

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201991828 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.12.30

(51) Int. Cl. C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/87 (2006.01)
C12N 15/67 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.02.09

(54) СИСТЕМА И СПОСОБ КЛЕТОЧНО-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ТРАНСЛЯЦИИ МОЛЕКУЛ
РНК В ЭУКАРИОТАХ

(31) 10 2017 103 383.1

(32) 2017.02.20

(33) DE

(86) РСТ/EP2018/053241

(87) WO 2018/149740 2018.08.23

(71) Заявитель:
аРсНА - Био ГбР (DE)

(72) Изобретатель:
Болен Хериберт, Хоффманн Бернд
(DE)

(74) Представитель:
Глухарёва А.О., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Парамонова К.В., Костюшенкова
М.Ю., Угрюмов В.М. (RU)

(57) Настоящая технология включает способы и конструкции РНК для направленной трансляции представляющего интерес полипептида в эукариотической клетке-мишени и их применение в терапевтических клинических приложениях.

A1

201991828

201991828

A1

Система и способ клеточно-специфической трансляции молекул РНК в эукариотах

Настоящее изобретение относится к способам и конструкциям РНК для направленной трансляции представляющего интерес полипептида в эукариотическую клетку-мишень и к их применению в терапевтических клинических приложениях.

Уровень техники изобретения

Направленное введение определенных молекул, например, релевантных с медицинской и фармакологической точки зрения белков или пептидов, влияющих на жизнеспособность клеток, при лечении рака является одной из важнейших задач современной клеточной биологии, но также является проблемой в этой области, которая еще не была удовлетворительно разрешена.

Использовались различные методики для высвобождения и активации представляющих интерес молекул путем нацеливания в сложных организмах, таких как люди. Здесь представляют особый интерес два разных подхода.

В подходе на основе систем-носителей, таких как липосомы (D. Papahadjopoulos, M. Moscarello, E.H. Eylar, T. Isac, *Biochim. Biophys. Acta.* 1975, 401, p. 317) молекулы (напр., противораковые терапевтические агенты), связываются с этими системами-носителями или встраиваются в них. Впоследствии, функционализированные таким образом системы-носители вводятся в организм, причем введение может включать в себя либо весь организм, либо только определенные части организма. В этом случае, системы-носители в идеале обеспечиваются так, что естественные условия организма не влияют на стабильность между системой-носителем и молекулой, представляющей интерес, и, следовательно, высвобождение молекулы исключается. Внешние факторы могут теперь дестабилизировать системы-носители и тем самым вызывать высвобождение и, следовательно, активность включенных молекул. В качестве внешних факторов для высвобождения используются локальный нагрев определенных областей тела (метод гипертермии) и расщепление специфических связей между системой-носителем и молекулой под действием света или pH. Все эти системы обобщены в общем и целом Qiu и Park (*Advanced Drug Delivery Reviews* 53 (2001) pp. 321-339 *Environment-sensitive hydrogels for drug delivery*) и Shamay с коллегами (*Biomaterials, Light induced drug delivery into cancer cells* 2011 32: pp. 1377-86). Однако во всех этих способах особую проблему вызывает то, что функциональные молекулы должны вводиться во все тело в

высокой концентрации, и это часто может приводить к побочным эффектам и неспецифическим высвобождениям. Кроме того, методологии работают специфичным для области, но не для конкретного типа клетки образом, и, таким образом, например, цитостатические агенты в дополнение к предполагаемым раковым клеткам также повреждают окружающую ткань или также быстро распространяются из области высвобождения в тело. Здесь также должны быть использованы высокие дозы.

В качестве второй методологии для нацеленного высвобождения молекул обычно применяются системы, в которых представляющие интерес молекулы связаны либо непосредственно, либо снова посредством систем-носителей с лигандами, которые имеют высокую специфичность к определенным поверхностным молекулам определенных типов клеток. Таким образом, лиганды связываются с высокоэкспрессированными поверхностными рецепторами раковых клеток, такими как GPRC или фолатные рецепторы (Lappano R, Maggiolini M., *Nat Rev Drug Discov.* 2011, 10: pp. 47-60, G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer; Sudimack J, Lee RJ., *Adv Drug Deliv Rev.* 2000, 41: pp. 147-62. Targeted drug delivery via the folate receptor). После того как лиганды связываются с поверхностными рецепторами, связанные молекулы могут либо непосредственно проявлять свою активность (например, радиофармацевтические препараты или контрастные реагенты для МРТ), либо проявлять свою функцию (напр., химиотерапевтические агенты или векторы ДНК) после фагоцитотического поглощения в клетках. Тем не менее, этот способ также имеет существенные недостатки, которые связаны с относительно высокой общей концентрацией во всей системе организма, а также связаны с тем фактом, что большинство поверхностных рецепторов не имеют абсолютной специфичности для отдельных типов клеток или клинических картин заболевания и, следовательно, связывание с такими рецепторами может быть связано с усилением побочных эффектов в здоровых тканях. Кроме того, различные специфические рецепторы не вызывают фагоцитотическое поглощение связанных систем-носителей после связывания, и, следовательно, эти системы носителей остаются вне клеток.

Наибольшее число биотехнологических, фармакологических и медицинских релевантных молекул для нацеленного переноса в определенные типы клеток/ткани представляют собой пептиды или белки, которые обычно кодируются на уровне ДНК. После введения этих молекул ДНК эти молекулы транспортируются в ядро клетки и затем по высококонсервативному механизму первоначально транскрибируются (транскрипция) в молекулы РНК, посттранскрипционно модифицируются и затем

транспортируются из ядра клетки для редескрипции внутри цитоплазмы по высоко консервативному механизму (трансляция) в аминокислотных последовательностях. Как транскрипционный, так и трансляционный механизмы идентичны в отношении основного механизма во всех эукариотических организмах и типах клеток. Это означает, что, хотя и с различной эффективностью, каждая последовательность ДНК, кодирующая пептид, генерирует один и тот же первичный продукт в каждой клетке, причем этот первичный продукт может быть впоследствии дополнительно модифицирован. Общий процесс транскрипции и трансляции называется экспрессией. Некоторые молекулы РНК остаются нетранслированными и выполняют отдельную функцию.

Селективные, нацеленные экспрессии последовательностей ДНК возможны, если кодирующая область сегмента ДНК зависимо регулируется специфическими для клеток или специфическими для органов последовательностями промоторов и энхансеров, а также степенью дифференцировки и созревания. Такие последовательности регулируют связывание транскрипционного аппарата и, таким образом, вызывают его активацию только в определенных условиях окружающей среды. Однако для этого типа нацеленной экспрессии конструкций ДНК невыгодно следующее: 1) конструкции ДНК могут быть высокоэффективно и гомогенно введены во все клетки организма или ткани только с большим трудом, 2) конструкции ДНК для последующей транскрипции всегда должны транспортироваться в ядро клетки и взаимодействовать там с природным генетическим материалом, в результате чего могут возникать мутации и последующие заболевания (напр., рак), и 3) специфичные для органа промоторные области часто очень велики и поэтому не подходят для использования во внешне введенных конструкциях ДНК.

В качестве альтернативы использованию конструкций ДНК для экспрессии молекул на основе аминокислот стадия ядерной транскрипции может быть обойдена путем непосредственного введения молекул РНК в клетки или клеточную ткань. Работы разных рабочих групп смогли показать (см. обзорную статью: Van Tendeloo VF, Ponsaerts P, Berneman ZN. mRNA-based gene transfer as a tool for gene and cell therapy. *Curr Opin Mol Ther.* 2007; 9: pp. 423-431), что введение молекул РНК происходит очень эффективно и быстро, не вызывая значительных уровней стресса в клетках. Введенные молекулы РНК остаются в цитоплазме клетки и, таким образом, не могут отрицательно взаимодействовать с геномом внутри ядра. С помощью консервативных трансляционных процессов введенные молекулы мРНК (англ. mRNA) и эндогенно (естественно) присутствующие молекулы мРНК превращаются в белки или пептиды. Для этой цели требуются определенные последовательности мотивов в молекуле мРНК, которые

можно найти в учебниках (напр., Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, 2011, Wiley-Blackwell), и они показаны в упрощенной форме на Фиг. 1. В этом случае молекулы мРНК обычно содержат следующие единицы:

1: кэп (англ. cap): Структура кэп представляет собой химическое изменение молекул мРНК у эукариот, которое резко повышает стабильность РНК и важно для транспорта РНК из ядра в цитоплазму и последующей трансляции мРНК рибосомами. Это обычно относится к модифицированному гуаниновому нуклеотиду, который связан с головой РНК во время транскрипции гена через редкую 5'-5' фосфодиэфирную связь.

2: нетранслируемая область 5': представляет нуклеотидную последовательность, расположенную перед кодирующей последовательностью. Область начинается в начальной точке транскрипции и заканчивается непосредственно перед трансляционным терминирующим кодоном. Внутри этой последовательности могут присутствовать регуляторные последовательности, которые оказывают влияние, например, через вторичные структуры на стабильность мРНК или действуют как сайты связывания для белка. Кроме того, обычно присутствует сайт связывания рибосомы.

3: кодирующая последовательность: Кодирующая последовательность содержит информацию для белка, который будет продуцироваться мРНК. Указанная последовательность начинается непосредственно с трансляционного инициаторного кодона и заканчивается трансляционным терминирующим кодоном. Нуклеотидная последовательность кодирующей последовательности предопределяется аминокислотной последовательностью кодируемого белка в контексте триплетного кода. В зависимости от используемого триплета, скорость экспрессии и стабильность мРНК могут быть зависимыми.

4: нетранслируемая область 3': представляет область, которая примыкает к области, кодирующей белок непосредственно за трансляционным терминирующим кодоном. Она охватывает всю область до начала полиаденилирования. В пределах нетранслируемой области 3' также могут присутствовать регуляторные последовательности, которые имеют особое значение для полиаденилирования РНК, а также для ее стабильности и транспорта.

5: поли(А) хвост: полиаденилирование происходит путем присоединения адениннуклеотидов к концу 3' мРНК на основе посттранскрипционной модификации мРНК поли(А) полимеразой. Длина поли(А) хвоста вносит существенный вклад в стабильность мРНК, а также указывает на тот факт, что белки связываются с этой последовательностью, и КЭП взаимодействует с поли(А) хвостом.

Недостатки использования молекул РНК, введенных извне, могут, однако, повлиять на некоторые применения в том, что i) молекулы РНК обычно имеют ограниченную продолжительность жизни, и, таким образом, образование белков происходит только в течение ограниченного периода времени. Поскольку основной механизм трансляции остается одинаковым у всех эукариот и существующих типов клеток, ii) ранее не было осуществлено никакой направленной, т.е. специфической для органа или типа клетки, экспрессии молекул мРНК, введенных в целый организм.

Результаты последних исследований (Quabium and Krupp, *Synthetic mRNAs for manipulating cellular phenotypes: an overview* (2015) *New Biotechnology*, 32: pp. 229-235) в настоящее время позволяют проводить высокоэффективную химическую модификацию молекул мРНК на разных уровнях для того, чтобы регулировать и, при необходимости, значительно увеличивать продолжительность жизни, описанную в пункте i). Такая модификация включает:

а) использование химически модифицированных последовательностей кэп на основе встречающегося в природе кэп m⁷G5'pppN. Примеры этого можно найти в Jamielity et al. *Synthetic mRNA cap analogs with a modified triphosphate bridge - synthesis, applications and prospects* (2010) *New. J. Chem* 34: pp. 829-844. С одной стороны, такие модификации повышают эффективность трансляции за счет эффективного связывания субъединиц трансляционного аппарата. С другой стороны, они улучшают стабильность молекул мРНК, вероятно, благодаря тому факту, что нуклеазы могут взаимодействовать с мРНК менее эффективно с 5-концевых сторон.

б) использование стабильных нетранслируемых областей 5' и 3'. Как правило, стабильность может значительно зависеть от использования соответствующих нуклеотидных последовательностей. Присоединение партнеров по связыванию и образование вторичных структур путем спаривания оснований являются основными причинами стабилизации.

с) использование химически модифицированных нуклеотидов. Нуклеотиды такого типа, такие как 5-метилцитидин или псевдоуридин, в первую очередь влияют на связывание эндонуклеаз и, таким образом, предотвращают быструю деградацию молекул мРНК.

д) использование эффективных последовательностей полиаденилирования в нетранслируемой области 3' для получения максимально длинных полиаденилированных.

Задачей настоящего изобретения является, среди прочего, создание способов и конструкций РНК, которые обеспечивают определенную экспрессию мРНК в определенных типах клеток.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к применению сложных молекул РНК и матричной РНК (мРНК), которые защищены от деградации, для клеточно-селективной экспрессии внутриклеточно активных или секретируемых фрагментов РНК, пептидов или белков.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к способам нацеленной трансляции представляющего интерес полипептида в эукариотической клетке-мишени, характеризующимся введением в клетки конструкции РНК, причем конструкция РНК имеет по меньшей мере следующие элементы в направлении от 5' до 3':

(а) антикодогенный элемент (а), который комплементарен по меньшей мере части мРНК гена, экспрессируемого клеткой-мишенью;

(b) блокирующий элемент (b), который взаимодействует по меньшей мере с частью трансляционного инициаторного элемента (d) в позиции 3';

(с) стабилизирующий элемент (с);

(d) трансляционный инициаторный элемент (d);

(е) последовательность (е), кодирующая представляющий интерес полипептид,

(f)

причем трансляция представляющего интерес полипептида предотвращается в нецелевой эукариотической клетке путем спаривания оснований блокирующего элемента (b) с трансляционным инициаторным элементом (d), а трансляция кодированного полипептида происходит в эукариотической клетке-мишени вследствие процессирования конструкции РНК, индуцированного взаимодействием антикодогенного элемента с мРНК, экспрессированной клеткой-мишенью.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам нацеленной трансляции аминокислотной последовательности любой длины, т.е. представляющего интерес полипептида в эукариотической клетке-мишени, характеризующейся введением в клетки конструкции РНК, причем конструкция РНК имеет по меньшей мере следующие элементы в направлении от 5' до 3':

(а) антикодогенный элемент (а), который комплементарен по меньшей мере части мРНК гена, экспрессированного клеткой-мишенью;

(b) блокирующий элемент (b), который комплементарен или иным образом обратимо изменяет свою функциональность по меньшей мере в части трансляционного инициаторного элемента (d) в позиции 3';

(c) стабилизирующий элемент (c);

(d) трансляционный инициаторный элемент (d);

(e) последовательность (e), кодирующая представляющий интерес полипептид,

причем трансляция представляющего интерес полипептида предотвращается в нецелевой эукариотической клетке путем спаривания оснований или другого взаимодействия блокирующего элемента (b) с трансляционным инициаторным элементом (d), а трансляция кодированного полипептида происходит в эукариотической клетке-мишени вследствие процессирования (деградации) конструкции РНК, вызванного взаимодействием антикодогенного элемента с мРНК, специфически экспрессированной клеткой-мишенью. Это процессирование прерывается стабилизирующим элементом (c), что приводит к активации трансляционного инициаторного элемента (d).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к конструкции РНК для нацеленной трансляции представляющего интерес полипептида в эукариотической клетке-мишени, причем конструкция РНК имеет по меньшей мере следующие элементы в направлении от 5' до 3':

(a) антикодогенный элемент (a), который является комплементарным по меньшей мере части РНК части ДНК, экспрессированной клеткой-мишенью, или индуцирует специфическую для типа клетки деградацию;

(b) блокирующий элемент (b), который комплементарен или иным образом ингибирует по меньшей мере часть трансляционного инициаторного элемента (d) в положении 3';

(c) стабилизирующий элемент (c), который ограничивает специфическую для типа клеток деградацию РНК до ее части;

(d) трансляционный инициаторный элемент (d), который функционирует независимо от 5' кэп и активен только в клетках-мишенях;

(e) последовательность (e), кодирующая интересующий полипептид;

причем трансляция представляющего интерес полипептида предотвращается в нецелевой эукариотической клетке путем спаривания оснований или другого взаимодействия блокирующего элемента (b) с трансляционным инициаторным

элементом (d), а трансляция кодированного полипептида в эукариотической клетке-мишени вследствие взаимодействия антикодогенного элемента (a) с РНК, экспрессируемой клеткой-мишенью, происходит специфическое процессирование конструкции РНК, в результате которого активируется трансляционный инициаторный элемент (d).

В дальнейших аспектах настоящее изобретение относится к применению описанных в настоящем документе способов и конструкций РНК в терапевтических клинических приложениях, при новообразованиях, основных иммунологических расстройствах и метаболических расстройствах. Кроме того, способы и конструкции РНК, описанные в настоящем документе, являются подходящими для специфической в отношении типа клеток экспрессии необходимых компонентов для редактирования генов, и, следовательно, для лечения заболеваний зародышевой линии. В дополнение к этим типичным применениям взрослые стволовые клетки (iPS, мульти-, тотипотентные или плюрипотентные) млекопитающих и полученные из них ткани могут также служить клетками-мишенями *in vitro*. Ткань или отдельные клетки, полученные из этих клеток, могут затем использоваться как *in vivo* у людей, так и при разработке лекарственных средств.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет собой схематическую иллюстрацию молекулы мРНК. Все части мРНК могут иметь регуляторную функцию для стабильности молекулы.

Фиг. 2 представляет собой схематическую иллюстрацию варианта выполнения конструкции РНК по настоящему изобретению для селективной экспрессии последовательностей-мишеней в специфических типах клеток после введения молекулы мРНК в орган или организм.

Фиг. 3 представляет собой схематическую иллюстрацию другого варианта выполнения конструкции РНК по настоящему изобретению для селективной экспрессии последовательностей-мишеней в определенных типах клеток, где 1 = КЭП/модификации, 2 = 5' UTR, 3 = антикодогенный фрагмент, 4 = linker_IRES blocker_linker, 5 = стабилизирующий элемент, 6 = IHRRES, 7 = интересующая последовательность, 8 и 9 = 3' UTR и поли(A).

Фиг. 4 А) представляет собой схематическую иллюстрацию одного варианта выполнения конструкции РНК по настоящему изобретению до и после процессирования антикодогенным взаимодействием между элементом 3 и РНК, специфичной для типа

клеток. При связывании с целевой РНК элемент антикодогенной последовательности приводит к деградации мотивов 1-4 с помощью установленных механизмов.

В) показывает рассчитанную вторичную структуру типичной функциональной последовательности IRES (6) из HCV (IRES HCV 1b).

На Фиг. 5 показана первичная последовательность нуклеиновой кислоты IRES (HCV IRES 1b); позиция 6 на Фиг. 4: SEQ ID NO: 1. Соответствующая функциональная вторичная структура показана на Фиг. 4.

Фиг. 6 А) представляет собой схематическую иллюстрацию одного варианта выполнения конструкции РНК по настоящему изобретению до и после процессирования антикодогенным взаимодействием между элементом 3 и РНК, специфичной для типа клеток. При связывании с целевой РНК элемент антикодогенной последовательности приводит к деградации мотивов 1-4 с помощью установленных механизмов.

В) представляет собой схематическую иллюстрацию вторичной структуры типичной последовательности IRES (6) из HCV (HCV IRES 1b) с 3 стабилизирующими элементами (5).

На Фиг. 7 показана первичная последовательность IRES (позиция 6 на Фиг. 6) с 3 стабилизирующими элементами (позиция 5 на Фиг. 6): SEQ ID NO: 2. Соответствующая функциональная вторичная структура показана на Фиг. 6.

Фиг. 8 А) представляет собой схематическую иллюстрацию одного варианта выполнения конструкции РНК по настоящему изобретению до и после процессирования антикодогенным взаимодействием между элементом 3 и РНК, специфичной для типа клеток. При связывании с мишенью РНК элемент антикодогенной последовательности приводит к деградации мотивов 1-4 с помощью установленных механизмов.

В) представляет собой схематическую иллюстрацию вторичной структуры типичной последовательности IRES (6) из HCV (HCV IRES 1b) с 3 стабилизирующими элементами (5) и линкерами (4a).

На Фиг. 9 показана первичная последовательность IRES (позиция 6 на Фиг. 8) с 3 стабилизирующими элементами (позиция 5 на Фиг. 8 подчеркнуто) и линкерами (позиция 4a на Фиг. 8 обведено): SEQ ID NO: 3. Соответствующая функциональная вторичная структура показана на Фиг. 8.

Фиг. 10 А) представляет собой схематическую иллюстрацию одного варианта выполнения конструкции РНК по настоящему изобретению до и после процессирования антикодогенным взаимодействием между элементом 3 и РНК, специфичной для типа

клеток. При связывании с мишенью РНК элемент антикодогенной последовательности приводит к деградации мотивов 1-4 с помощью установленных механизмов.

В) представляет собой схематическую иллюстрацию вторичной структуры типичной последовательности IRES (6) из HCV (HCV IRES 1b) с 3 стабилизирующими элементами (5), линкерами (4a) и блокаторами (4b).

На Фиг. 11 показана первичная последовательность IRES (позиция 6 на Фиг. 10) с 3 стабилизирующими элементами (позиция 5 на Фиг. 10 подчеркнута), линкерами (позиция 4a на Фиг. 8 обведена) и блокаторами (4b, жирный шрифт): SEQ ID NO: 4. Соответствующая вторичная структура показана на Фиг. 10.

На Фиг. 12 показан пример нуклеотидной последовательности функциональной системы для селективной экспрессии последовательностей-мишеней в определенных типах клеток.

На Фиг. 13 показан пример нуклеотидной последовательности функциональной системы с альтернативной антисмысловой последовательностью для селективной экспрессии последовательностей-мишеней в определенных типах клеток.

На Фиг. 14 показан пример нуклеотидной последовательности функциональной системы с альтернативной антисмысловой последовательностью и альтернативной блокаторной последовательностью для селективной экспрессии последовательностей-мишеней в определенных типах клеток.

На Фиг. 15 показаны микроскопические изображения контролируемой блокатором IRES селективной экспрессии GFP, зависящей от типа клеток.

На Фиг. 16 показаны таблицы для количественной оценки функциональной системы для селективной экспрессии генов-мишеней.

Далее изобретение описано более подробно на основе практических примеров со ссылкой на чертежи без ограничения общей концепции изобретения. На чертежах:

Подробное описание изобретения

Описано использование сложных молекул РНК и матричной РНК (мРНК), которые защищены от деградации, для клеточно-селективной экспрессии внутриклеточно активных или секретируемых фрагментов РНК, пептидов или белков. Базовая структура молекулы РНК содержит стабилизирующие структуры, регуляторную область и функциональную область, которая кодирует представляющую интерес последовательность. Регуляторная структура действует как конститутивный ингибитор экспрессии представляющей интерес последовательности. Ингибирование выключается

только тогда, когда специфическое связывание вызывает избирательное разрушение регуляторной части, что приводит к экспрессии представляющей интерес последовательности.

Изобретение включает способ и систему для конструирования подходящих последовательностей РНК, с помощью которых можно после введения в клетки любого типа индуцировать функциональность последовательности-мишени или полученной из нее структуры на основе аминокислот только в определенных типах клеток и предотвратить это во всех других типах клеток.

Для того чтобы решить проблему определенной экспрессии молекул мРНК в определенных типах клеток после введения в организм в целом или в его части, различные последовательности мотивов объединяются в контексте данной патентной заявки так, что функциональная трансляция представляющей интерес последовательности возможна только в желаемых типах клеток, тогда как это невозможно в других типах клеток. Адаптируя последовательности мотивов, зависимое от типа клетки взаимодействие между активацией и инактивацией может быть адаптировано или полностью изменено. В общем, система устроена так, что восходящие последовательности в области 5' регулируют стабильность системы и в то же время ингибируют или в целом регулируют представляющие интерес последовательности мотивов в области 3'. Ингибированные последовательности в области 3', в частности, представляют собой последовательности внутреннего сайта связывания рибосомы (IRES), которые могут служить началом вторичной трансляции. Ингибирование путем спаривания оснований в молекуле мРНК постоянно поддерживается до тех пор, пока мРНК в подходящих клетках-мишенях не встретит специфические для типа клеток эндогенные молекулы мРНК, которые образуют антисмысловые активные пары оснований с последовательностями в области 5' введенной мРНК, вызывая тем самым деградацию передней области введенной мРНК. Это отменяет ингибирование IRES и позволяет экспрессию последовательности-мишени. Молекулы мРНК, специфически регулируемые по типу клеток, формируются подробно в соответствии со схемой, показанной на Фиг. 2, которая более подробно поясняется ниже. В этом случае, при необходимости, отдельные последовательности мотивов также можно пропускать, менять местами в их порядке, заменять другими мотивами или дополнять другими мотивами.

Фиг. 2 представляет собой схематическую иллюстрацию молекулы мРНК для селективной экспрессии последовательностей-мишеней в определенных типах клеток после введения молекулы мРНК в орган или в организм.

1) Необязательное использование последовательности КЭП. Эта последовательность может представлять собой природный кэп 7-метилгуанозина (m7G) или также может содержать химические или другие модификации. Последовательность КЭП служит для регулирования стабильности и эффективности трансляции первичной последовательности. Для определенных применений, таких как разработка молекул РНК или фрагментов РНК с низкой стабильностью, также можно обойтись без последовательности КЭП.

2) Использование 5'-нетранслируемой последовательности. Эта последовательность служит, прежде всего, для регулирования стабильности (периода полужизни) введенной мРНК. Нуклеотидные последовательности могут быть либо синтетической природы, либо взяты из последовательностей известных генов. В зависимости от требуемой стабильности в эту область могут быть интегрированы дополнительные последовательности, индивидуально или в комбинации, которые регулируют стабильность и скорость трансляции. Примерами могут быть G-квадруплексы (высокая стабильность мРНК с одновременно низкой скоростью трансляции) или сайты связывания для эндонуклеаз (снижение стабильности мРНК). Длина 5'-нетранслируемой последовательности выбирается произвольно и может быть равна нулю, если требуется.

3) После 5'-нетранслируемой последовательности фактическая регуляторная кассета начинает специфичную для типа клеток экспрессию искусственно введенных молекул мРНК. Исходной точкой является антисмысловая или РНКи-активная (RNAi-активная) антикодогенная последовательность во введенной мРНК против гена, специфически экспрессируемого в желаемом типе клеток. Если конструкция мРНК вводится в клетку, в которой ген, специфичный для типа клетки, не транскрибируется, никакого взаимодействия не происходит. Однако, если присутствует такая смысловая мРНК, между смысловой и антисмысловой цепью происходит спаривание оснований, в результате чего индуцируется последующая деградация как смысловой, так и антисмысловой цепи. Сама по себе деградация инициируется и осуществляется консервативными белковыми комплексами во всех клетках, в частности, ферментным комплексом RISC (индуцированный РНК комплекс молчания) и рибонуклеазами Dicer и Drosha, играющими важную роль (Sontheimer EJ (2005). "Assembly and function of RNA

silencing complexes.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 6: pp. 127-138). В зависимости от окружающих последовательностей деградация может включать всю введенную цепь мРНК или ограничиваться дополнительными последовательностями.

Специфичные для типа клеток или органа профили экспрессии белка известны как предшествующий уровень техники, основанный на современных анализах транскриптома или протеома почти для каждого типа клеток или ткани, и могут легко служить основой для предварительного отбора (см., например, Ko et al. *PNAS*, 2013, 110: pp. 3095-3100 or Whitfield et al. *PNAS*, 2003, 100: pp. 12319-12324).

Для того чтобы идентифицировать подходящие антикодогенные элементы (3), имеющие наилучшую возможную антисмысловую функцию, можно принимать во внимание различные параметры. См. в качестве примера: Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001 May 24; 411 (6836): pp. 494-8. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*. 2001 Jan 15; 15 (2): pp. 188-200. Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol*. 2004 Mar; 22 (3): pp. 326-30.

Согласно изобретению следующие параметры должны играть роль в этом случае:

- Антикодогенная последовательность предпочтительно от 50 до 100 нт ниже инициаторного кодона
- Поиск последовательностей мотивов AA(N₁₉)TT, или NA(N₂₁), или NAR(N₁₇)YNN, где N = любой нуклеотид, R = пурин и Y = пиримидины
- Антикодогенная последовательность предпочтительно с содержанием G+C 35-60%
- Уход от четырех или более одинаковых нуклеотидов подряд
- Уход от последовательностей мотивов с высокой гомологией с другими генами.

4) За антисмысловой/РНКи-активной последовательностью следует последовательность, которая способна образовывать пары оснований или иным образом взаимодействовать с IRES или IRES-подобной последовательностью в области 3' конструкции и, следовательно, функционировать как блокатор IRES. Поскольку сами последовательности IRES также могут выполнять свою функцию в качестве КЭП-независимых инициаторов трансляции, главным образом, исключительно посредством специально сконструированных вторичных структур, дополнительные пары оснований между блокатором IRES и последовательностью IRES изменяют эти последовательности

таким образом, что IRES-зависимая инициация трансляции не происходит, пока присутствует блокатор IRES. Блокирование IRES происходит на всей длине введенной мРНК. Поскольку определенные индуцированные изменения длины мРНК происходят только при связывании специфической антисмысловой/РНКи последовательности со смысловой мРНК, активность IRES выключается во всех клетках, которые не имеют подходящей смысловой мРНК. Присутствие этой смысловой мРНК в специфических типах клеток, однако, приводит к антисмысловому-смысловому связыванию и, следовательно, к индукции деградации введенной мРНК, в результате чего нарушается блокаторная последовательность IRES и, таким образом, теряется его блокирующий эффект на формирование вторичной структуры последовательности IRES. Блокаторная последовательность IRES отличается тем, что она i) содержит антикодогенные части последовательности IRES, связывается с ii) одним или несколькими секциями последовательности последовательности IRES, iii) может содержать спейсерные последовательности между антикодогенными частями последовательности IRES, где спейсерные последовательности могут содержать композиции, различающиеся по длине и нуклеотидному составу, iv) предпочтительно связывается со стеблевыми последовательностями или петлевыми последовательностями IRES для того, чтобы изменить их вторичную структуру, v) тем, что последовательности имеют переменную длину по отношению к антикодогенным нуклеотидам IRES без обычного развития антисмысловой или РНКи-активности самостоятельно. В этом случае изменения во вторичной структуре IRES с помощью блокатора могут быть только минимальными для того, чтобы эффективно отключить функцию IRES и разрешить повторное сворачивание последовательности IRES при деградации блокатора. Для того чтобы обеспечить наилучшее возможное связывание блокатора IRES и IRES, блокаторная последовательность IRES может быть окружена как предшествующими, так и последующими последовательностями мотивов линкерных последовательностей, которые могут варьироваться по длине.

5) Для того чтобы ограничить полную деградацию введенной мРНК в ее специфических областях после связывания смысловых и антисмысловых/РНКи мотивов мРНК, должны быть включены последовательности мотивов мРНК, которые прерывают деградацию из-за партнеров по связыванию или вторичных структур. Такие последовательности мотивов могут включать петли шпильки или петли стебля. Они могут использоваться в одинарном или многократном выравнивании как в 5', так и в 3' направлении для смыслового-антисмыслового спаривания. Таким образом,

использование последовательностей мотивов, которые обычно стабилизируются вторичными структурами или партнерами по связыванию, приводит в сочетании со специфической антисмысловой/РНКи-кассетой в клетках-мишенях со смысловым спариванием к прерыванию деградации мРНК и тем самым к стабилизации мотивов РНК, расположенных в направлении 3' к этой последовательности. Здесь стабильные вторичные структуры затем принимают на себя функцию КЭП по отношению к стабилизации, но не по отношению к инициации трансляции. В клетках, в которых смысловое-антисмысловое спаривание не происходит, общая длина мРНК сохраняется, и петлевые структуры остаются без значимой функции. Стабильные вторичные структуры мРНК могут быть связаны с соседними последовательностями мотивов с соединяющими последовательностями (линкерами) или без них.

6) Поскольку последовательность КЭП, необходимая для инициации трансляции, отщепляется в клетках-мишенях, CAP-независимый сайт связывания рибосомы должен быть интегрирован в последовательность за стабильными вторичными структурами мРНК, чтобы инициировать формирование пептида или белка. Для этой цели IRES или аналогичная последовательность инициатора трансляции включается в направлении 3', причем эта последовательность обычно обеспечивает прямое связывание рибосомных субъединиц благодаря своей развитой вторичной структуре. Последовательности IRES могут быть клеточными, вирусными или синтетическими. Из-за того, что блокаторные последовательности IRES соответствуют последовательности IRES в одной и той же полноразмерной конструкции мРНК, и эти блокаторные последовательности предотвращают образование вторичной структуры IRES, необходимой для инициации трансляции путем спаривания оснований, последовательность IRES неактивна в нецелевых клетках и при этом присутствует полноразмерная мРНК. Напротив, в клетках-мишенях деградация блокаторной последовательности IRES происходит посредством смыслового-антисмыслового/РНКи взаимодействия, в результате чего функциональная вторичная структура IRES формируется энергетически управляемыми процессами и может функционировать для трансляции последующих кодирующих последовательностей. Последовательность IRES может быть включена с линкерными последовательностями или без них в окружающие последовательности мотивов. Альтернативно, могут быть использованы нуклеотидные последовательности, которые не считаются IRES, но все же могут выступать в качестве инициаторов трансляции.

7) В положение 3' по отношению к используемой IRES или IRES-подобной структуре могут быть введены кодирующие последовательности, которые

транскрибируются посредством трансляции в пептиды или белки. Трансляция этих последовательностей мотивов происходит исключительно в клетках, в которых активна последовательность IRES, т.е. в клетках-мишенях, в которых эндогенные смысловые последовательности также транскрибируются в антисмысловой/РНКи мотив во введенной мРНК. Последовательности РНК для трансляции могут кодировать любые желаемые аминокислотные последовательности и, таким образом, например, образовывать терапевтически активные пептиды и белки, токсины, антитела, интерлейкины или поверхностные рецепторы.

8) После определенной транслируемой рамки считывания необходимы дополнительные последовательности в направлении 3', которые, в свою очередь, обеспечивают стабильность как полноразмерной мРНК, так и мРНК, которая усекается в клетках-мишенях. Эти последовательности включают как нетранслируемую область 3', так и поли(А) хвост, причем хвост также характерен почти для каждой эндогенной мРНК. В зависимости от необходимости могут быть использованы эндогенные или синтетические последовательности мотивов. В зависимости от желаемой стабильности конструкции мРНК это может быть отрегулировано методом нацеливания путем соответствующего выбора последовательности мотива. В этом случае являются особенно важными i) сформированные вторичные структуры внутри мотива, ii) возможные сайты связывания для стабилизирующих/дестабилизирующих факторов и iii) длина поли(А) хвоста.

На основе этой системы впервые возможна селективная регулируемая экспрессия последовательностей-мишеней, даже когда молекулы мРНК вводятся в весь организм.

Конструкции РНК по настоящему изобретению могут быть введены в клетку-мишень различными способами. Они могут проникать в клетку путем трансфекции, слияния мембран, электропорации или в виде ретровирусного вектора. Например, в WO 02/44321 раскрывается введение чужеродного гена-мишени в клетку.

В конкретном варианте выполнения настоящего изобретения взаимодействие антикодогенного элемента (a) с мРНК, экспрессированной клеткой-мишенью, приводит к деградации или инактивации блокирующего элемента (b), так что может происходить трансляция представляющего интерес полипептида. В дополнительном варианте выполнения изобретения деградация мРНК на стабилизирующем элементе (c) останавливается.

В дополнительных предпочтительных вариантах выполнения изобретения антикодогенный элемент (а) имеет одну или несколько из следующих особенностей и имеет следующую функцию или функции после введения в клетку-мишень:

- (i) прикрепление к последовательности РНК, специфичной для клетки-мишени.
- (ii) образование двухцепочечных гибридов РНК свободно регулируемой длины
- (iii) индукция клеточной деградации введенной конструкции РНК в области двухцепочечного гибрида РНК.

В дополнительных предпочтительных вариантах выполнения изобретения блокирующий элемент (b) имеет одну или несколько из следующих особенностей:

- (i) функция трансляционного инициаторного элемента подавляется.
- (ii) блокирующий элемент может быть деградирован или инактивирован в подходящих условиях.
- (iii) подавляющая функция в трансляционном инициаторном элементе является обратимой после инактивации или деградации блокирующего элемента.
- (iv) блокирующий элемент выполняет свою функцию путем спаривания оснований в последовательности или рядом с последовательностью трансляционного инициаторного элемента, тем самым изменяя его вторичную структуру.

(v) блокирующий элемент выполняет свою функцию, заставляя другие молекулы прямо или косвенно ингибировать трансляционный инициаторный элемент.

В дополнительных предпочтительных вариантах выполнения изобретения стабилизирующий элемент (с) имеет одну или несколько из следующих особенностей:

- (i) нуклеотидная последовательность, которая предотвращает деградацию РНК в направлении 3' экзо- и/или эндонуклеазами.
- (ii) нуклеотидная последовательность, характеризующаяся тем, что она образует стабилизирующие вторичные структуры, такие как стебель-петли.
- (iii) нуклеотидная последовательность, характеризующаяся тем, что стабилизирующие элементы, такие как пептиды или белки, связываются с РНК.
- (iv) нуклеотидная последовательность, характеризующаяся тем, что молекулы связываются с РНК и выполняют химическую, стабилизирующую модификацию конца 5' РНК.

В дополнительных предпочтительных вариантах выполнения изобретения трансляционный инициаторный элемент (d) имеет одну или несколько из следующих особенностей:

(i) избирательное ингибирование функции инициации трансляции, зависящее от типа клеток

(ii) функциональность исключительно при деградации или инактивации компонентов регуляторной кассеты (элементов а и b)

(iii) функциональность исключительно в клетках-мишенях, в то время как трансляционный инициаторный элемент неактивен во всех других типах клеток.

(iv) индукция трансляции независимо от структуры кэп в области 5' исходной конструкции РНК.

(v) индукция трансляции посредством прямого или косвенного связывания рибосомных субъединиц или полных рибосом (напр., последовательностей IRES).

(vi) индукция трансляции путем образования или высвобождения специфических вторичных структур после выключения ингибирования блокирующим элементом

(vii) индукция трансляции путем присоединения определенных молекул или химической модификации после выключения ингибирования блокирующим элементом

В особенно предпочтительных вариантах выполнения настоящего изобретения конструкция РНК имеет комбинацию антикодогенной и IRES-зависимой регуляции экспрессии.

Деградация блокирующего элемента может происходить, например, через систему антисмысловой или миРНК-зависимой (англ. siRNA) деградации мРНК. Феномен, известный в литературе как «РНК-интерференция» (РНКи), основан на том факте, что малые молекулы РНК (миРНК, малая интерферирующая РНК) в клетке могут взаимодействовать с матричной РНК (мРНК) (литература: Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C., Nature Feb 19, 1998; 391 (6669): pp. 744-745). Из-за сложного механизма, который контролируется ферментами (например, с помощью комплекса DICER и RISC), происходит деградация мРНК. В дополнение к миРНК были обнаружены другие малые виды РНК, такие как «микроРНК» (англ. miRNA) или «короткие шпилечные РНК» (англ. shRNA), которые также могут ингибировать экспрессию белка посредством связанных механизмов.

Инициирование трансляции конструкции РНК в клетку-мишень, вызванное деградацией и/или инактивацией блокирующего элемента, представляет собой сложный процесс, включающий согласованное взаимодействие многочисленных факторов ((Pain, V.M., 1996, Eur. J. Biochem. 236, pp. 747-771). Для большинства мРНК первым шагом является рекрутирование рибосомных субъединиц 40S в РНК на конце 5' или рядом с ним (Фиг. 1). Ассоциация 40S с мРНК значительно облегчается благодаря комплексу

кэп-связывания eIF4F. Фактор eIF4F состоит из трех субъединиц: РНК-геликазы eIF4A, кэп-связывающего белка eIF4E и мультиадапторного белка eIF4 G, который действует как каркас для белков в комплексе и сайтах связывания для eIF4E, eIF4a, eIF3 и имеет поли(А)-связывающий белок.

Заражение клеток различными РНК-вирусами приводит к селективному ингибированию трансляции мРНК хозяина, но не вируса. Например, заражение клеток полиовирусом, цитоплазматическим РНК-вирусом приводит к модификации множества факторов инициации трансляции. В частности, протеолиз обеих форм eIF4G, eIF4GI и eIF4GII (Gradi et al. 1998, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95, pp. 11089-11094) кодированными вирусом протеазами приводит к ингибированию трансляции большинства клеточных мРНК, имеющих кэп. Напротив, трансляция мРНК полиовируса, содержащих специфическую последовательность в виде IRES в 5'-UTR, где эта последовательность содержит 450 нуклеотидов и может рекрутировать субъединицы 40S в отсутствие интактного eIF4F, не ингибируется (Jang et al. 1988 J. Virol. 62, pp. 2363-2643). Элементы IRES были обнаружены в пикорнавирусной, флавивирусной, пестивирусной, ретровирусной, лентивирусной и вирусной РНК насекомых, а также в клеточной РНК животных. Обзор известных последовательностей мотивов IRES отражает состояние научных знаний (представлен в виде обзора по адресу: <http://www.iresite.org> (по состоянию на 2.1.2017)). Содержащие IRES мРНК животных могут рекрутировать рибосомные субъединицы как через их конец кэп 5', так и через их элементы IRES. В результате, трансляция возможна в условиях, при которых кэп-зависимая трансляция снижается, напр., во время вирусной инфекции, во время фазы G2/M клеточного цикла, апоптоза или стрессовых состояний (Johannes et al. (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, pp. 13118-13123; Cornelis et al. (2000), molecular Cell 5, pp. 597-605; Pyronnet et al. (2000), molecular Cell 5, pp. 607-616; Stein et al., 1998, Mol. and Cell. Biol. 18, pp. 3112-3119; Holcik et al., 2000, Oncogene 19, pp. 4174-4177; Stoneley et al., 2000, mol. and Cell. Biol. 20, pp. 1162-1169). Вплоть до 3% клеточных мРНК животных транслируется при пониженной концентрации кэп-связывающего комплекса eIF4F (Johannes et al., 1999).

Для конструкций РНК по настоящему изобретению множество различных элементов IRES могут быть использованы в качестве трансляционного инициаторного элемента. Например, в предшествующем уровне техники описаны элементы IRES, используемые для кэп-независимой экспрессии чужеродных генов в линейной мультицистронной мРНК в клетках животных (US 6 060 273; US 6 114 146; US 5 358 856;

US 6 096 505; US 171 821; US 5 766 903), в растительных клетках (WO 98/54342) и, более
обще, в эукариотических клетках (US 171 821; US 5 766 903; US 5 925 565; US 6 114 146).

Например, вторичная структура элемента IRES остается незатронутой и, таким
образом, функциональной и изменяется (= инактивируется) только путем
соответствующего выбора блокирующего элемента (b).

В дополнительных предпочтительных вариантах выполнения изобретения
конструкция РНК имеет один или несколько из следующих необязательных признаков:

(i) последовательность кэп 5' для того, чтобы увеличить стабильность всей
конструкции мРНК

(ii) нетранслируемая область 5' для того, чтобы иметь возможность регулировать
стабильность всей конструкции мРНК и подавлять индуцированную кэп 5' трансляцию
(напр., включение квадруплексных последовательностей)

(iii) нетранслируемая область 3' для того, чтобы повысить стабильность всей
конструкции мРНК и частичного фрагмента обработанной мРНК в клетках-мишенях.

(iv) поли(А) область для того, чтобы повысить стабильность всей конструкции
мРНК и частичного фрагмента обработанной мРНК в клетках-мишенях.

(v) все элементы целой конструкции мРНК по пп. 1-8 могут содержать линкерные
последовательности любой длины внутри самого элемента или между отдельными
элементами. Линкерные последовательности могут быть безфункциональными и
использоваться для чистого пространственного разделения отдельных элементов или для
интеграции дополнительных функций в систему.

Практические примеры:

1.) Нуклеотидная последовательность функциональной системы для селективной
экспрессии последовательностей-мишеней в определенных типах клеток (Фиг. 12).

С помощью стандартных молекулярно-биологических процедур (ПЦР,
лигирование и трансформация) короткую последовательность гена кератина 13
(отмеченного выше **коротким KERATIN**) генома человека была связана как
антисмысловая с так называемой последовательностью *LOOP*. Последовательность
LOOP включает **линкерные** последовательности, которые способствуют гибкости
конструкции, **блокаторную** последовательность и нуклеотидные последовательности,
которые образуют стабильные вторичные структуры (*LOOP*). Хотя **блокаторная**
последовательность способна взаимодействовать с частями последовательности IRES

посредством спаривания оснований и тем самым изменять их вторичную структуру, вторичные структуры LOOP вызывают прерывание экзонуклеазной активности (см. Chapman et al., eLife, 2014, 3: e01892). Последующие части последовательности представляют собой **IRES** вируса энцефаломиокардита (Bochkov and Palmenberg, BioTechniques, 2006, 41: pp. 283-292) и кодирующую последовательность зеленого флуоресцентного белка (**eGFP**). Если **блокаторная** последовательность выключена, **IRES** позволяет трансляцию последующих последовательностей - в данном случае, **eGFP**, которая была выбрана здесь по причинам легкого обнаружения. **Блокаторная** последовательность выключается, только если для связывания присутствует комплементарная смысловая последовательность к антисмысловой последовательности (**короткий KERATIN**) в выбранном типе клеток.

2.) Нуклеотидная последовательность функциональной системы с альтернативной антисмысловой последовательностью для селективной экспрессии последовательностей-мишеней в определенных типах клеток (Фиг. 13).

С помощью стандартных молекулярно-биологических процедур (ПЦР, лигирование и трансформация) длинная последовательность гена кератина 13 (отмеченного выше **KERATIN**) генома человека была связана как антисмысловая с так называемой последовательностью LOOP. Последовательность LOOP включает **линкерные** последовательности, которые способствуют гибкости конструкции, **блокаторную** последовательность и нуклеотидные последовательности, которые образуют стабильные вторичные структуры (LOOP). В то время как **блокаторная** последовательность способна взаимодействовать с частями последовательности **IRES** посредством спаривания оснований и тем самым изменять их вторичную структуру, вторичные структуры LOOP вызывают прерывание экзонуклеазной активности (см. Chapman et al., eLife, 2014, 3: e01892). Последующие части последовательности представляют собой **IRES** вируса энцефаломиокардита (Bochkov and Palmenberg, BioTechniques, 2006, 41: pp. 283-292) и кодирующую последовательность зеленого флуоресцентного белка (**eGFP**). Если **блокаторная** последовательность выключена, **IRES** позволяет трансляцию последующих последовательностей - в данном случае, **eGFP**, которая была выбрана здесь по причинам легкого обнаружения. **Блокаторная** последовательность выключается только в том случае, если для связывания присутствует комплементарная смысловая последовательность к антисмысловой последовательности (**KERATIN**) в выбранном типе клеток.

3.) Нуклеотидная последовательность функциональной системы с альтернативной антисмысловой последовательностью и альтернативной блокаторной последовательностью для селективной экспрессии последовательностей-мишеней в определенных типах клеток (Фиг. 14).

С помощью стандартных молекулярно-биологических процедур (ПЦР, лигирование и трансформация) длинная последовательность гена кератина 13 (отмеченного выше **KERATIN**) генома человека была связана как антисмысловая с так называемой последовательностью *LOOP*. Последовательность *LOOP* включает **линкерные** последовательности, которые способствуют гибкости конструкции, **блокаторную** последовательность и нуклеотидные последовательности, которые образуют стабильные вторичные структуры (*LOOP*). В то время как **блокаторная** последовательность способна взаимодействовать с частями последовательности **IRES** посредством спаривания оснований и тем самым изменять их вторичную структуру, вторичные структуры *LOOP* вызывают прерывание экзонуклеазной активности (см. Chapman et al., eLife, 2014, 3: e01892). Последующие части последовательности представляют собой **IRES** вируса энцефаломиокардита (Bochkov and Palmenberg, BioTechniques, 2006, 41: pp. 283-292) и кодирующую последовательность зеленого флуоресцентного белка (eGFP). Если **блокаторная** последовательность выключена, **IRES** позволяет трансляцию последующих последовательностей - в данном случае, **eGFP**, которая была выбрана здесь по причинам легкого обнаружения. **Блокаторная** последовательность выключается только в том случае, если для связывания присутствует комплементарная смысловая последовательность к антисмысловой последовательности (**KERATIN**) в выбранном типе клеток.

4.) Зависящая от типа клетки, контролируемая блокатором IRES, селективная экспрессия GFP (Фиг. 15).

Эпидермальные клетки мыши (кератиноциты) с (WT) и без (нокаутный кератин 13 мутант = КО) мРНК кератин 13 обрабатывали плазмидами экспрессии GFP в качестве положительного контроля. Через 24 ч. клетки исследовали с использованием световой микроскопии (серый) и флуоресцентной микроскопии (зеленый). В результате трансмиссии в обеих клеточных линиях наблюдается равномерно высокая экспрессия GFP.

При использовании конструкций, сгенерированных на Фиг. 1 (клон 174) и 2 (клон 215), экспрессия GFP наиболее предпочтительно происходит в клетках, экспрессирующих мРНК кератина 13, и практически не происходит в клетках с удаленным геном кератина 13. Этот эффект оправдывается тем фактом, что в отсутствие мРНК кератина 13 блокаторная последовательность в сгенерированной конструкции мРНК взаимодействует с последовательностью IRES и, изменяя вторичную структуру IRES, подавляет ее функцию и, следовательно, экспрессию GFP. Напротив, в присутствии мРНК кератина 13 (WT) сгенерированная конструкция мРНК деградирует в результате смыслового-антисмыслового взаимодействия вплоть до части петель, в результате чего блокаторная последовательность исчезает. В результате функция IRES включается, и GFP экспрессируется.

5.) Количественная оценка функциональной системы для селективной экспрессии генов-мишеней (Фиг. 16).

Мутантные клетки дикого типа и кератина 13, как описано на Фиг. 4, были загружены различными функциональными системами. Спустя 24 часа уровень экспрессии выбранного целевого белка GFP измеряли во всех клетках с помощью проточной цитометрии. По меньшей мере 5000 клеток были оценены для каждого измерения. Все различия между WT и кератин 13 ^{-/-} мутациями были очень значительными.

Список последовательностей

<110> aReNA-Biotech GmbH

<120> Система и способ клеточно-специфической трансляции молекул РНК в эукариотах

<130>

<150> DE102017103383.1

<151> 2017-02-20

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 402

<212> ДНК

<213> Hepatitis C virus

<400> 1

```
gccagccccc gattgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg      60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac      120
ccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaccggt gagtacaccg gaattgccag      180
gacgaccggg tcctttcttg gatcaaccgc ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc      240
gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg      300
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcacg aatcctaaac      360
ctcaaagaaa aaccaaacgt aacaccaacc gccgcccaca gg                        402
```

<210> 2

<211> 459

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> IRES последовательность (положение 6 на фиг. 6) с 3 стабилизирующими элементами

<400> 2

```
gccagccccc gattgggggg ccagcccccg attggggggc cagccccga ttggggggcc      60
agccccgat tgggggagac actccaccat agatcactcc cctgtgagga actactgtct      120
tcacgcagaa agcgtctagc catggcggtta gtatgagtgt cgtgcagcct ccaggacccc      180
ccctcccggg agagccatag tgggtctgag aaccggtgag tacaccggaa ttgccaggac      240
gaccgggtcc tttcttggat caaccgcctc aatgcctgga gatttgggag tgcccccgag      300
agactgctag ccgagtagtg ttgggtcgag aaaggccttg tggtagtgcc tgatagggtg      360
cttgcgagtg ccccgaggag tctcgtagac cgtgcacat gagcacgaat cctaaacctc      420
aaagaaaaac caaacgtaac accaaccgcc gccacagg                        459
```

<210> 3
<211> 498
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Первичная IRES последовательность (положение 6 на фиг. 8) с 3 стабилизирующими элементами (положение 5 на фиг. 8, подчеркнуто) и линкеры (положение 4а на фиг. 8, в рамке)

<400> 3
ataaataaat aaaataaata aataaaataa ataaataaag ccagcccccg attgggggggc 60
cagcccccgga ttgggggggccc agcccccgat tgggggggcca gcccccgatt gggggcgaca 120
ctccaccata gatcactccc ctgtgaggaa ctactgtctt cacgcagaaa gcgtctagcc 180
atggcgtagg tatgagtgtc gtgcagcctc caggaccccc cctcccggga gagccatagt 240
gggtctgcgga accggtgagt acaccggaat tgccaggacg accgggtcct ttcttgatc 300
aaccgctca atgcctggag atttgggcgt gccccgcga gactgctagc cgagtagtgt 360
tgggtcgcga aaggccttgt ggtactgcct gataggggtgc ttgcgagtgc cccgggaggt 420
ctcgtagacc gtgcaccatg agcacgaatc ctaaacctca aagaaaaacc aaacgtaaca 480
ccaaccgccg cccacagg 498

<210> 4
<211> 507
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Первичная IRES последовательность (положение 6 на фиг. 10) с 3 стабилизирующими элементами (положение 5 на фиг. 10, подчеркнуто), линкерами (положение 4а на фиг.8, в рамке) и блокаторами

<400> 4
ccsaacacta taaataaata aaataaataa ataaaataaa taaataaagc cagcccccgga 60
ttgggggggccc agcccccgat tgggggggcca gcccccgatt gggggggccag cccccgattg 120
ggggcgacac tccaccatag atcactcccc tgtgaggaac tactgtcttc acgcagaaag 180
cgtctagcca tggcgtagt atgagtgtcg tgcagcctcc aggaccccc ctcccgggag 240
agccatagtg gtctgcgga ccggtgagta caccggaatt gccaggacga ccgggtcctt 300
tcttgatca acccgctcaa tgcctggaga tttgggcgtg cccccgcgag actgctagcc 360
gagtagtggt gggtcgcgaa aggccttgtg gtactgcctg ataggggtgct tgcgagtgcc 420
ccgggaggtc tcgtagaccg tgcaccatga gcacgaatcc taaacctcaa agaaaaacca 480
aacgtaacac caaccgccgc ccacagg 507

<210> 5
<211> 1619
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Нуклеотидная последовательность функциональной системы для селективной экспрессии последовательностей-мишеней в определенных типах клеток (Кератин 13)

<400> 5

acgcaccggt cggcctcctc ccagctggca agagccaccc ccgaaccac ctccatagct	60
ggcagaggag ctctgcaggc ggaggctcat gaattcgtta tgttatgacc ttgctcgtca	120
agaagacagt tatgttatta aaagtcaggc cggatcaagc catagtacgg aaaaaactat	180
gctacctgtg agccccgtcc aaggacgtgc ggccgctaaa agaagtcagg ccatcacaaa	240
tgccacagct tgagtaaact gtgcagcctg tagctccacc tgagaagggtg taaaaaagtt	300
atgttatgga tccccccctt aacgttactg gccgaagccg cttggaataa ggccgggtgtg	360
cgtttgtcta tatgttatTTt tccaccatat tgccgtcttt tggcaatgtg agggcccggg	420
aacctggccc tgtcttcttg acgagcattc ctaggggtct tccccctctc gccaaaggaa	480
tgcaaggctc gttgaatgtc gtgaaggaag cagttcctct ggaagcttct tgaagacaaa	540
caacgtctgt agcgaccctt tgcaggcagc ggaaccccc acctggcgac aggtgcctct	600
gcggccaaaa gccacgtgta taagatacac ctgcaaaggc ggcaacaacc cagtgccacg	660
ttgtgagttg gatagttgtg gaaagagtca aatggctctc ctcaagcgta ttcaacaagg	720
ggctgaagga tgcccagaag gtacccatt gtatgggatc tgatctgggg cctcggtgca	780
catgctttac atgtgtttag tcgagggtta aaaacgtcta ggccccccga accacgggga	840
cgtggttttc ctttgaaaaa cacgatgata atatggccac aaccatgtct agaatgggtga	900
gcaagggcga ggagctgttc accgggggtg tgcccatact ggtcgagctg gacggcgacg	960
taaacggcca caagttcagc gtgtccggcg agggcgaggg cgatgccacc tacggcaagc	1020
tgaccctgaa gttcatctgc accaccggca agctgcccgt gccctggccc accctcgtga	1080
ccaccctgac ctacggcgtg cagtgttca gccgtaccc cgaccacatg aagcagcacg	1140
acttcttcaa gtccgccatg cccgaaggct acgtccagga gcgcaccatc ttcttcaagg	1200
acgacggcaa ctacaagacc cgcgccgagg tgaagttcga gggcgacacc ctggtgaacc	1260
gcaccgagct gaagggcac gacttcaagg aggacggcaa catcctgggg cacaagctgg	1320
agtacaacta caacagccac aacgtctata tcatggccga caagcagaag aacggcatca	1380
agggtgaactt caagatccgc cacaacatcg aggacggcag cgtgcagctc gccgaccact	1440
accagcagaa ccccccatc ggcgacggcc ccgtgctgct gcccgacaac cactacctga	1500
gcaccagtc cgccctgagc aaagaccca acgagaagcg cgatcacatg gtcctgctgg	1560
agttcgtgac cgccgccggg atcactctcg gcatggacga gctgtacaag taagtcgac	1619

<210> 6

<211> 2164

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Нуклеотидная последовательность функциональной системы с альтернативной антисмысловой последовательностью для селективной экспрессии последовательностей-мишеней в определенных типах клеток

<400> 6

acgcaccggt tgatgtcggc ctccacgctc tggcgcaggg ccagctcatt ctcatacttg	60
agcctgaagt cgtccgcagc cagcctggca ttgtcaatct ccaggatgac ccggttggtt	120
tcaatggtgg cggtcaggat cttgtcccgg agctcttcaa tgggtcttgta gtaggggctg	180
tagtcccgtc cagggctagc tgggctctgc ttcagggtgcc agtcacggat cttcacctcc	240
aggtcagcgt tggcctcctc cagggcgcgc accttctcca ggtaggaagc caggcggtcg	300
ttgaggttct gcatggtgat cttctcattg ccagtgagga ggccgccatc acaagcacca	360
aagtcaacaa agccaccagc aaaaccccc ccaaagccac ctccaaggcc acctccatag	420
ccacctccaa ggccacctcc atagccacct ccaaagccac taccagcccc tccaccaaaa	480
ccacagctca cgccgcctcc atagcccca gctgatcccc cagacacaaa ccgagttgaa	540
caggtagaga caccacggcc tcctcccagc tggcaagagc ccccccgaa accacctcca	600
tagctggcag aggagctctg caggcgaggg ctcatgaatt cgttatgtta tgaccttgct	660
cgtcaagaag acagttatgt tattaagaat caggtcggat caagccatag tacggaaaaa	720
actatgctac ctgtgagccc cgtccaagga cgtgcgggcc ctaaaagaag tcaggccatc	780
acaaatgcca cagcttgagt aaactgtgca gcctgtagct ccacctgaga aggtgtaaaa	840
aagttatgtt atggatcccc cccctaacgt tactggccga agccgcttgg aataaggccg	900
gtgtgcgttt gtctatatgt tattttccac catattgccg tcttttggca atgtgagggc	960
ccggaaacct ggccctgtct tcttgacgag cattcctagg ggtctttccc ctctcgccaa	1020
aggaatgcaa ggtctgttga atgtcgtgaa ggaagcagtt cctctggaag cttcttgaag	1080
acaaacaacg tctgtagcga ccctttgcag gcagcggaac ccccccctg gcgacagggtg	1140
cctctgcggc caaaagccac gtgtataaga tacacctgca aaggcggcac aaccccagtg	1200
ccacgttggt agttggatag ttgtggaaag agtcaaatgg ctctcctcaa gcgtattcaa	1260
caaggggctg aaggatgccc agaaggtacc ccattgtatg ggatctgatc tggggcctcg	1320
gtgcacatgc tttacatgtg tttagtcgag gttaaaaaac gtctaggccc cccgaaccac	1380
ggggacgtgg ttttcctttg aaaaacacga tgataatatg gccacaacca tgtctagaat	1440
ggtgagcaag ggcgaggagc tgttcaccgg ggtggtgccc atcctgggtcg agctggacgg	1500
cgacgtaaac ggccacaagt tcagcgtgtc cggcgagggc gagggcgatg ccacctacgg	1560
caagctgacc ctgaagttca tctgcaccac cggcaagctg cccgtgccct ggcccacct	1620
cgtgaccacc ctgacctacg gcgtgcagtg cttcagccgc taccgagacc acatgaagca	1680

gcacgacttc ttcaagtccg ccatgccccga aggctacgtc caggagcgcga ccatcttctt	1740
caaggacgac ggcaactaca agacccgcgc cgaggtgaag ttcgagggcg acaccctggt	1800
gaaccgcatc gagctgaagg gcatcgactt caaggaggac ggcaacatcc tggggcacia	1860
gctggagtag aactacaaca gccacaacgt ctatatcatg gccgacaagc agaagaacgg	1920
catcaagggtg aacttcaaga tccgccacaa catcgaggac ggcagcgtgc agctcgccga	1980
ccactaccag cagaacaccc ccatcggcga cggccccgtg ctgctgcccc acaaccacta	2040
cctgagcacc cagtccgccc tgagcaaaga cccaacgag aagcgcgatc acatggctct	2100
gctggagttc gtgaccgccg ccgggatcac tctcgcatg gacgagctgt acaagtaagt	2160
cgac	2164

<210> 7

<211> 2175

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Нуклеотидная последовательность функциональной системы с альтернативной антисмысловой последовательностью и альтернативной блокаторной последовательностью для селективной экспрессии последовательностей-мишеней в определенных типах клеток

<400> 7

acgcaccggt tgatgtcggc ctccacgctc tggcgcaggc ccagctcatt ctcatacttg	60
agcctgaagt cgtccgcagc cagcctggca ttgtcaatct ccaggatgac ccggttgttt	120
tcaatgggtgg cggtcaggat cttgtcccgc agctcttcaa tggctcttgta gtaggggctg	180
tagtcccgtc cagggctagc tgggctctgc ttcagggtgc agtcacggat cttcacctcc	240
aggtcagcgt tggcctcctc cagggcgcgc accttctcca ggtaggaagc cagggcgtcg	300
ttgaggttct gcatggtgat cttctcattg ccagtgagga ggccgccatc acaagcacca	360
aagtcaacaa agccaccagc aaaacccccca ccaaagccac ctccaaggcc acctccatag	420
ccacctccaa ggccacctcc atagccacct ccaaagccac taccagcccc tccaccaaaa	480
ccacagctca cgccgcctcc atagccccca gctgatcccc cagacacaaa ccgagttgaa	540
caggtagaga caccacggcc tcctcccagc tggcaagagc ccccccgaa accacctcca	600
tagctggcag aggagctctg caggcggagg ctcatgaatt cgttatgtta tgaactgctt	660
ccttcacgac attcaacaga ccttgttatg ttattaaaag tcaggctcga tcaagccata	720
gtacggaaaa aactatgcta cctgtgagcc ccgtccaagg acgtgcggcc gctaaaagaa	780
gtcaggccat cacaaatgcc acagcttgag taaactgtgc agcctgtagc tccacctgag	840
aagggtgtaa aaagttatgt tatggatccc cccctaacg ttactggccg aagccgcttg	900
gaataaggcc ggtgtgcgtt tgtctatatg ttattttcca ccatattgcc gtcttttggc	960
aatgtgaggg cccggaaacc tggccctgtc ttcttgacga gcattcctag gggctcttcc	1020

cctctcgcca aaggaatgca aggtctgttg aatgtcgtga aggaagcagt tcctctggaa	1080
gcttcttgaa gacaaacaac gtctgtagcg accctttgca ggcagcggaa cccccacct	1140
ggcgacaggt gcctctgcgg ccaaaagcca cgtgtataag atacacctgc aaaggcggca	1200
caaccccgagt gccacgttgt gagttggata gttgtggaaa gagtcaaagt gctctcctca	1260
agcgtattca acaaggggct gaaggatgcc cagaaggtag ccattgtat gggatctgat	1320
ctggggcctc ggtgcacatg ctttacatgt gtttagtcga ggttaaaaaa cgtctagggc	1380
ccccgaacca cggggacgtg gttttccttt gaaaaacacg atgataatat ggccacaacc	1440
atgtctagaa tggtgagcaa gggcgaggag ctgttcaccg ggggtggtgcc catcctggtc	1500
gagctggacg gcgacgtaaa cggccacaag ttcagcgtgt cgggcgaggg cgagggcgat	1560
gccacctacg gcaagctgac cctgaagttc atctgcacca cgggcaagct gcccgtgccc	1620
tggcccaccc tcgtgaccac cctgacctac ggcgtgcagt gcttcagccg ctaccccgac	1680
cacatgaagc agcacgactt cttcaagtcc gccatgcccg aaggctacgt ccaggagcgc	1740
accatcttct tcaaggacga cggcaactac aagaccgcg ccgaggtgaa gttcgagggc	1800
gacaccctgg tgaaccgcat cgagctgaag ggcacgact tcaaggagga cggcaacatc	1860
ctgggggcaca agctggagta caactacaac agccacaacg tctatatcat ggccgacaag	1920
cagaagaacg gcatcaaggt gaacttcaag atccgccaca acatcgagga cggcagcgtg	1980
cagctcgccg accactacca gcagaacacc cccatcggcg acggccccgt gctgctgccc	2040
gacaaccact acctgagcac ccagtccgcc ctgagcaaag accccaacga gaagcgcgat	2100
cacatggtcc tgctggagtt cgtgaccgcc gccgggatca ctctcggcac ggacgagctg	2160
tacaagtaag tcgac	2175

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ нацеленной трансляции представляющего интерес полипептида в эукариотической клетке-мишени, характеризующийся введением в клетки конструкции РНК, причем конструкция РНК имеет по меньшей мере следующие элементы в направлении от 5' до 3':

(a) антикодогенный элемент (a), который комплементарен по меньшей мере части мРНК гена, экспрессированного клеткой-мишенью;

(b) блокирующий элемент (b), который взаимодействует по меньшей мере с частью трансляционного инициаторного элемента (d) в позиции 3';

(c) стабилизирующий элемент (c);

(d) трансляционный инициаторный элемент (d);

(e) последовательность (e), кодирующая представляющий интерес полипептид, причем трансляция представляющего интерес полипептида в нецелевой эукариотической клетке предотвращается путем спаривания оснований блокирующего элемента (b) с трансляционным инициаторным элементом (d), а трансляция кодированного полипептида происходит в эукариотической клетке-мишени вследствие процессирования конструкции РНК, индуцированного взаимодействием антикодогенного элемента с мРНК, экспрессируемой клеткой-мишенью.

2. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что взаимодействие антикодогенного элемента (a) с мРНК, экспрессированной клеткой-мишенью, приводит к деградации или инактивации блокирующего элемента (b) так, что может происходить трансляция представляющего интерес полипептида.

3. Способ по п. 2, характеризующийся тем, что деградацию мРНК на стабилизирующем элементе (c) останавливают.

4. Способ по одному или нескольким пп. 1-3, характеризующийся тем, что антикодогенный элемент (a) имеет одну или несколько из следующих особенностей:

(i) прикрепление к последовательности РНК, специфичной для клетки-мишени

(ii) образование двухцепочечных гибридов РНК свободно регулируемой длины

(iii) индукция клеточной деградации введенной конструкции РНК в области двухцепочечного гибрида РНК.

5. Способ по одному или нескольким пп. 1-4, характеризующийся тем, что блокирующий элемент (b) имеет одну или несколько из следующих особенностей:

- (i) функция трансляционного инициаторного элемента (d) подавлена.
- (ii) блокирующий элемент (b) может быть деградирован или инактивирован в подходящих условиях.
- (iii) подавляющая функция трансляционного инициаторного элемента инициатора (d) является обратимой после инактивации или деградации блокирующего элемента.
- (iv) блокирующий элемент (b) выполняет свою функцию путем спаривания оснований в последовательности трансляционного инициаторного элемента (d) или около нее, тем самым изменяя его вторичную структуру.
- (v) блокирующий элемент (b) выполняет свою функцию, заставляя другие молекулы прямо или косвенно ингибировать трансляционный инициаторный элемент (d).

6. Способ по одному или нескольким пп. 1-5, характеризующийся тем, что стабилизирующий элемент (c) имеет одну или несколько из следующих особенностей:

- (i) нуклеотидная последовательность, которая предотвращает деградацию РНК экзон/или эндонуклеазами в направлении 3'.
- (ii) нуклеотидная последовательность, характеризующаяся тем, что она образует стабилизирующие вторичные структуры, такие как стебель-петли.
- (iii) нуклеотидная последовательность, характеризующаяся тем, что стабилизирующие элементы, такие как пептиды или белки, связываются с РНК.
- (iv) нуклеотидная последовательность, характеризующаяся тем, что молекулы связываются с РНК и выполняют химическую, стабилизирующую модификацию конца 5' РНК.

7. Способ по одному или нескольким пп. 1-6, характеризующийся тем, что трансляционный инициаторный элемент (d) имеет одну или несколько из следующих особенностей:

- (i) избирательное ингибирование функции инициации трансляции в зависимости от типа клеток
- (ii) функциональность исключительно при деградации или инактивации компонентов регуляторной кассеты (элементов a и b)

- (iii) функциональность исключительно в клетках-мишенях, в то время как трансляционный инициаторный элемент неактивен во всех других типах клеток.
- (iv) индукция трансляции независимо от структуры кэп в области 5' исходной конструкции РНК (напр., последовательностей IRES).
- (v) индукция трансляции посредством прямого или косвенного связывания рибосомальных субъединиц или полных рибосом.
- (vi) индукция трансляции путем образования специфических вторичных структур после выключения ингибирования блокирующим элементом
- (vii) индукция трансляции путем присоединения специфических молекул или химической модификации после выключения ингибирования блокирующим элементом.

8. Способ по одному или нескольким пп. 1-7, характеризующийся тем, что конструкция РНК имеет одну или несколько из следующих необязательных особенностей:

- (i) последовательность кэп 5' для того, чтобы увеличить стабильность всей конструкции мРНК
- (ii) нетранслируемая область 5' для того, чтобы иметь возможность регулировать стабильность всей конструкции мРНК и подавлять индуцированную кэп 5' трансляцию (напр., включение квадруплексных последовательностей)
- (iii) нетранслируемая область 3' для того, чтобы регулировать стабильность всей конструкции мРНК и частичного фрагмента процессированной мРНК в клетках-мишенях.
- (iv) поли(А) область для того, чтобы регулировать стабильность всей конструкции мРНК и частичного фрагмента процессированной мРНК в клетках-мишенях.
- (v) все элементы всей конструкции мРНК по пп. 1-8 могут содержать линкерные последовательности любой длины внутри самого элемента или между отдельными элементами. Линкерные последовательности могут быть безфункциональными и использоваться для чистого пространственного разделения отдельных элементов или для интеграции дополнительных функций в систему.

9. Конструкция РНК для направленной трансляции представляющего интерес полипептида в эукариотической клетке-мишени, характеризующаяся тем, что конструкция РНК имеет по меньшей мере следующие элементы в направлении от 5' до 3':

(а) антикодогенный элемент (а), который является комплементарным по меньшей мере части РНК части ДНК, экспрессируемой клеткой-мишенью, или индуцирует специфическую для типа клетки деградацию;

(b) блокирующий элемент (b), который комплементарно или иным образом ингибирует по меньшей мере часть трансляционного инициаторного элемента (d) в положении 3';

(с) стабилизирующий элемент (с), который ограничивает специфическую для типа клеток деградацию РНК до ее части;

(d) трансляционный инициаторный элемент (d), который функционирует независимо от кэп 5' и активен только в клетках-мишенях;

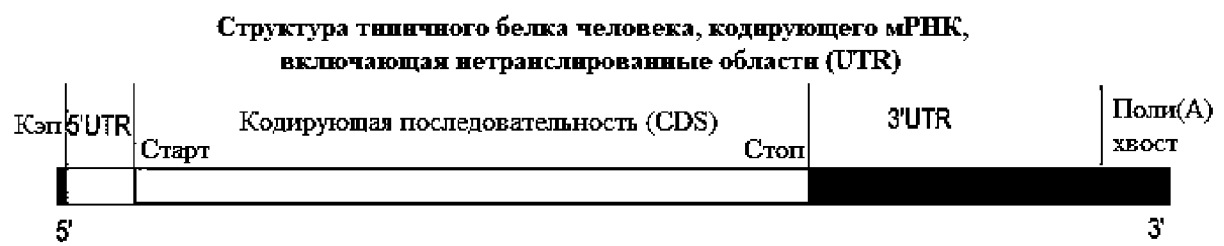
(е) последовательность (е), кодирующая представляющий интерес полипептид;

причем трансляция представляющего интерес полипептида в нецелевой эукариотической клетке предотвращается путем спаривания оснований блокирующего элемента (b) с трансляционным инициаторным элементом (d) и трансляция кодированного полипептида в эукариотической клетке-мишени происходит вследствие взаимодействия антикодогенного элемента (а) с РНК, экспрессируемой клеткой-мишенью, специфического процессирования конструкции РНК, в результате которого активируется трансляционный инициаторный элемент.

10. Конструкция РНК по п. 9, характеризующаяся одним или несколькими из следующих признаков:

- (i) антикодогенный элемент (а) имеет один или несколько признаков по п. 4;
- (ii) блокирующий элемент (b) имеет один или несколько признаков по п. 5;
- (iii) стабилизирующий элемент (с) имеет один или несколько признаков по п. 6;
- (iv) трансляционный инициаторный элемент (d) имеет один или несколько признаков по п. 7; и/или
- (v) конструкция мРНК имеет один или несколько признаков по п. 8.

Фигура 1



Фигура 2

1 = КЭП/модификации

2 = 5' UTR

3 = антисмысловой
фрагмент

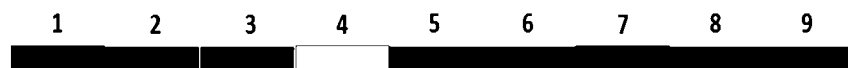
4 = linker_IRES
blocker_linker

5 = стебель петли

6 = IRES (вирусная)

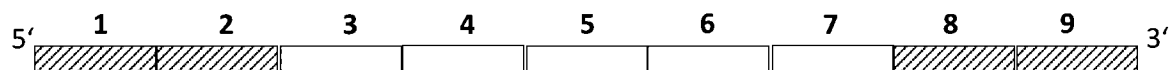
7 = представляющая
интерес
последовательность

8 и 9 = 3' UTR и
поли(А)



Фигура 3

А)



1 = КЭП/модификации

2 = 5'-UTR

3 = антикодогенный фрагмент

4 = linker_IRES blocker_linker

5 = стабилизирующий элемент

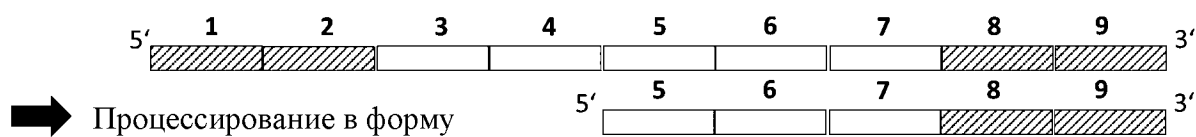
6 = IRES

7 = представляющая интерес последовательность

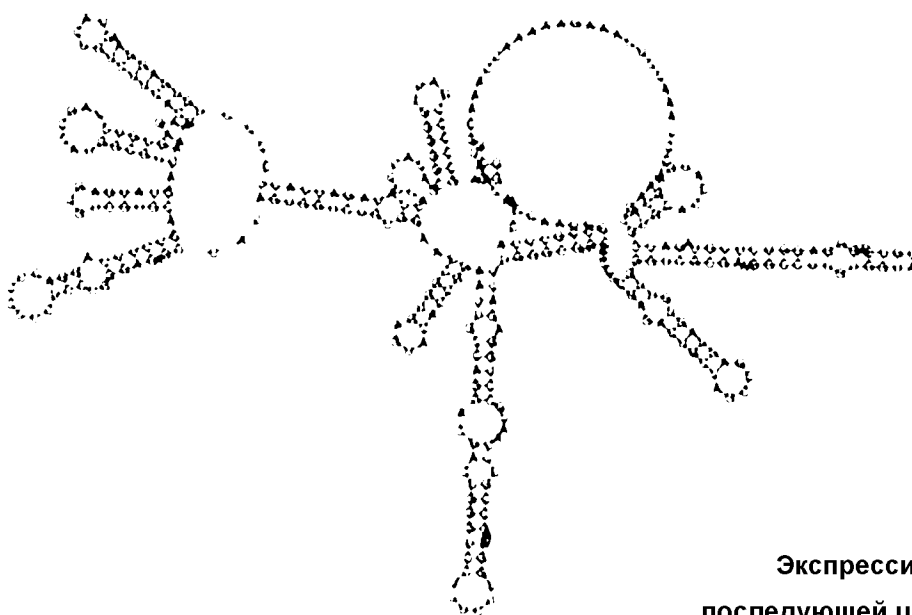
8 и 9 = 3' UTR и поли(A)

Фигура 4

A)



В) Вторичная последовательность IRES (6) (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAprobing.cgi>)



Экспрессия
последующей целевой
последовательности (7)



функционал
последовательности IRES

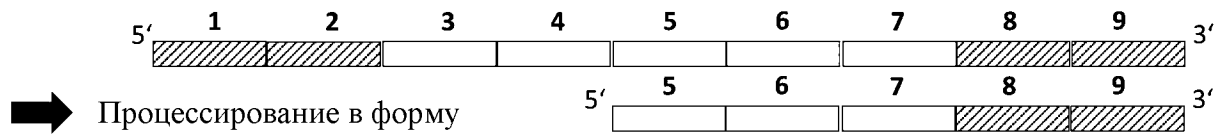
Фигура 5

**Первичная последовательность IRES (HCV IRES 1b); позиция 6 на Фиг. 4: SEQ ID
NO: 1**

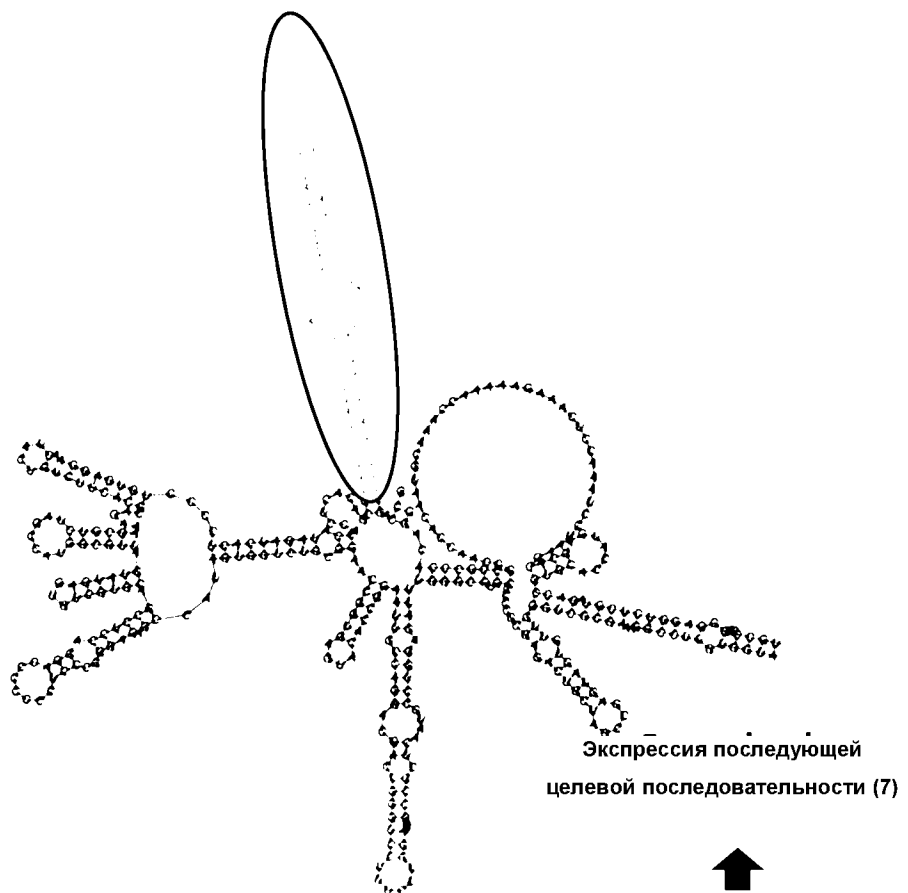
GCCAGCCCCCGATTGGGGGCGACACTCCACCATAGATCACTCCCCTGTGAGGAAC
TACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTGCAG
CCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTA
CACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCT
GGAGATTTGGGCGTGCCCCCGCGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTTGGGTCGCGAA
AGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTA
GACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAACGTAACA
CCAACCGCCGCCACAGG

Фигура 6

A)



В) Вторичная последовательность IRES (6) с 3 стабилизирующими элементами (5)



Стабилизирующие элементы не имеют влияния на остаток вторичной структуры IRES

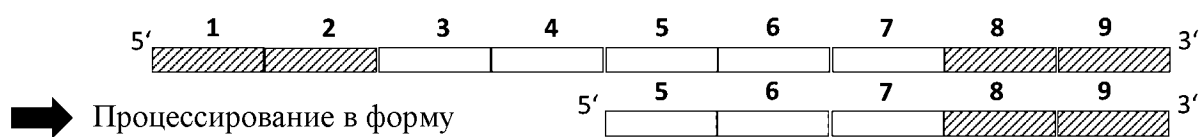
Фигура 7

Первичная последовательность IRES (позиция 6 на Фиг. 6) с 3 стабилизирующими элементами (позиция 5 на Фиг. 6): SEQ ID NO: 2

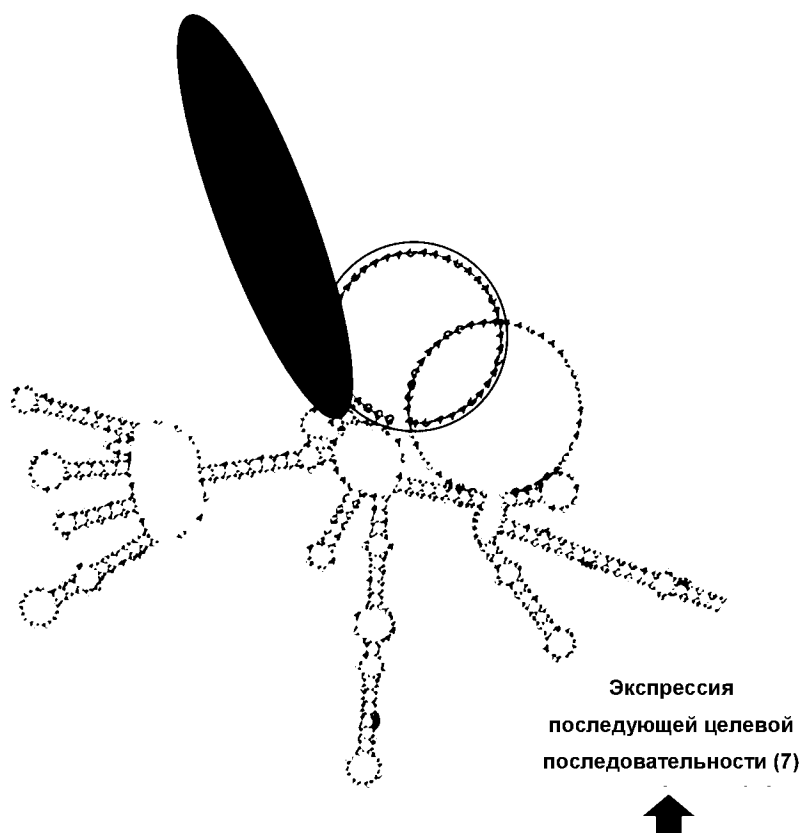
GCCAGCCCCCGATTGGGGGGCCAGCCCCCGATTGGGGGGCCAGCCCCCGATTGG
GGGGCCAGCCCCCGATTGGGGGCGACACTCCACCATAGATCACTCCCCTGTGAGG
AACTACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTG
CAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGA
GTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGGATCAACCCGCTCAATG
CCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCCGCGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTTGGGTCGC
GAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTC
GTAGACCGTGCAACCATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAACGTA
ACACCAACCGCCGCCCACAGG

Фигура 8

А)



В) Вторичная последовательность IRES (6) с 3 стабилизирующими элементами (5) и линкерами (4а)



Стабилизирующие элементы не имеют влияния на остаток вторичной структуры IRES

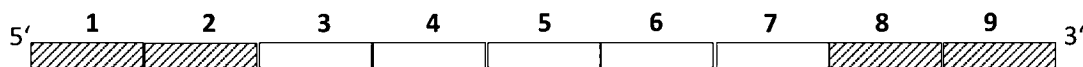
Фигура 9

Первичная последовательность IRES (позиция 6 на Фиг. 8) с 3 стабилизирующими элементами (позиция 5 на Фиг. 8, подчеркнуто) и линкерами (позиция 4а на Фиг. 8, обведено): SEQ ID NO: 3

АТАААТАААТААААТАААТАААТАААТАААТАААТАААGCCAGCCCCCGATTG
GGGGGCCAGCCCCCGATTGGGGGGGCCAGCCCCCGATTGGGGGGGCCAGCCCCGA
TTGGGGGCGACACTCCACCATAGATCACTCCCCTGTGAGGAACТАCTGTCTTCAC
GCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTGCAGCCTCCAGGACCC
CCCCTCCC GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGC
CAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGC
GTGCCCCCGCGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTTGGGTCGCGAAAGGCCTTGTGGT
ACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCA
TGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAACGTAACACCAACCGCCGCC
CACAGG

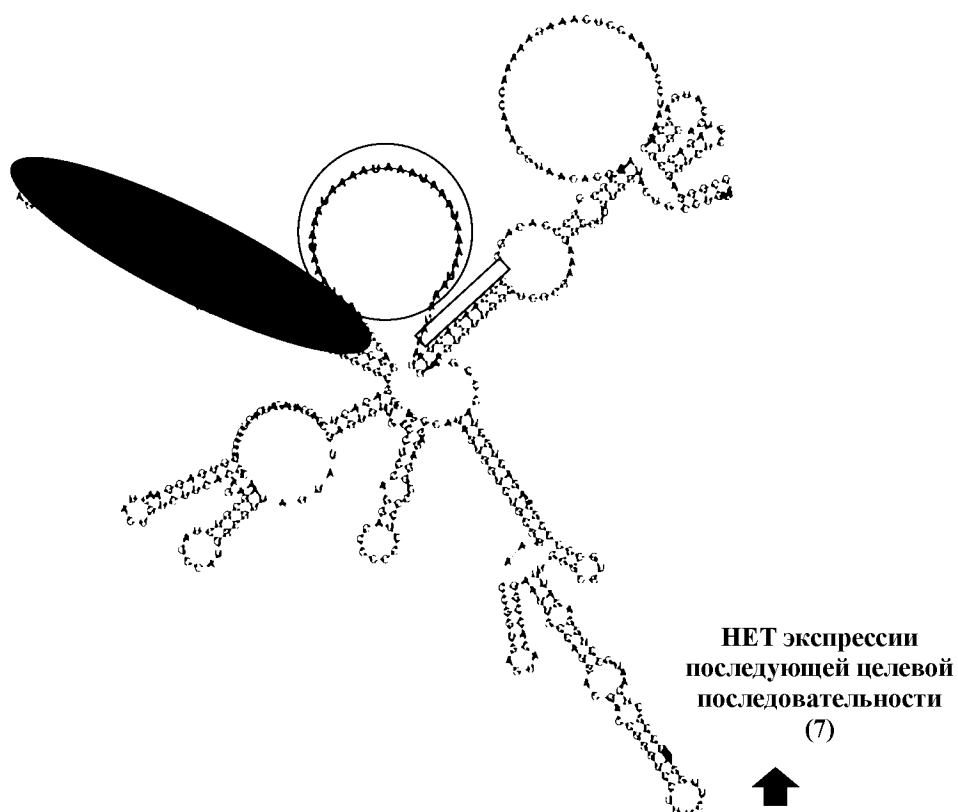
Фигура 10

A)



➡ конструкция РНК поддерживается в клетках полноразмерной

В) Вторичная последовательность IRES (6) с 3 стабилизирующими элементами (5), линкерами (4a) и блокаторами (4b)



Даже небольшие блокаторные последовательности имеют значительное влияние на остаток вторичной структуры IRES.

Фигура 11

Первичная последовательность IRES (позиция 6 на Фиг. 10) с 3 стабилизирующими элементами (позиция 5 на Фиг. 10, подчеркнуто), линкерами (позиция 4а на Фиг. 8, обведено) и блокаторами (4b, жирное): SEQ ID NO: 4

CCCAACACTATAAATAAATAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAGCCAG
CCCCCGATTGGGGGGCCAGCCCCCGATTGGGGGGCCAGCCCCCGATTGGGGGGC
CAGCCCCCGATTGGGGGGCGACACTCCACCATAGATCACTCCCCTGTGAGGAACTA
CTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTTCGTGCAGCC
TCCAGGACCCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACA
CCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCTGG
AGATTTGGGCGTGCCCCCGCGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTTGGGTGCGGAAAG
GCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGA
CCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAACGTAACACC
AACCGCCGCCACAGG

Фигура 12

Система селективной экспрессии мРНК с короткой антисмысловой последовательностью

Короткий Keratin 13	80 по
Петли	225 по
IRES	577 по
eGFP	716 по
sKLIIG	2063 по

Участки распознавания:

ACCGGT	AgeI
GAATTC	EcoRI
GCGGCCGC	NotI
GGATCC	BamHI
TCTAGA	XbaI
GTCGAC	Sall

КОРОТКИЙ
KERATIN

ПЕТЛИ

IRES

eGFP

ACCGGTCGGCCTCCTCCCAGCTGGCAAGAGCCACCCCCGAAACCACCTCCATAGCTGGCAGAGGAGCTC
TGCAGGCGGAGGCTCATGAATTCGTTATGTTATGACCTTGCTCGTCAAGAAGACAGGTTATGTTATTTAAAG
TCAGGTCGGATCAAGCCATAGTACGGAAAAAACTATGCTACCTGTGAGCCCCGTCCAAGGACGTGCGGCCGCTAAAA
GAAGTCAGGCCATCACAAATGCCACAGCTTGAGTAACTGTGCAGCCTGTAGCTCCACCTGAGAAGGTGTAAAAAAGT
TATGTTATGGATCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCT
ATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTT
GACGAGCATTTCCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGA
AGCAGTTCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCCTTTCAGGCAGCGGAACCC
CCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACA
ACCCACGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAA
CAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATG
CTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCTTT
GAAAAACACGATGATAATATGGCCACAACCATGTCTAGAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCC
GGGGTGGTGCCCATCTGGTCTGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTACAGCGTGTCCGGCGA
GGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCG
TGCCCTGGCCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACA
TGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCA
AGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTTCAGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATC
GAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAA
CAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCA
CAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGGCAGCGGCC
CCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAAGACCCCAACGAGAAGC
GCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACA
AGTAAGTCGAC

Фигура 13

Система селективной экспрессии мРНК с длинной антисмысловой последовательностью

Keratin 13	625 по
Петли	225 по
IRES	577 по
eGFP	716 по
KLIG	2143 по

Участки распознавания:

ACCGGT	AgeI
GAATTC	EcoRI
GCGGCCGC	NotI
GGATCC	BamHI
TCTAGA	XbaI
GTCGAC	Sall

KERATIN

ПЕТЛИ

IRES

eGFP

ACCGGTTGATGTCGGCCTCCACGCTCTGGCGCAGGGCCAGCTCATTCTCATACTTGAGCCTGAAGTCGTC
 CGCAGCCAGCCTGGCATTGTCAATCTCCAGGATGACCCGGTTGTTTTCAATGGTGGCGGTCAAGATCTT
 GTCCCGGAGCTCTTCAATGGTCTTGTAGTAGGGGCTGTAGTCCCGCTCAGGGCTAGCTGGGCTCTGCTT
 CAGGTGCCAGTCACGGATCTTCACCTCCAGGTCAGCGTTGGCCTCCTCCAGGGCGCGCACCTTCTCCAG
 GTAGGAAGCCAGGCGGTGCTTGAAGTTCTGCATGGTGATCTTCTCATTGCCAGTGAGGAGGCCGCCATC
 ACAAGCACCAAAGTCAACAAAGCCACCAGCAAAACCCCCACCAAAGCCACCTCCAAGGCCACCTCCATA
 GCCACCTCCAAGGCCACCTCCATAGCCACCTCCAAAGCCACTACCAGCCCCTCCACCAAACCCACAGCT
 CACGCCGCTCCATAGCCCCAGCTGATCCCCAGACACAAACCGAGTTGAACAGGTAGAGACACCACG
 GCCTCCTCCAGCTGGCAAGAGCCACCCCCGAAACCACCTCCATAGCTGGCAGAGGAGCTCTGCAGGCG
 GAGGCTCATGAATTCGTTATGTTATGACCTTGCTCGTCAAGAAGACA GTTATGTTATTAAAAGTCAGGTCGG
 ATCAAGCCATAGTACGGAAAAAACTATGCTACCTGTGAGCCCCGTCCAAGGACGTGCGGCCCGCTAAAAGAAGTCAGG
 CCATCACAAATGCCACAGCTTGAGTAACTGTGCAGCCTGTAGCTCCACCTGAGAAGGTGTAAAAAA GTTATGTTAT
 GGATCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTA
 TTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCA
 TTCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTGCTGAAGGAAGCAGTTC
 CTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCCACCTG
 GCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGT
 GCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGC
 TGAAGGATGCCAGAAGGTACCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACAT
 GTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAAC
 ACGATGATAATATGGCCACAACCATGTCTAGAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGG
 TGCCCATCTCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTACAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAG
 GGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGG
 CCCACCTCGTGACCACCCTGACCTA

Фигура 14

Система селективной экспрессии мРНК с альтернативной блокаторной последовательностью и длинной антисмысловой последовательностью

Keratin 13	625 по
Петли	225 по
IRES	577 по
eGFP	716 по
KLIG	2143 по

Участки распознавания:

ACCGGT	AgeI
GAATTC	EcoRI
GCGGCCGC	NotI
GGATCC	BamHI
TCTAGA	XbaI
GTCGAC	Sall

KERATIN

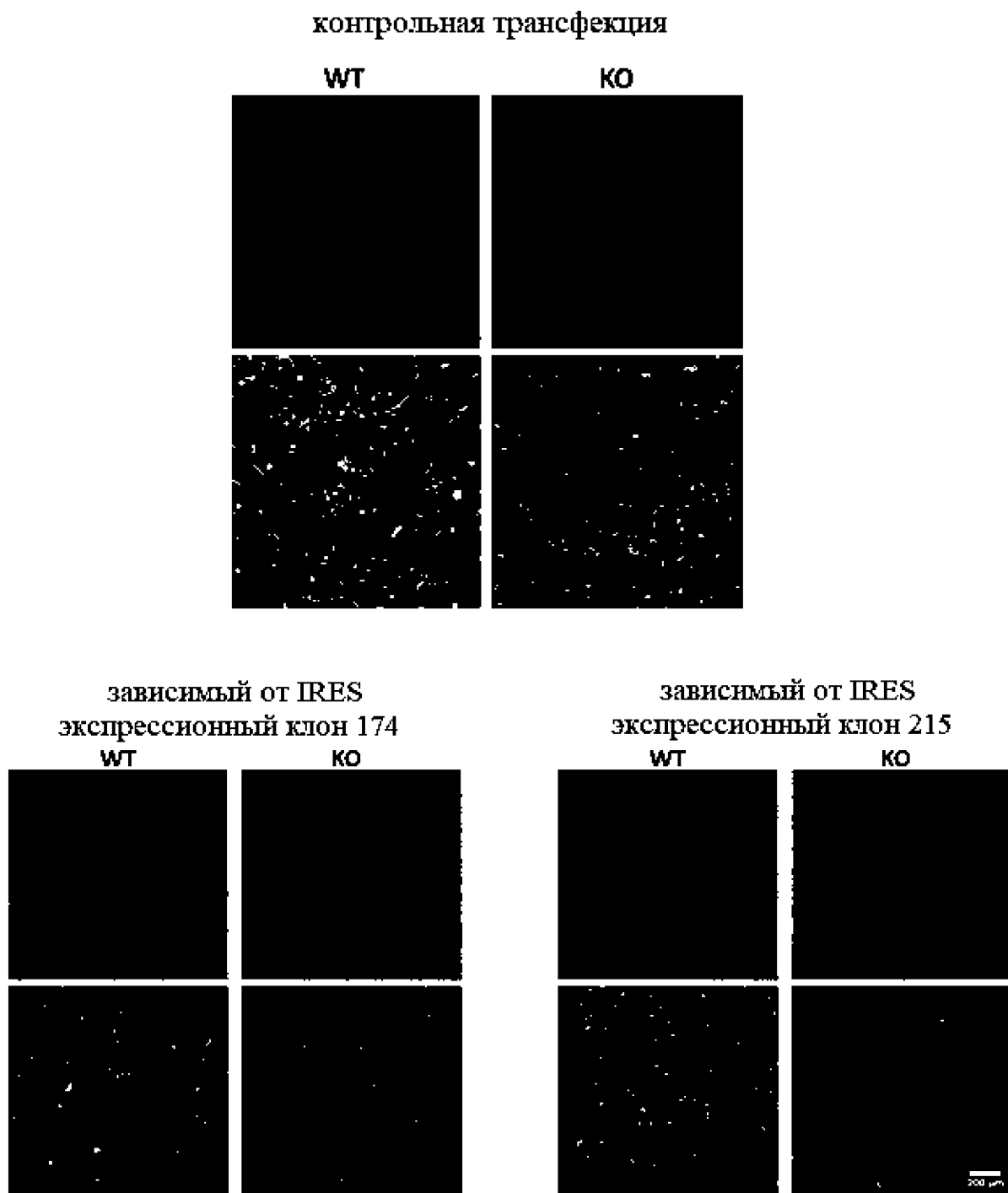
ПЕТЛЯ

IRES

eGFP

ACCGGTTGATGTCGGCCTCCACGCTCTGGCGCAGGGCCAGCTCATTCTCATACTTGAGCCTGAAGTCGTCGCAGCCA
GCCTGGCATTGTCAATCTCCAGGATGACCCGGTGTGTTTCAATGGTGCGGTCAGGATCTTGTCCTGGAGCTCTTCAA
TGGTCTTGTAGTAGGGGCTGTAGTCCCGCTCAGGGCTAGCTGGGCTCTGCTTCAGGTGCCAGTCACGGATCTTCACCT
CCAGGTCAGCGTTGGCCTCCTCCAGGGCGCGCACCTTCTCCAGGTAGGAAGCCAGGCGGTCTGTTGAGGTTCTGCATG
GTGATCTTCTCATTTGCCAGTGAGGAGGCCGCCATCACAAGCACAAAGTCAACAAAGCCACCAGCAAAACCCCCACCA
AAGCCACCTCCAAGGCCACCTCCATAGCCACCTCCAAGGCCACCTCCATAGCCACCTCCAAAGCCACTACCAGCCCCCT
CCACCAAAACACAGCTCACGCCCGCTCCATAGCCCCAGCTGATCCCCAGACACAAACCGAGTTGAACAGGTAGAG
ACACCACGGCCTCCTCCCAGCTGGCAAGAGCCACCCCGAAACCACTCCATAGCTGGCAGAGGAGCTCTGCAGGCG
GAGGCTCATGAATTCGTTATGTTATGAAGTCTTCCTTCACGACATTCAACAGACCTTGTTATGTTATATAAAGTCAGGTCGG
ATCAAGCCATAGTACGGAATAAACTATGCTACCTGTGAGCCCCGTCCAAGGACGTGCGGCCGCTAAAAGAAGTCAGGCCATCACAAT
GCCACAGCTTGAGTAACTGTGCAGCCTGTAGCTCCACCTGAGAAGGTGTAAAAAGTTATGTTATGGATCCCCCCCCCTAACGTT
ACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTCCACCATATTGCCGCTCTTTGGCA
ATGTGAGGGCCCGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGC
AAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGCTCTGTAGCGACCCCTT
GCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAG
GCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAGAGTCAAATGGCTCTCTCTCAAGCGTATTCAAC
AAGGGGCTGAAGGATGCCAGAAGGTACCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGT
GTTTAGTCGAGGTAAAAAACGTTAGGCCCCCGAACACGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAAT
ATGGCCACAACCATGTCTAGAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCTGGTTCGAGCT
GGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTACGCTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACC
CTGAAGTTTCATCTGCACACCGGAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGCAG
TGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAG
CGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTTCAGAGGGCGACACCCCTGGTGAA
CCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACA
GCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAG
GACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAA
CCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTTCG
TGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAGTCGAC

Фигура 15



Фигура 16

Эксперимент 1

	эффективность WT (дикий тип) [%]	эффективность Keratin 13 -/- [%]
Система 1 селективной экспрессии	30	10
Относительное	1	33%

Эксперимент 2

	эффективность WT (дикий тип) [%]	эффективность Keratin 13 -/- [%]
Система 2 селективной экспрессии, клон 01	32	15
Система 2 селективной экспрессии, клон 02	31	15
Среднее значение	31,5	15
Относительное		48%
Система 3 селективной экспрессии, клон 01	46	16
Система 3 селективной экспрессии, клон 02	44	16
Среднее значение	45	16
Относительное		35%

Среднее значение по всем экспериментам	39%
Значение стабильности по всем экспериментам	8%