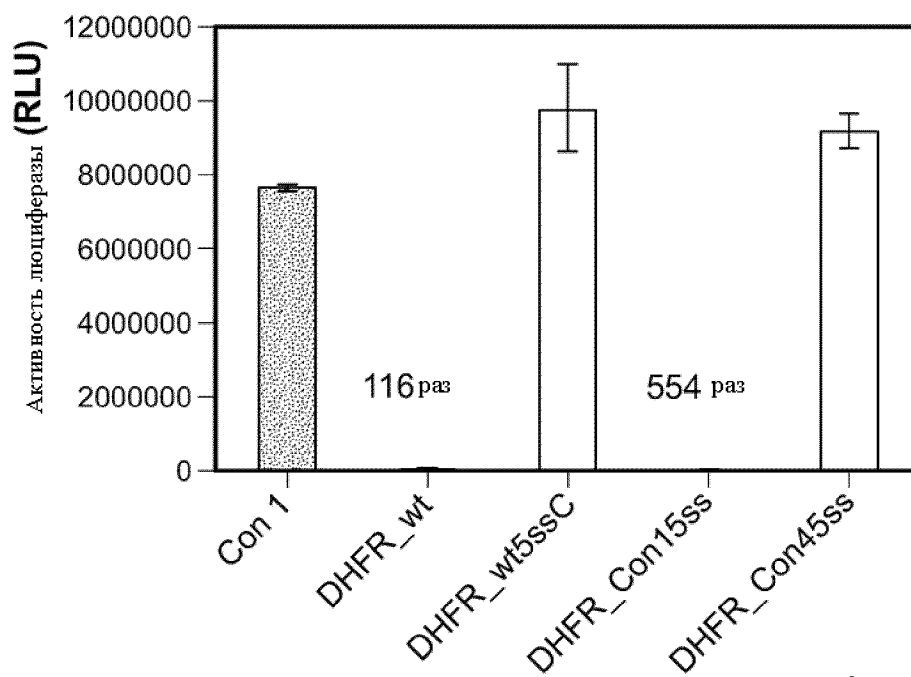
Фиг. 1а



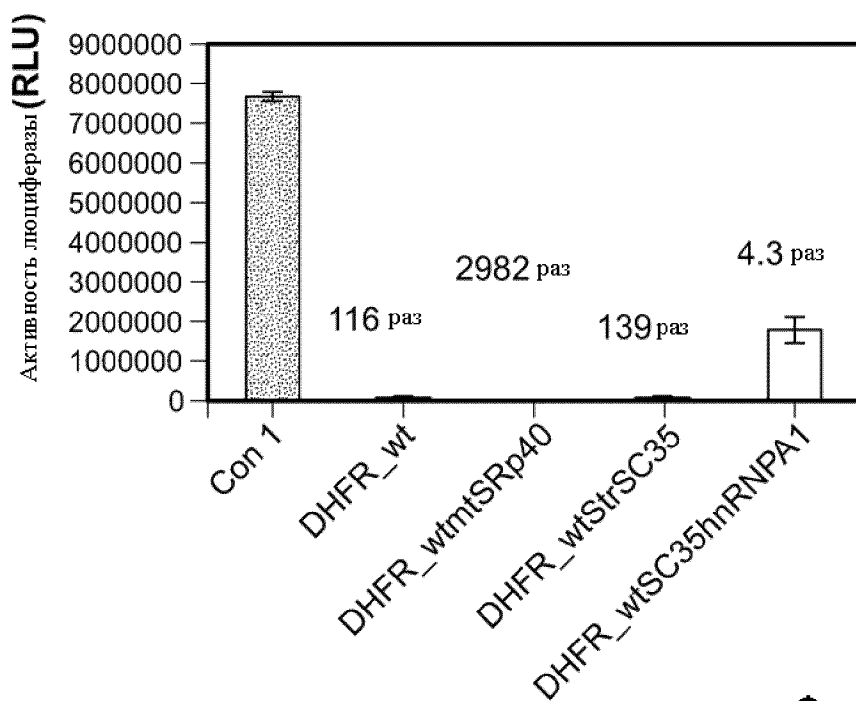
Фиг. 1б



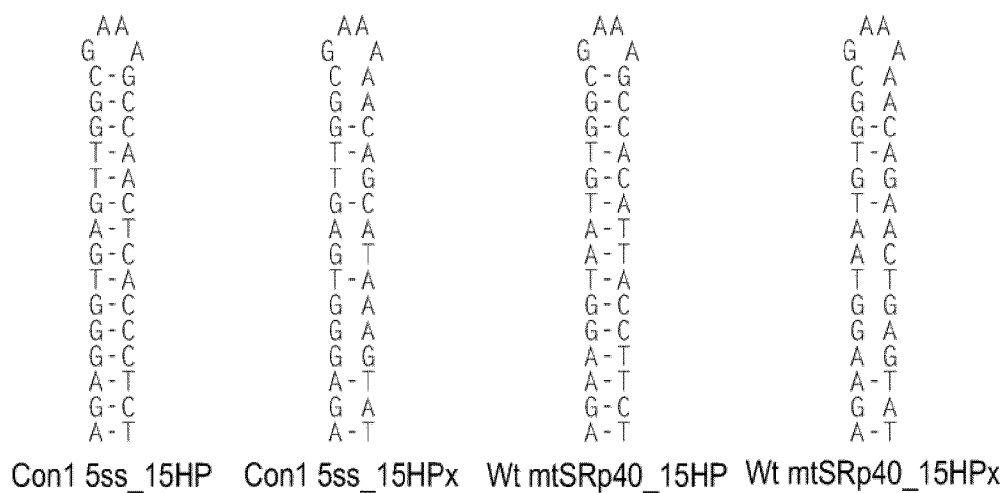
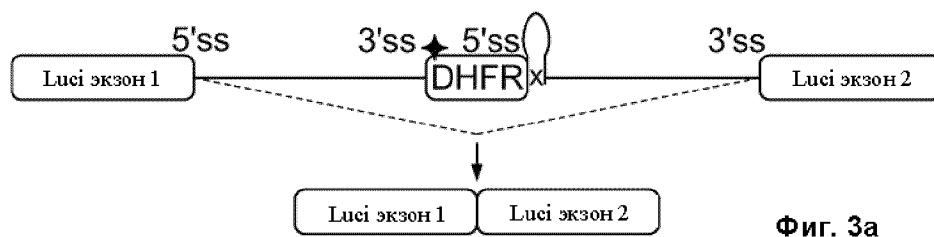
Фиг. 2а



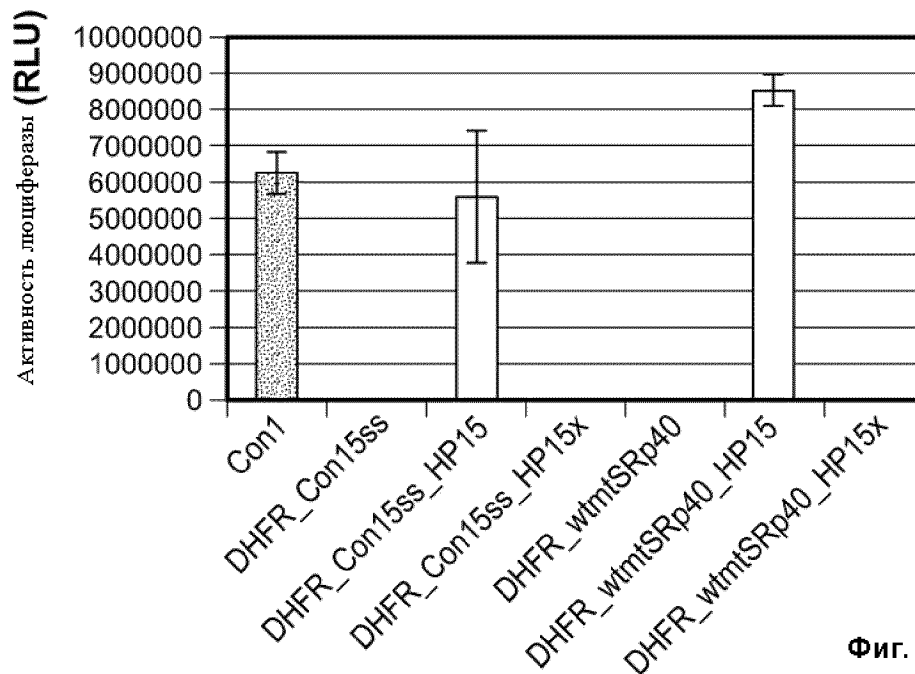
Фиг. 2b

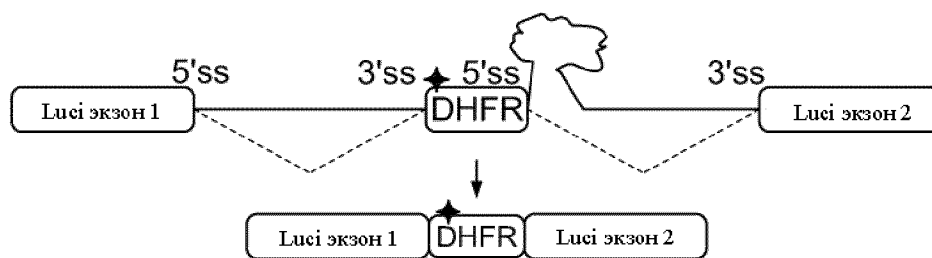


Фиг. 2 c

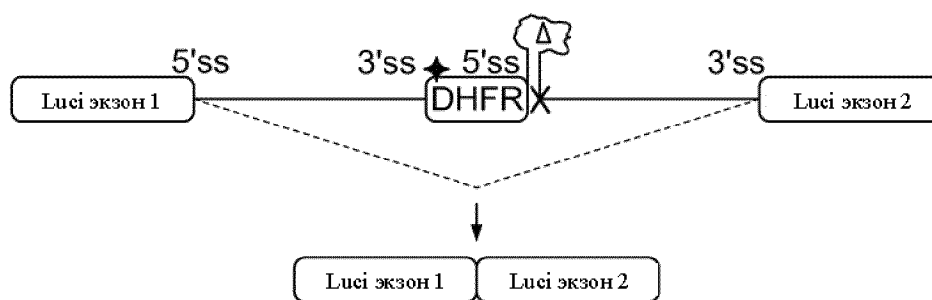


Фиг. 3б

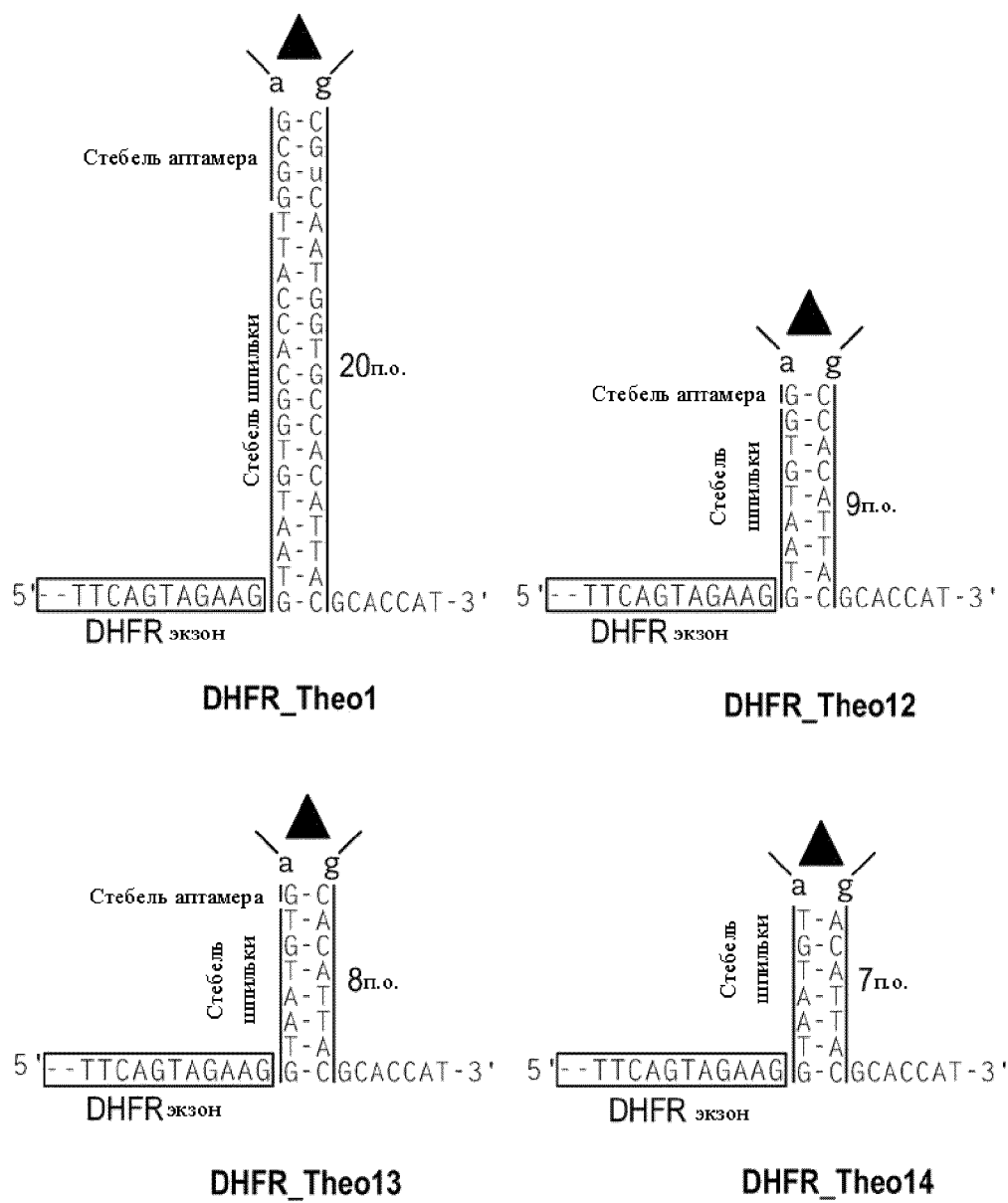




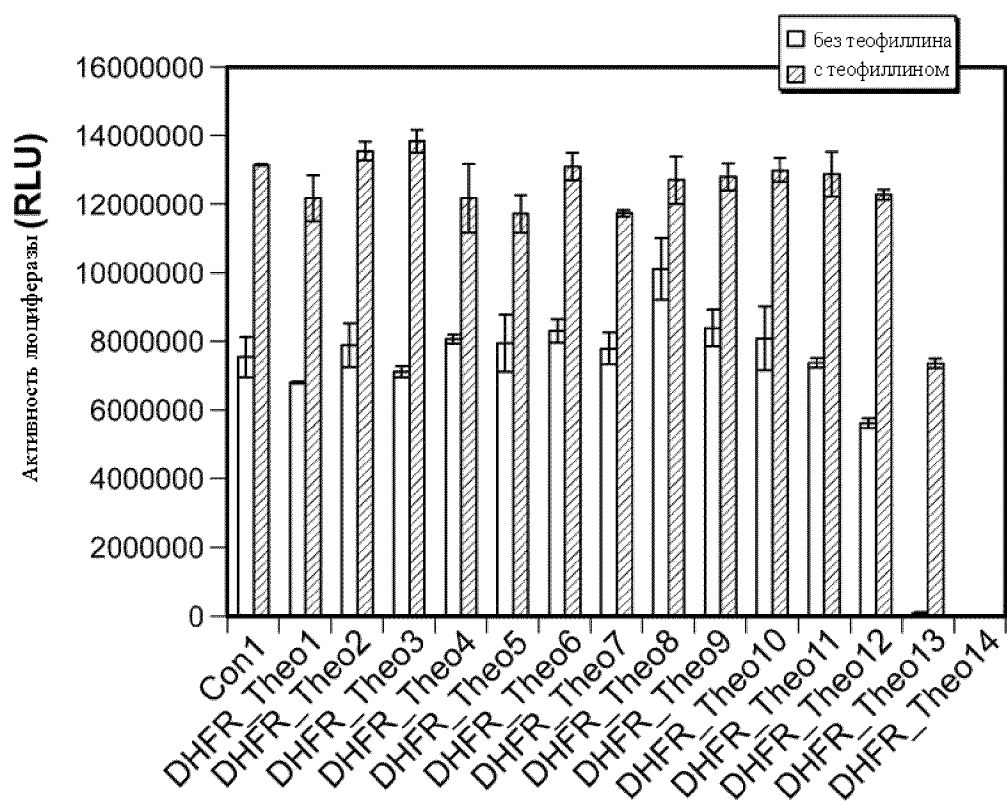
Фиг. 4а



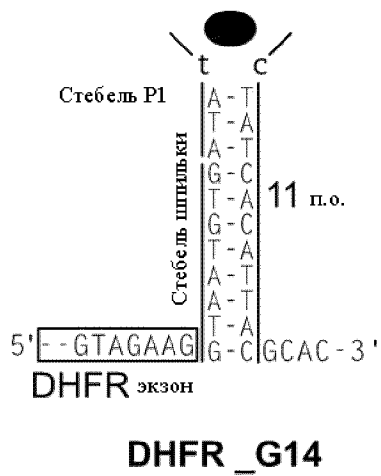
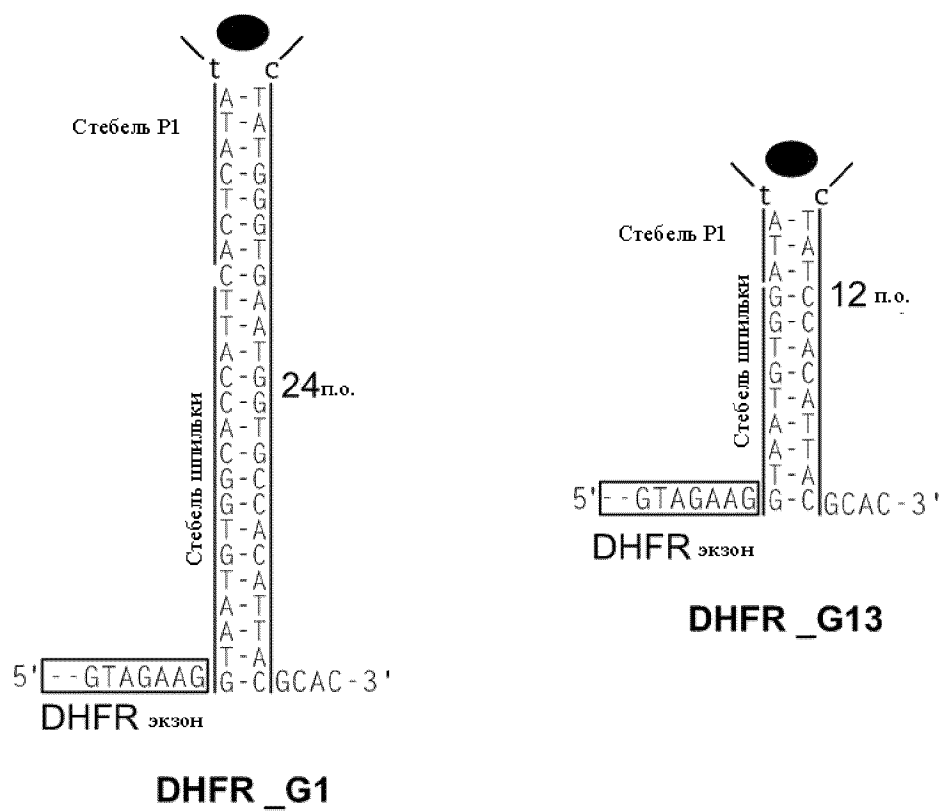
Фиг. 4b



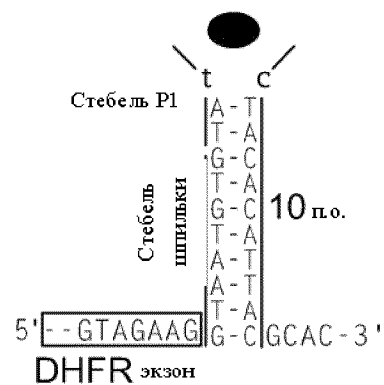
Фиг. 4с



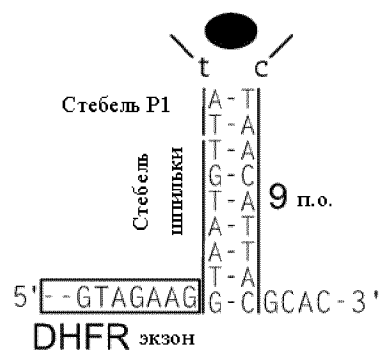
Фиг. 4d



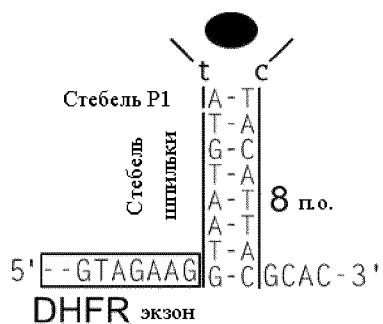
Фиг. 5а



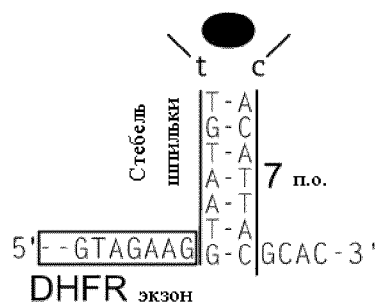
DHFR_G15



DHFR_G16

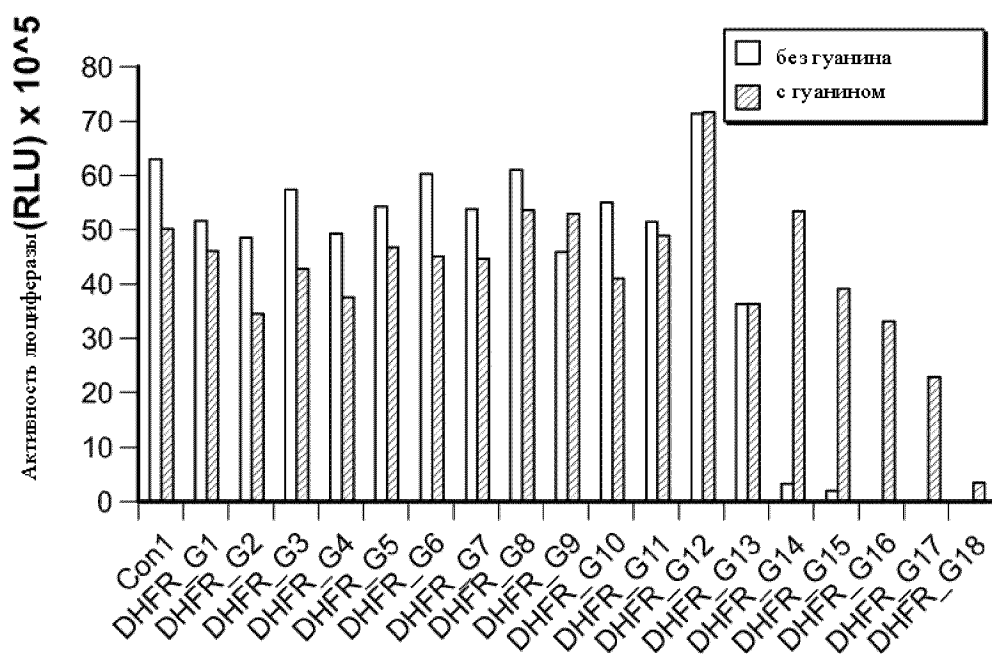


DHFR_G17

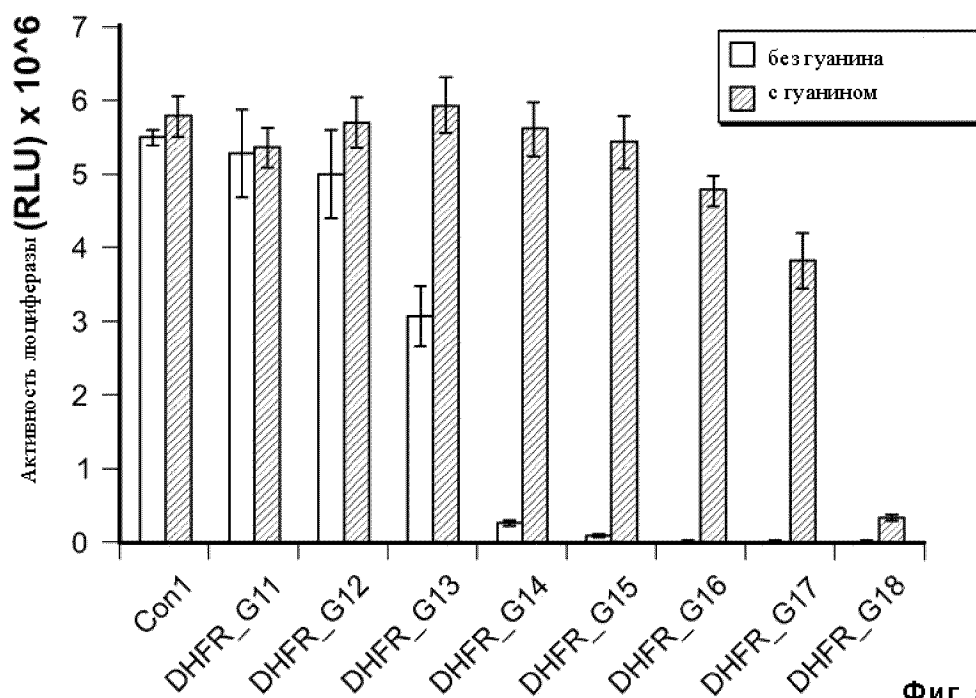


DHFR_G18

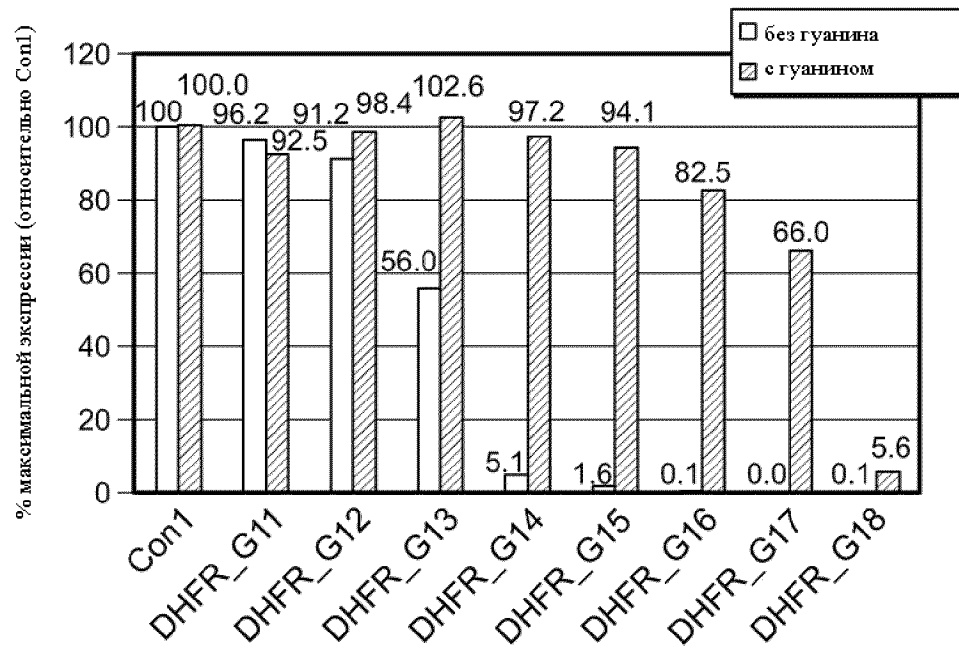
Фиг. 5А
(Продолжение)



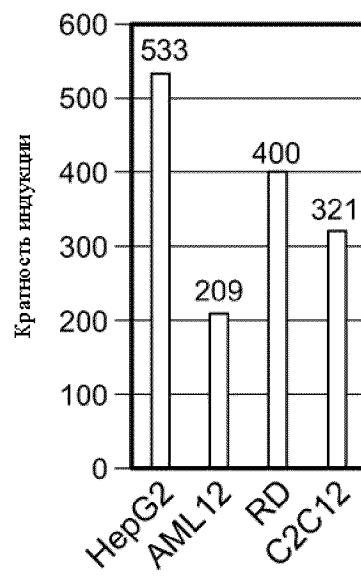
Фиг. 5b



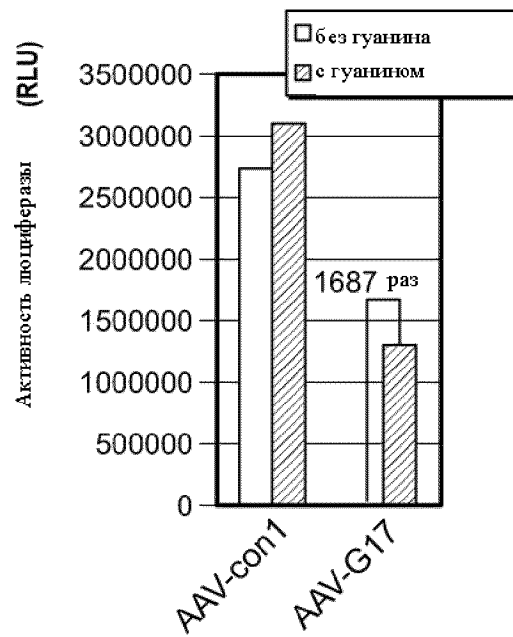
Фиг. 5с



Фиг. 5d

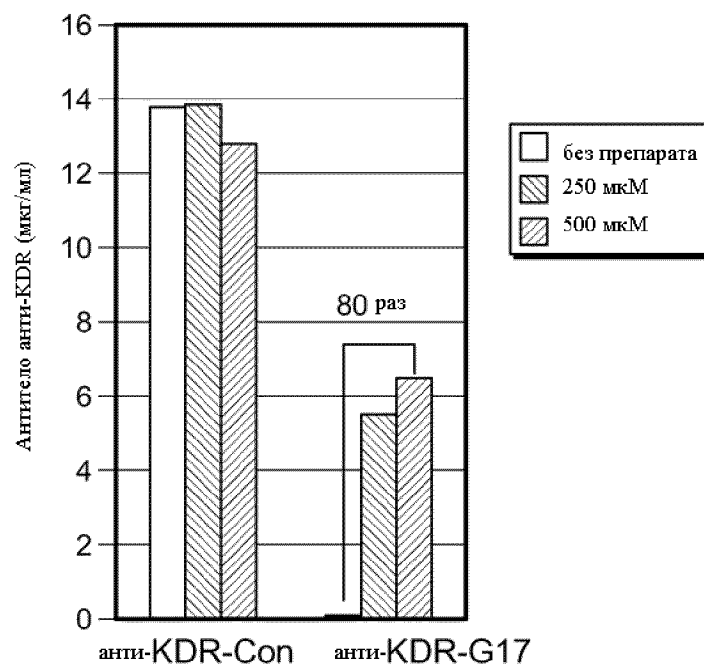


Фиг. 5е

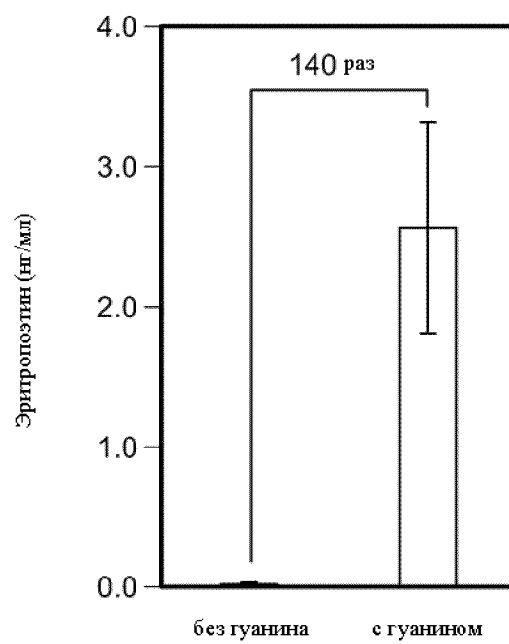


Фиг. 5f

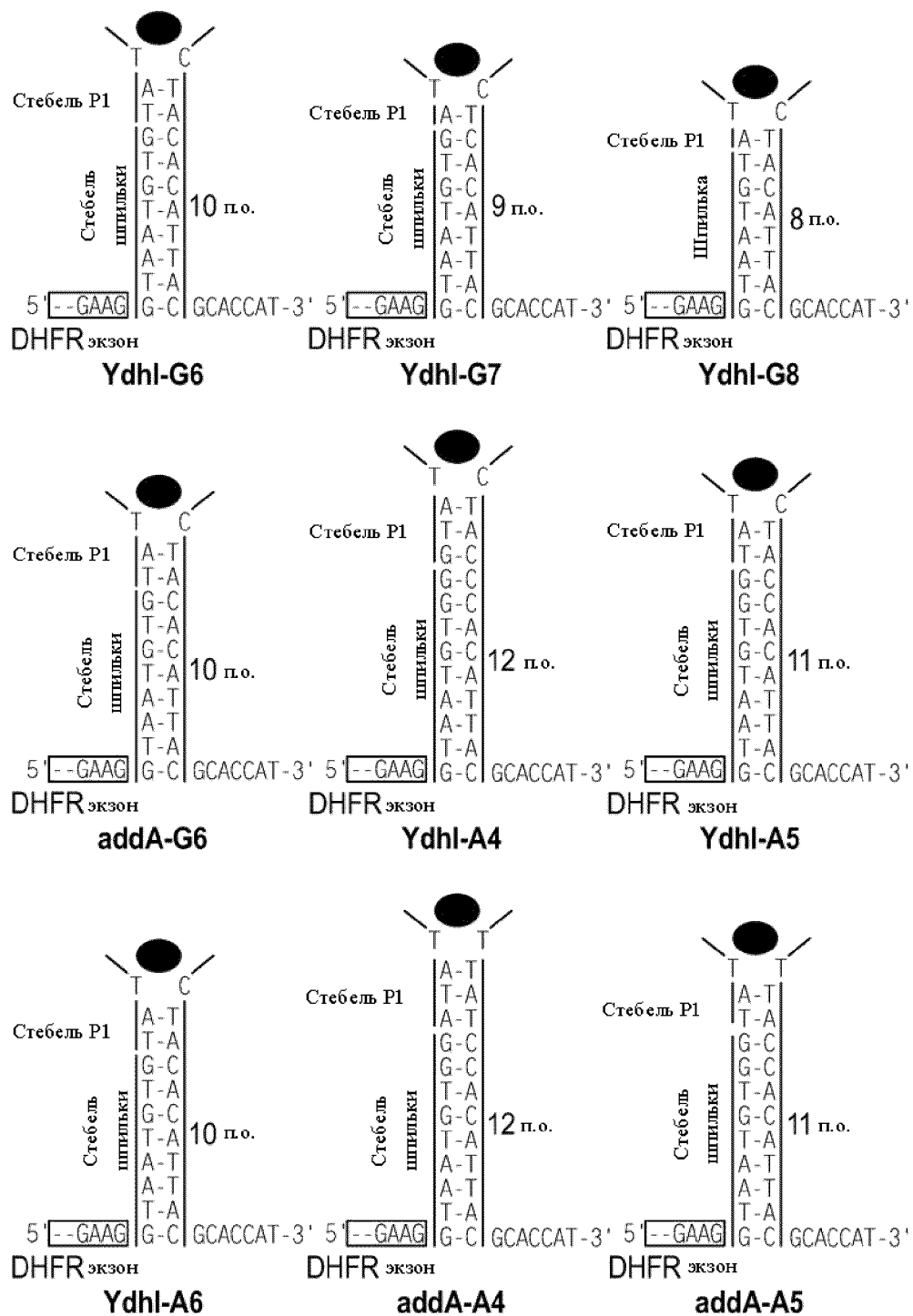
12/29



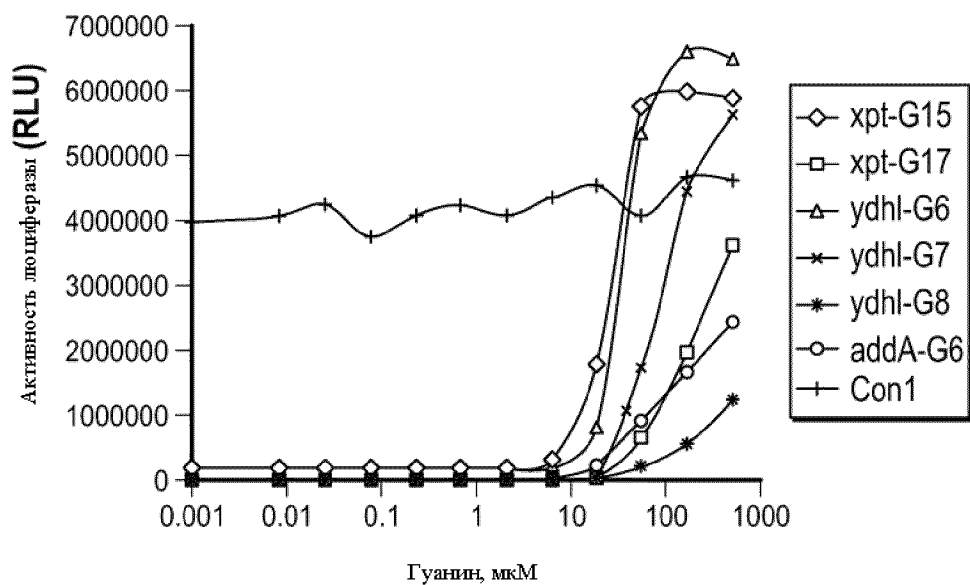
Фиг. 5g



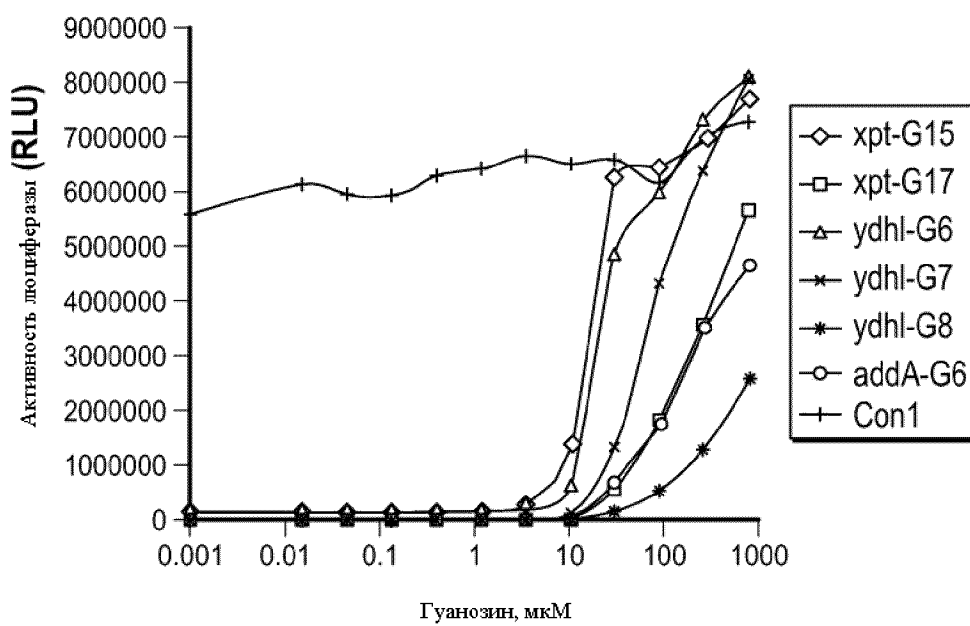
Фиг. 5h



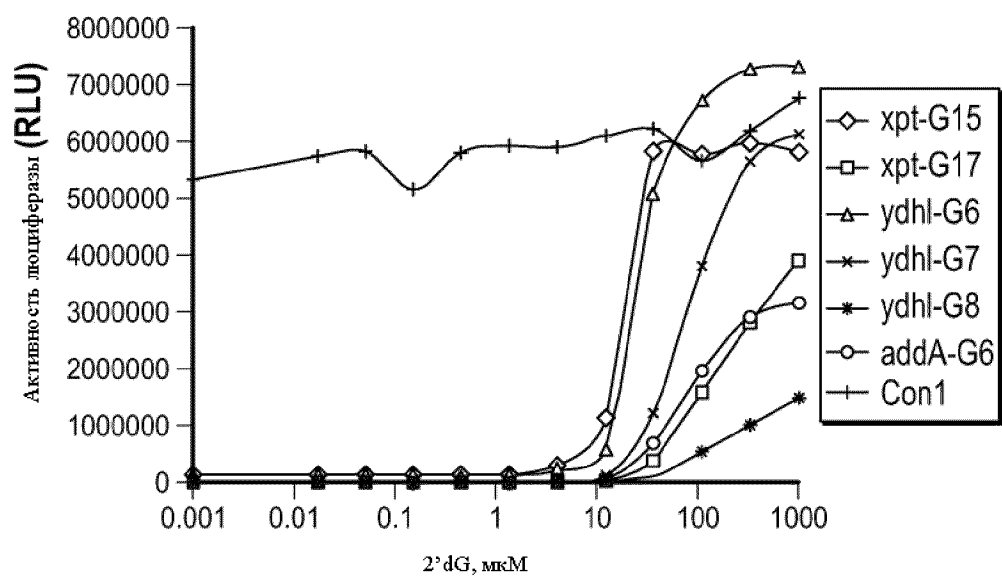
Фиг. 6а



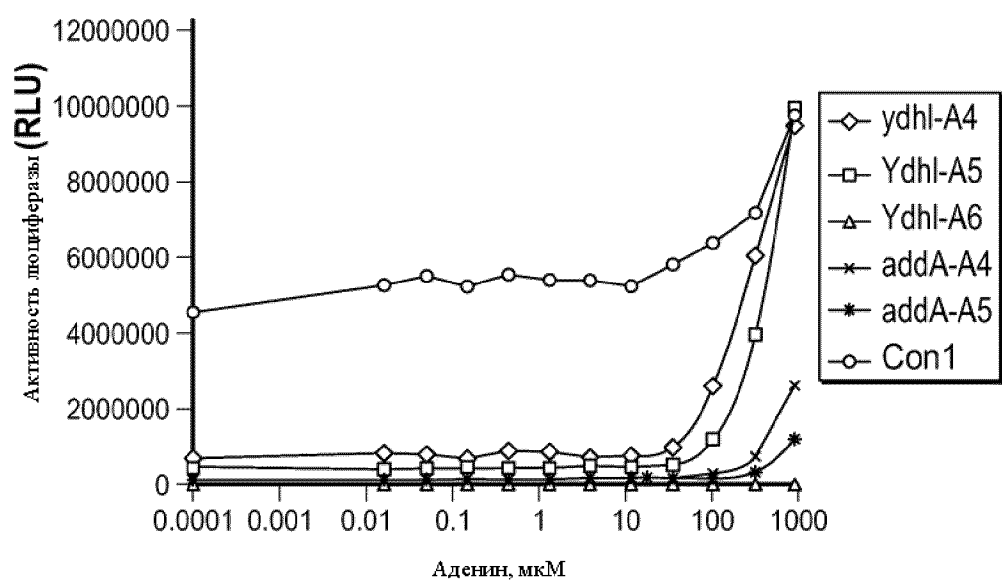
Фиг. 6b



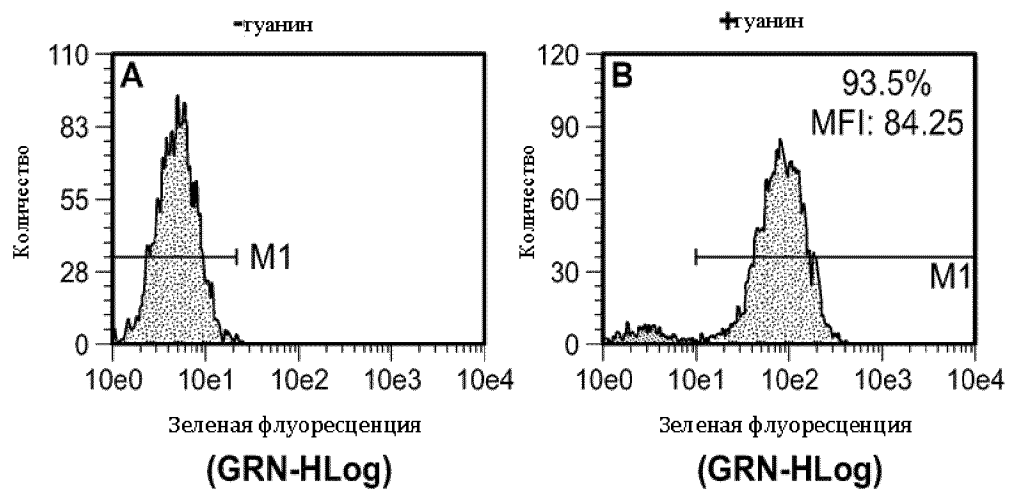
Фиг. 6с



Фиг. 6d



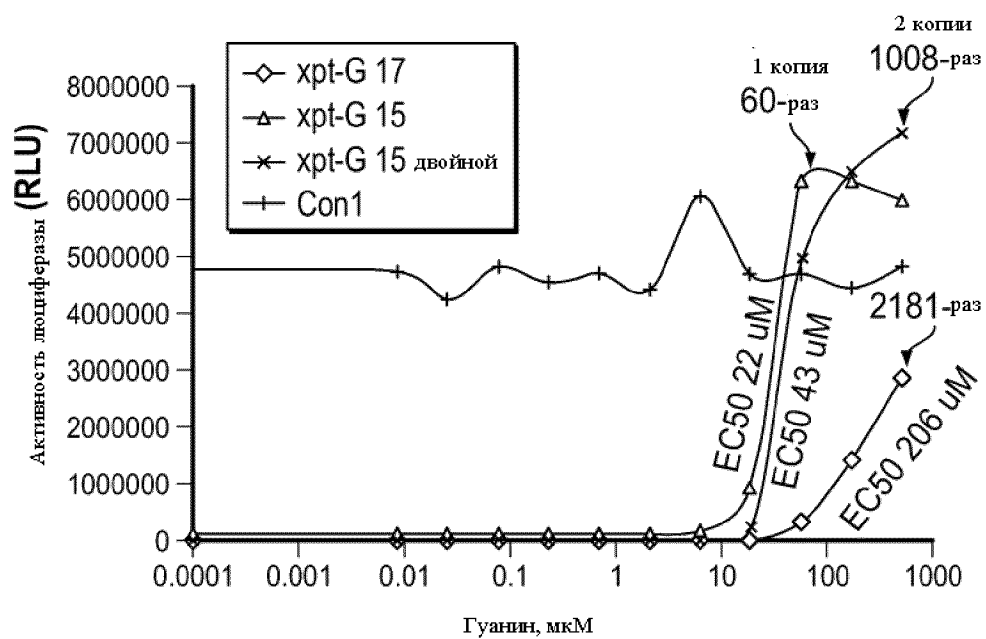
Фиг. 6e



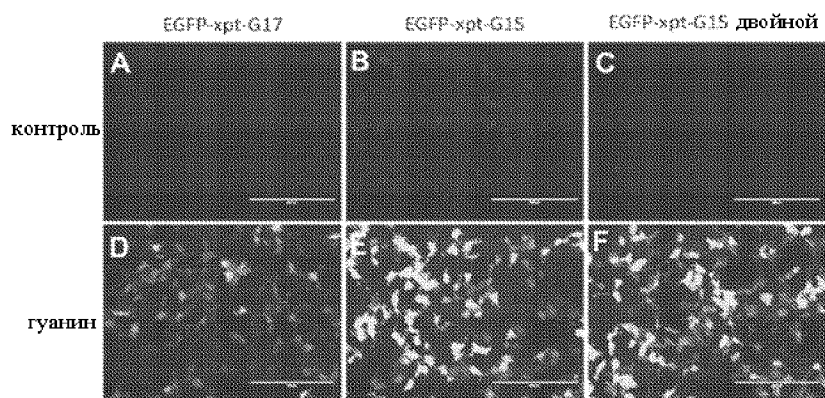
Фиг. 7а



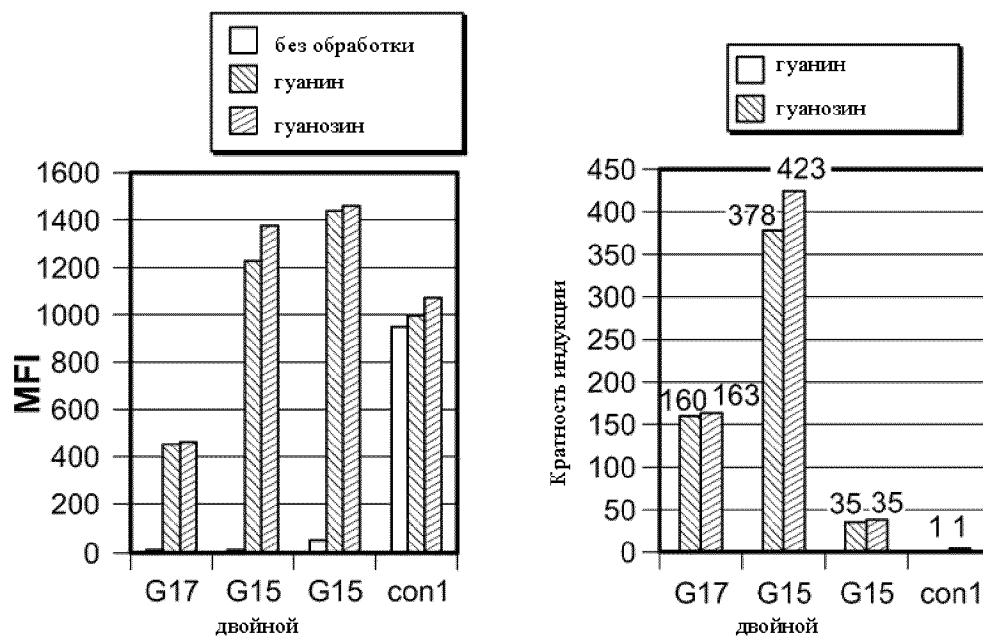
Фиг. 7б



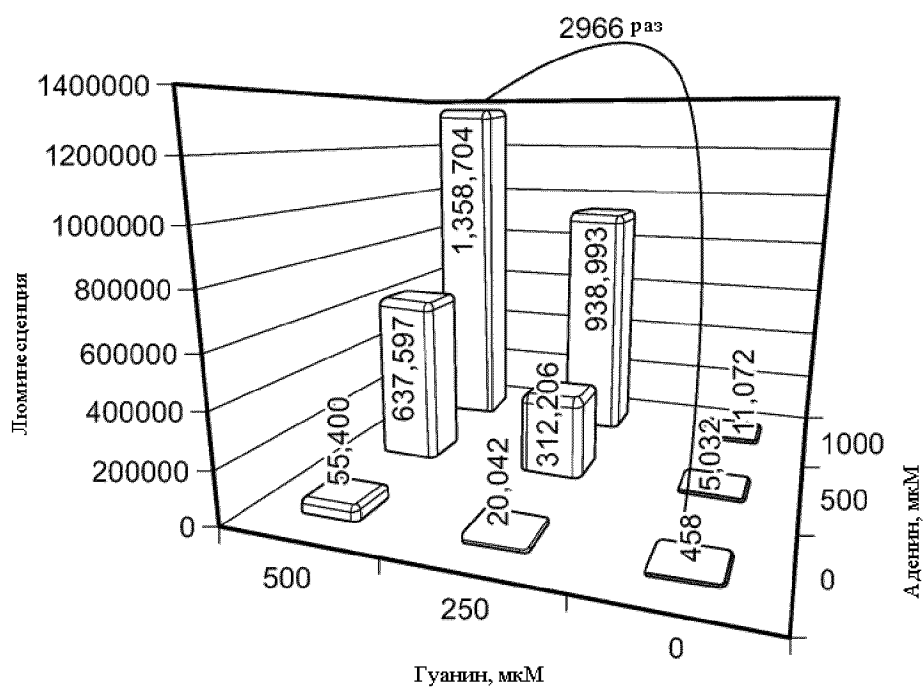
Фиг. 8a



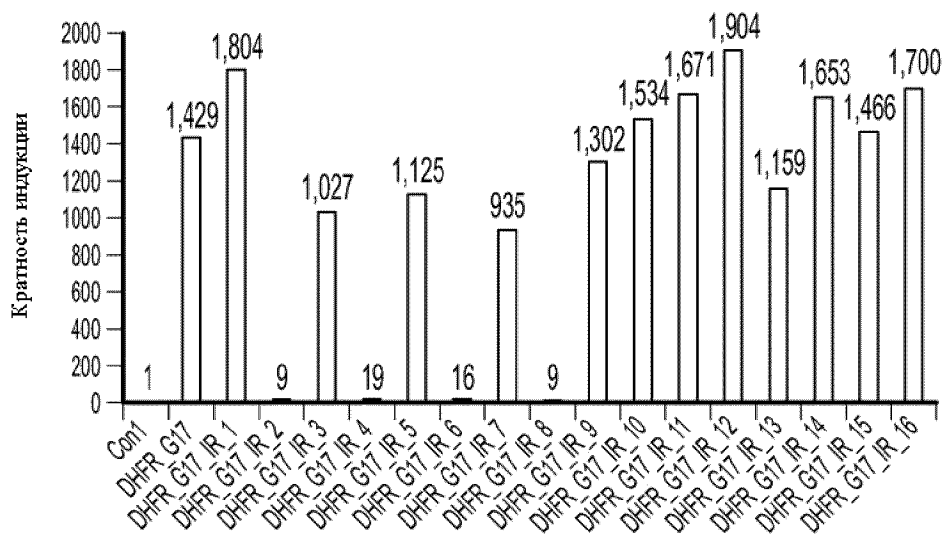
Фиг. 8b



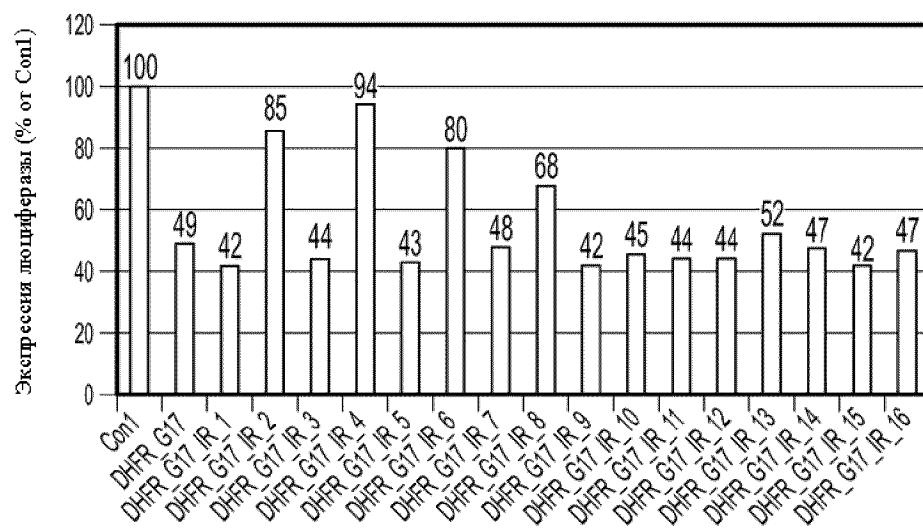
Фиг. 8с



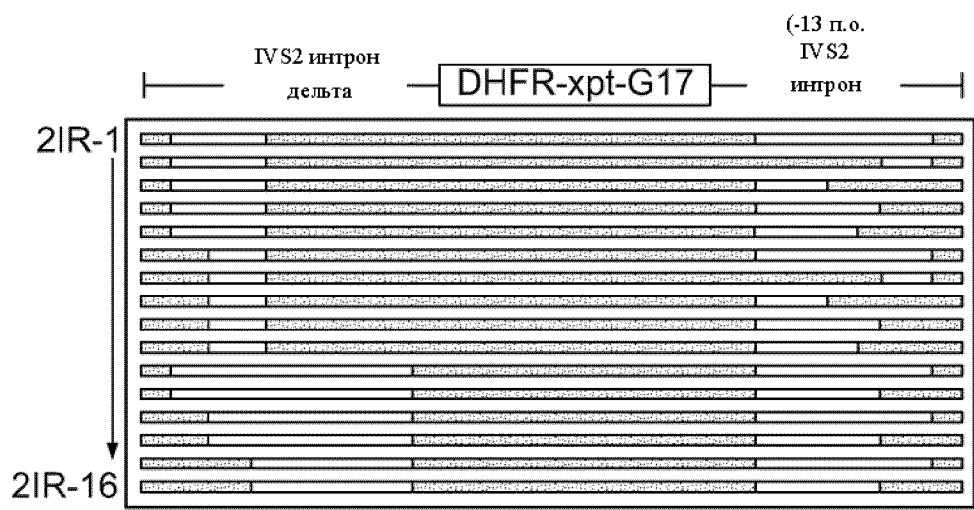
Фиг. 8d



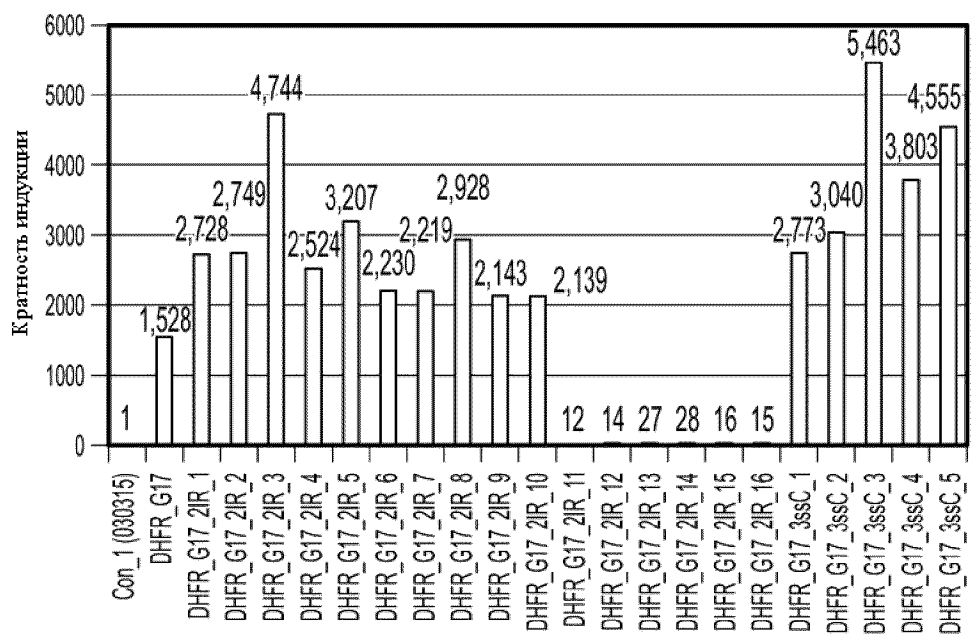
Фиг. 9а



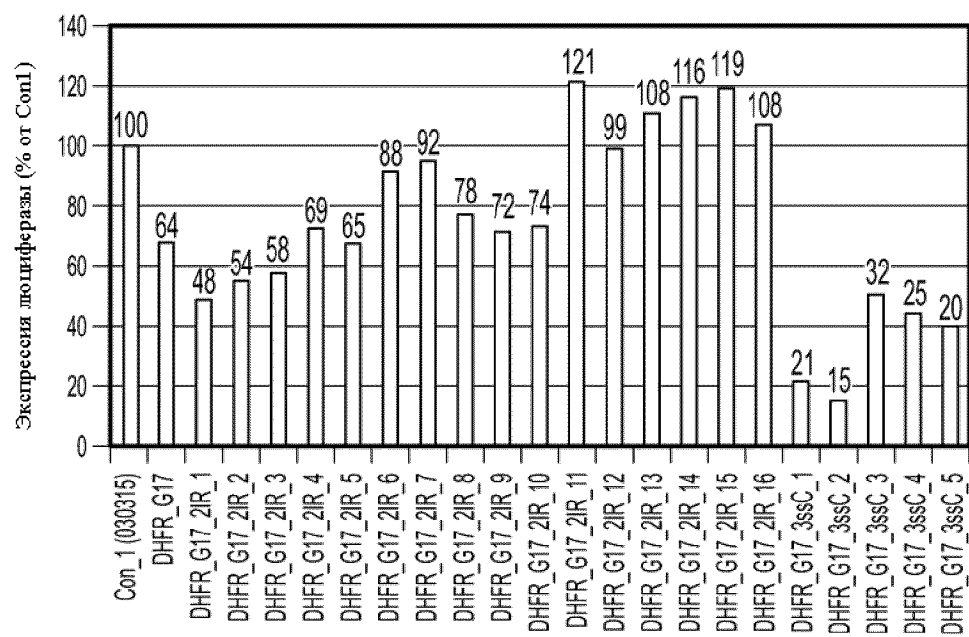
Фиг. 9б



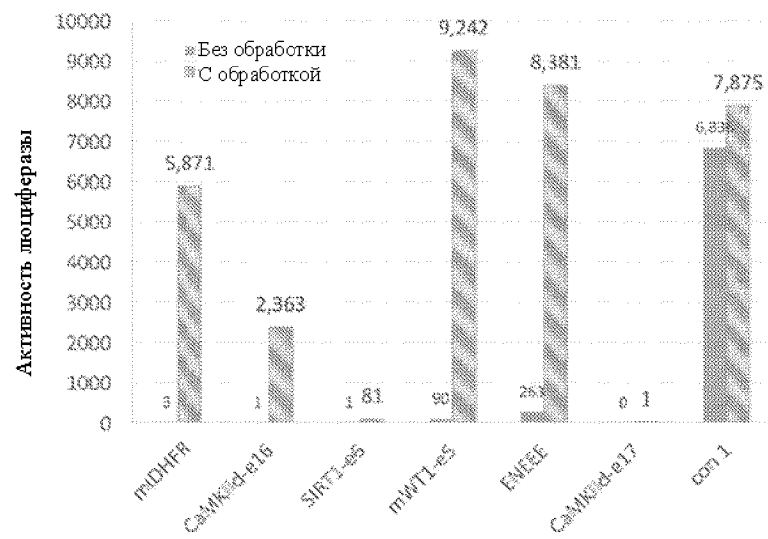
Фиг. 9с



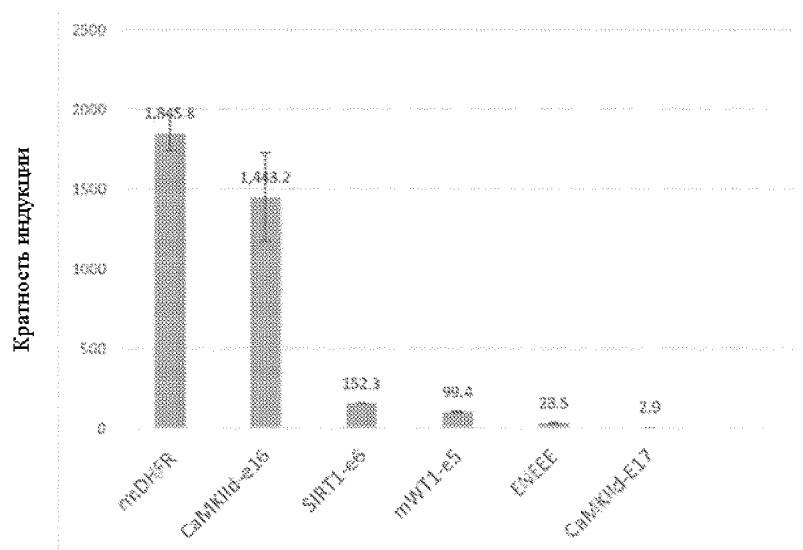
Фиг. 9d



Фиг. 9е

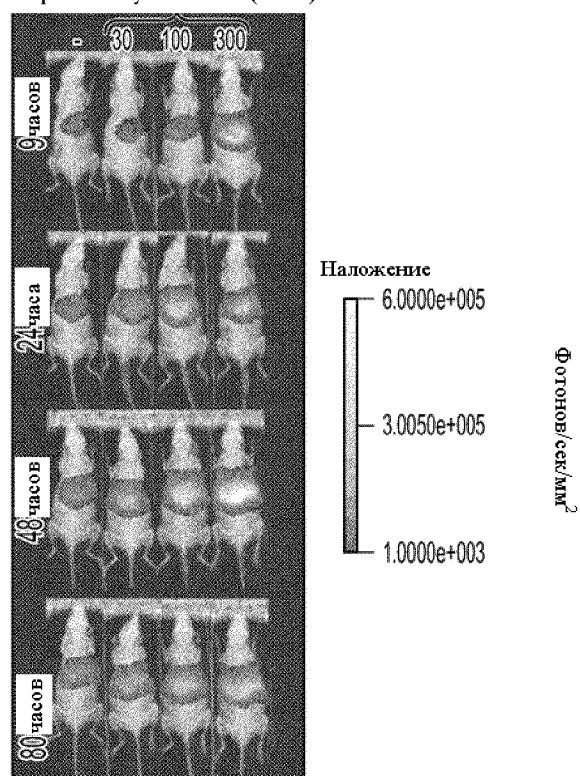


Фиг. 10а

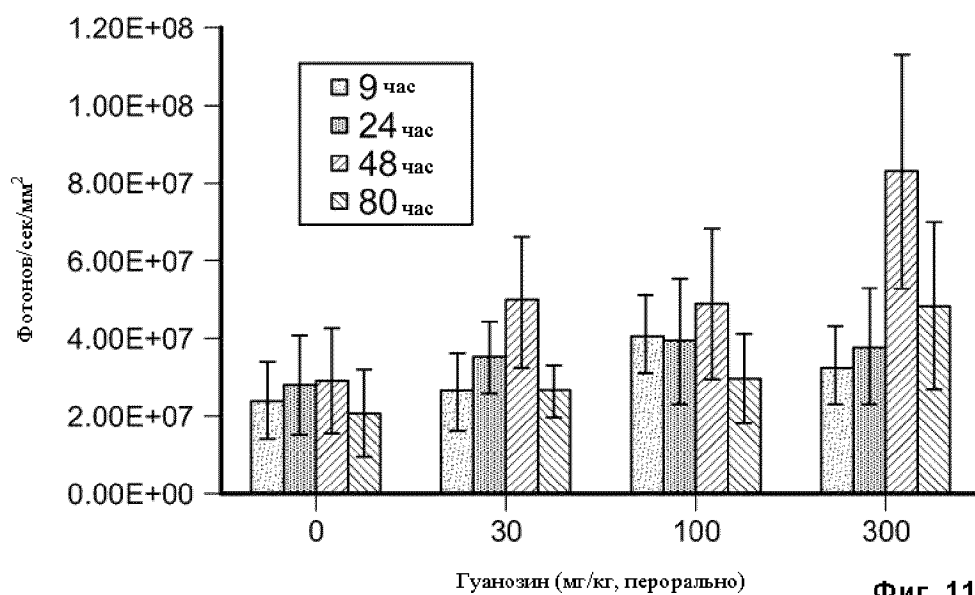


Фиг. 10b

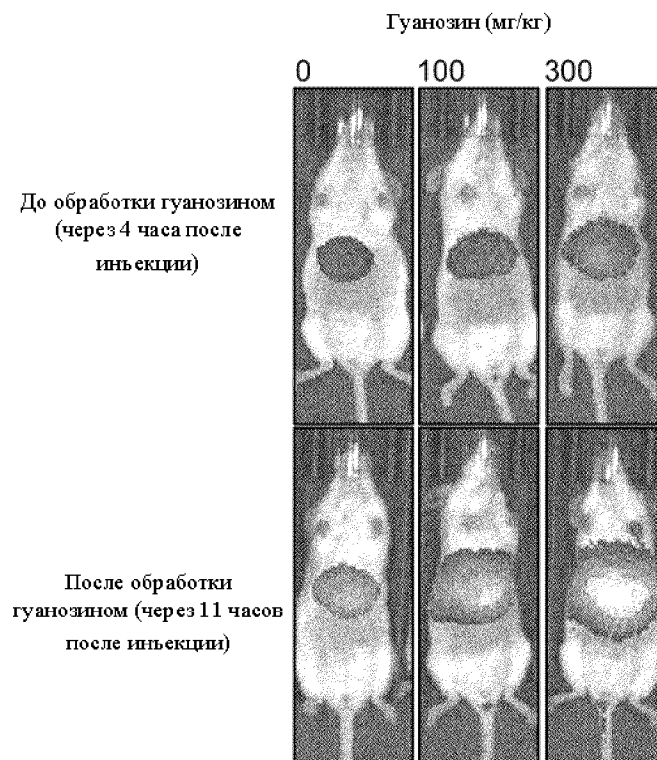
Обработка гуанозином (мг/кг)



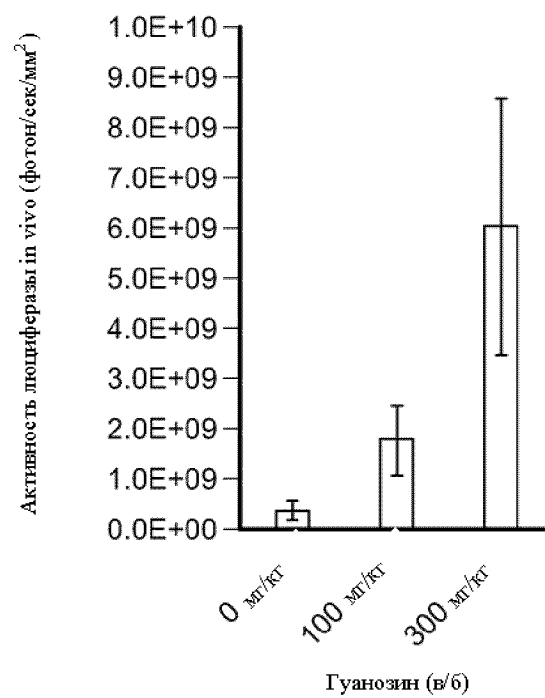
Фиг. 11а



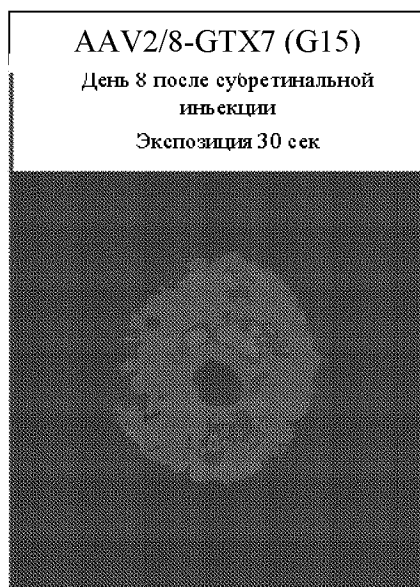
Фиг. 11б



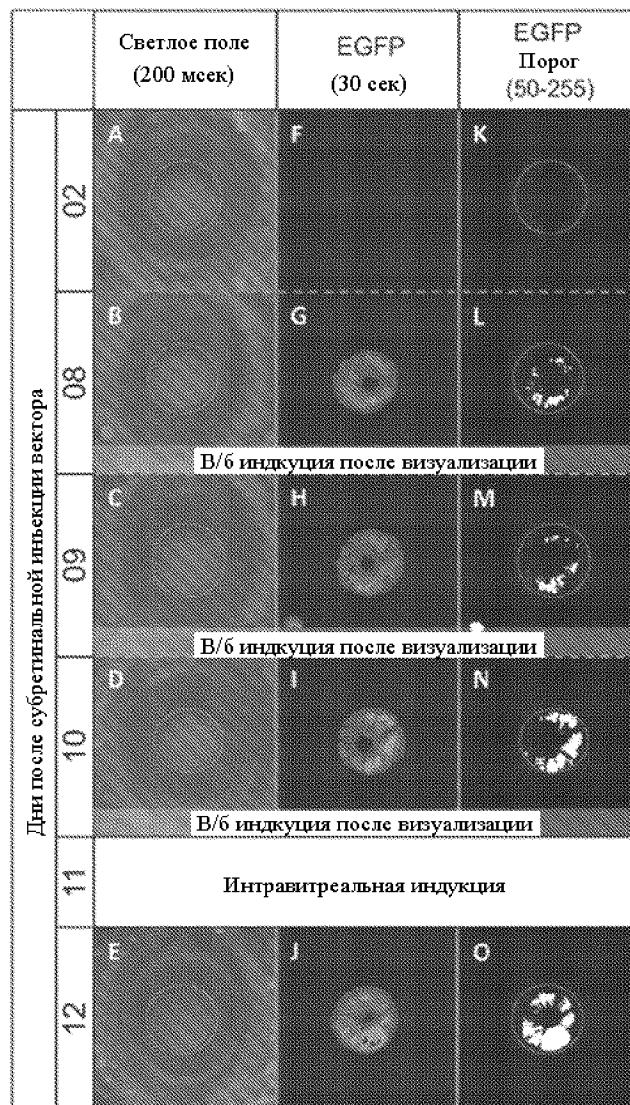
Фиг. 11с



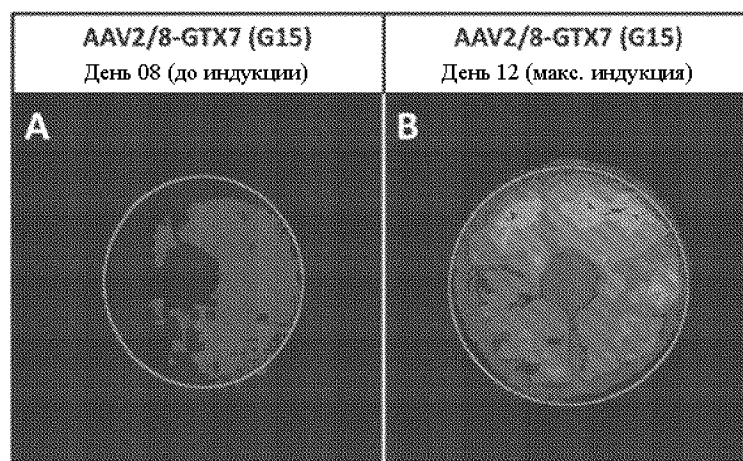
Фиг. 11d



Фиг. 12

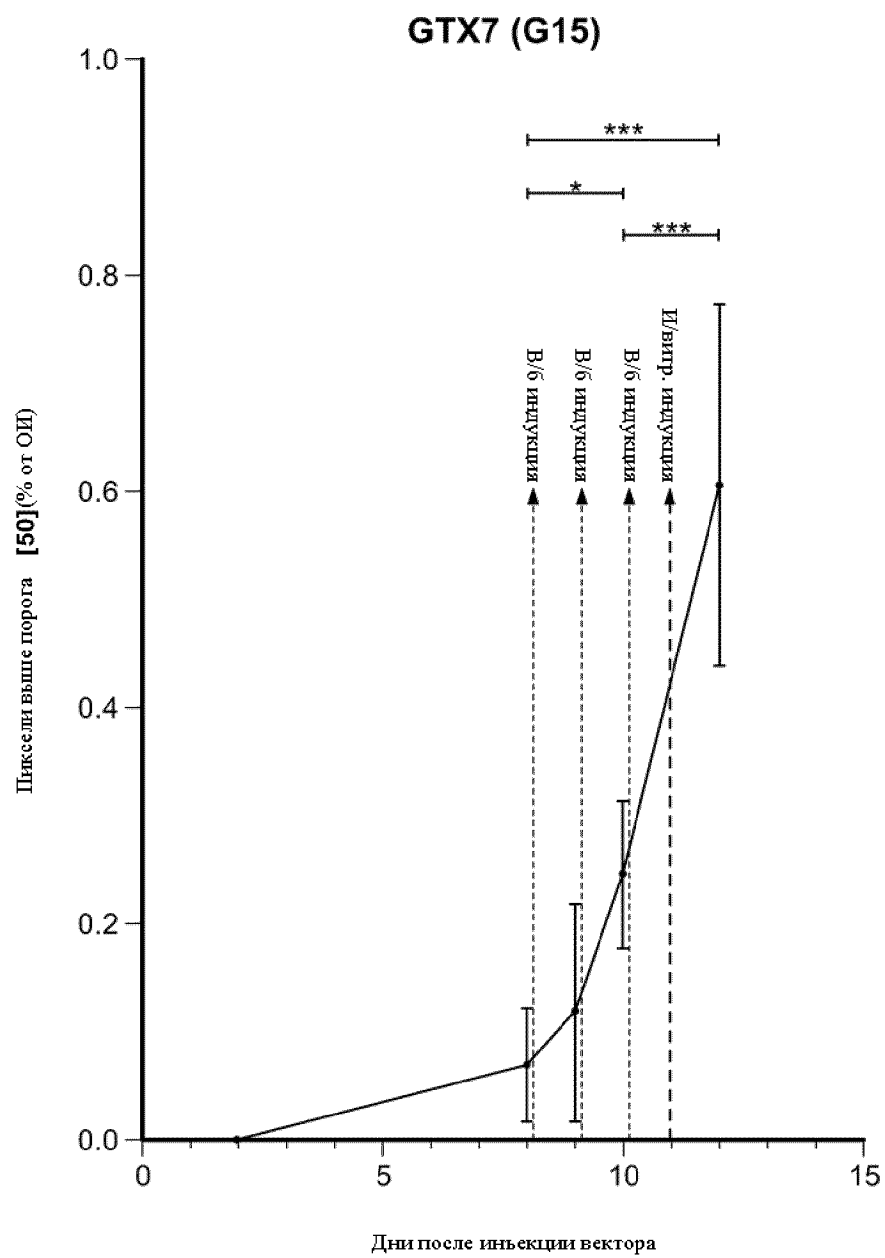


Фиг. 13а



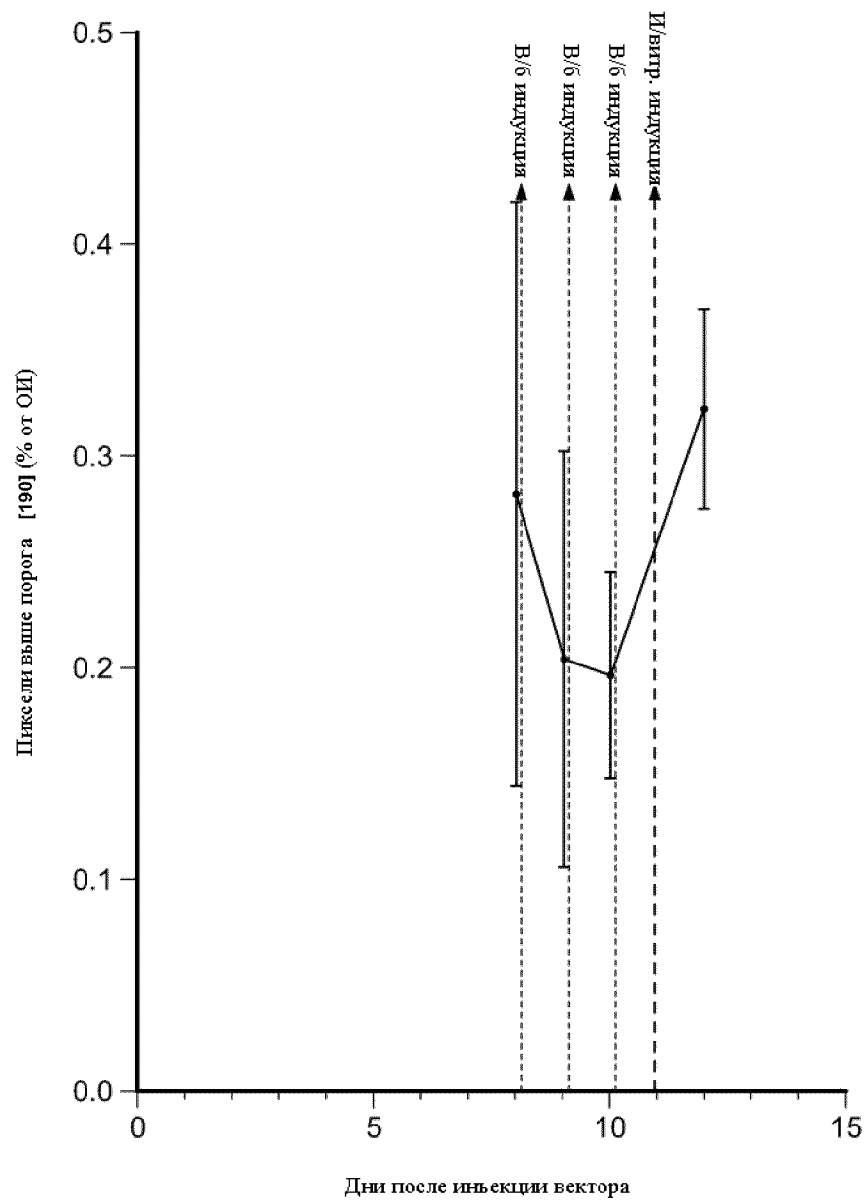
Экспозиция 30 сек

Фиг. 13b



Фиг. 13с

GTX5 (Контроль)



Фиг. 13d