

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 201991928 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2020.01.09

(51) Int. Cl. A61K 48/00 (2006.01)  
C12N 15/113 (2010.01)  
C12N 15/115 (2010.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.02.21

(54) РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПОСРЕДСТВОМ АПТАМЕР-ОПОСРЕДОВАННОЙ ДОСТУПНОСТИ СИГНАЛОВ ПОЛИАДЕНИЛИРОВАНИЯ

(31) 62/461,689

(32) 2017.02.21

(33) US

(86) PCT/US2018/019056

(87) WO 2018/156658 2018.08.30

(71) Заявитель:

МИРАДЖИТИЭКС, ЮКЕЙ П  
ЛИМИТЕД (GB)

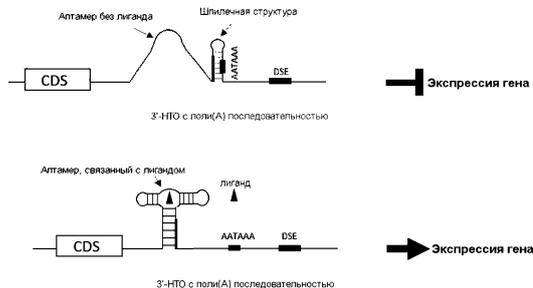
(72) Изобретатель:

Го Сюэцуй, Хань Джонхес, Чжун  
Чжаоцзин (US)

(74) Представитель:

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

(57) Настоящее изобретение предусматривает полинуклеотидные конструкции для регуляции экспрессии генов посредством аптамер-опосредованного изменения доступности одного или нескольких сигналов полиаденилирования и способы использования конструкций для регуляции экспрессии генов в ответ на присутствие или отсутствие лиганда, связывающегося с аптамером. Полинуклеотидная конструкция содержит рибопереключател, содержащий аптамер и эффекторную шпильку, где эффекторная шпилька содержит сигнальную последовательность полиаденилирования.



201991928

A1

A1

201991928

**РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПОСРЕДСТВОМ АПТАМЕР-  
ОПОСРЕДОВАННОЙ ДОСТУПНОСТИ СИГНАЛОВ  
ПОЛИАДЕНИЛИРОВАНИЯ**

**ОПИСАНИЕ**

**Область техники, к которой относится настоящее изобретение**

Настоящее изобретение предусматривает полинуклеотидные конструкции для регуляции экспрессии генов посредством аптамер-опосредованного изменения доступности одного или нескольких сигналов полиаденилирования и способы использования полинуклеотидных конструкций для регуляции экспрессии генов в ответ на присутствие или отсутствие лиганда, связывающегося с аптамером. Полинуклеотидная конструкция содержит рибопереключател, содержащий аптамер и эффекторную шпильку, где эффекторная шпилька содержит сигнальную последовательность полиаденилирования.

**Предшествующий уровень техники настоящего изобретения**

Матричные РНК (мРНК) в эукариотических клетках образуются из транскриптов пре-мРНК путем интенсивного посттранскрипционного процессинга, включающего 5'-концевое экзпирование, удаление интронов в процессе сплайсинга, а также расщепление 3'-конца и полиаденилирование. 3'-конец почти всех эукариотических мРНК содержит поли(А)-хвост — гомополимер, содержащий от 20 до 250 остатков аденозина. Поли(А)-хвост присоединяется к пре-мРНК в ядре посредством её расщепления и полиаденилирования, процесса, катализируемого большим комплексом белков. Присоединение поли(А)-хвоста зависит от присутствия многих элементов, включая высококонсервативную сигнальную последовательность полиаденилирования ААТААА (или её вариант АТТААА), находящуюся выше сайта полиаденилирования, и другие восходящие элементы («USE»), а также Т или GT-богатые нисходящие элементы («DSE»). Помимо других функций, присоединение поли(А)-хвоста к мРНК защищает матрицу от деградации.

**Краткое раскрытие настоящего изобретения**

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает полинуклеотидную кассету для регуляции экспрессии гена-мишени, содержащую рибопереключател, где рибопереключател содержит эффекторную шпильку и аптамер, где эффекторная

шпилька содержит сигнал полиаденилирования, и где аптамер с эффекторной шпилькой связаны поочередно меняющимся плечом стебля, содержащим последовательность, которая комплементарна индивидуальному плечу аптамерного стебля и индивидуальному плечу эффекторной шпильки. В одном варианте осуществления аптамер связывает низкомолекулярный лиганд.

В вариантах осуществления, часть поочередно меняющегося плеча стебля, которая комплементарна последовательности плеча аптамерного стебля и последовательности плеча эффекторной шпильки содержит от 4 до 8 нуклеотидов, от 5 до 7 нуклеотидов, 5 нуклеотидов или 6 нуклеотидов. В вариантах осуществления аптамерный стебель содержит от 6 до 12 пар оснований, от 7 до 10 пар оснований, 8 пар оснований или 9 пар оснований. В вариантах осуществления стебель эффекторной шпильки содержит от 4 до 24 пар оснований, от 5 до 20 пар оснований, от 9 до 14 пар оснований, 9 пар оснований, 10 пар оснований, 11 пар оснований или 12 пар оснований.

В одном варианте осуществления эффекторная шпилька расположена на 3' конце аптамера таким образом, что поочередно меняющееся плечо стебля содержит всё или часть 3' плеча аптамерного стебля и всё или часть 5' плеча эффекторного стебля. В одном варианте осуществления эффекторная шпилька расположена на 5' конце аптамера таким образом, что поочередно меняющееся плечо стебля содержит всё или часть 5' плеча аптамерного стебля и всё или часть 3' плеча эффекторного стебля. В одном варианте осуществления сигнал полиаденилирования представляет собой ААТAAA или АТТAAA. В одном варианте осуществления сигнал полиаденилирования представляет собой последовательность нисходящего элемента (DSE). В одном варианте осуществления сигнал полиаденилирования представляет собой последовательность восходящего элемента (USE).

В одном варианте осуществления полинуклеотидная кассета содержит два рибопереключателя по настоящему изобретению, где эффекторная шпилька первого рибопереключателя содержит весь или часть сигнала полиаденилирования ААТAAA или АТТAA, а эффекторная шпилька второго рибопереключателя содержит весь или часть нисходящего элемента (DSE). В одном варианте осуществления каждый из двух рибопереключателей содержит аптамер, который связывает один и тот же лиганд. В одном варианте осуществления два рибопереключателя содержат разные аптамеры, которые связывают разные лиганды.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает способ изменения экспрессии гена-мишени, включающий

(а) вставку одной или нескольких полинуклеотидных кассет по настоящему изобретению в 3'-нетранслируемую область гена-мишени,

(б) введение в клетку гена-мишени, содержащего полинуклеотидную кассету, и

(в) воздействие на клетку лигандом, который связывается с аптамером в количестве, эффективном для повышения экспрессии гена-мишени.

В одном варианте осуществления лиганд представляет собой малую молекулу. В одном варианте осуществления два рибопереключател я вставляются в 3'-нетранслируемую область («НТО») гена-мишени, где эффекторная шпилька первого рибопереключател я содержит весь или часть сигнала полиаденилирования ААТAAA или АТТАА, а эффекторная шпилька второго рибопереключател я содержит весь или часть нисходящего элемента (DSE). В одном варианте осуществления каждый из двух рибопереключател я содержит аптамер, который связывает один и тот же лиганд. В одном варианте осуществления два рибопереключател я содержат разные аптамеры, которые связывают разные лиганды. В одном варианте осуществления две или большее количество полинуклеотидных кассет содержат один и тот же аптамер.

В одном варианте осуществления ген-мишень, содержащий полинуклеотидную кассету, для экспрессии гена-мишени вставлен в вектор. В одном варианте осуществления вектор представляет собой вирусный вектор. В одном варианте осуществления вирусный вектор выбран из группы, состоящей из аденовирусного вектора, аденоассоциированного вирусного вектора и лентивирусного вектора.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает вектор, содержащий ген-мишень, который содержит полинуклеотидную кассету, описанную по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления вектор представляет собой вирусный вектор. В одном варианте осуществления вирусный вектор выбран из группы, состоящей из аденовирусного вектора, аденоассоциированного вирусного вектора и лентивирусного вектора.

В одном аспекте полинуклеотидная кассета по настоящему изобретению используется в сочетании с другими механизмами для регуляции экспрессии гена-мишени. В одном варианте осуществления полинуклеотидная кассета по настоящему изобретению используется в комбинации с кассетой для регуляции генов, которая модулирует экспрессию гена-мишени посредством аптамер-опосредованной регуляции альтернативного сплайсинга, как описано в патентной заявке WO 2016/126747 (PCT/US2016/016234), включенной в настоящую заявку посредством ссылки. В других вариантах осуществления полинуклеотидная кассета по настоящему изобретению используется в комбинации с кассетой для регуляции генов, которая модулирует

экспрессию гена-мишени посредством аптамер-опосредованной регуляции саморасщепляющихся рибозимов, как описано в патентной заявке PCT/US2017/016303, включенной в настоящую заявку посредством ссылки. В других вариантах осуществления полинуклеотидная кассета по настоящему изобретению используется в комбинации с кассетой для регуляции генов, которая изменяет экспрессию гена-мишени посредством аптамер-опосредованного изменения доступности сигналов полиаденилирования, как описано в патентной заявке PCT/US1207/016279, включенной в настоящую заявку посредством ссылки.

### **Краткое описание фигур**

Фиг. 1a. Схема для одного варианта осуществления по настоящему изобретению, в которой 3' плечо аптамерного стебля связано с 5' плечом стебля эффекторной шпильки посредством поочередно меняющегося плеча стебля (то есть плеча стебля, которое может образовывать структуру типа «стебель» либо с плечом аптамерного стебля, либо с плечом эффекторного стебля, но не обоими одновременно), а сигнальная последовательность полиаденилирования (в данном случае ААТААА) расположена в стебле эффекторной шпильки.

Фиг. 1b. Схемы для одного варианта осуществления по настоящему изобретению, в котором доступность сигнала полиаденилирования (в данном случае ААТААА) регулируется наличием или отсутствием аптамерного лиганда. Аптамер, связанный с эффекторной шпилькой (с встроенной в ее стебель последовательностью ААТААА), вставлен в 3'-НТО. Комплементарная последовательность 5' плеча шпилечной структуры с последующей аптамерной последовательностью связана с 5' плечом шпилечной структуры эффекторной шпильки. При отсутствии аптамерного лиганда (верхняя панель) последовательность ААТААА блокируется шпилечной структурой, образованной эффекторной шпилькой, ингибируя полиаденилирование и тем самым подавляя экспрессию гена. В присутствии аптамерного лиганда связывание аптамер/лиганд способствует образованию аптамерного стебля Р1, тем самым нарушая структуру эффекторной шпильки и приводя к высвобождению ААТААА из заблокированного положения. Последовательность, которая меняется между стеблем эффекторной шпильки и аптамерным стеблем Р1, обозначена жирной линией.

Фиг. 1c и Фиг. 1d. Регуляция экспрессии люциферазы посредством аптамер-опосредованного изменения доступности ААТААА. Клетки НЕК 293 трансфицировали указанными конструкциями и обрабатывали ДМСО (фиг. 1c) или NaOH (фиг. 1d) в качестве контрольных растворителей или 500 мкМ гуанозином (фиг. 1c) или гуанином

(фиг. 1d). Активность люциферазы выражали в виде среднего  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ), а кратность индукции выражали как отношение активности люциферазы, полученной в присутствии гуанозина или гуанина, деленной на значение, полученное в отсутствии гуанозина или гуанина.

Фиг. 1e. Регуляция экспрессии EGFP посредством аптамер-опосредованного изменения доступности AATAAA. Клетки НЕК 293 трансфицировали указанными конструкциями и обрабатывали либо NaOH в качестве контрольного растворителя, либо 500 мкМ гуанином. Интенсивность флуоресценции GFP выражали в виде среднего  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ), а кратность индукции выражали как отношение интенсивности флуоресценции, полученной в присутствии гуанина, деленной на значение, полученное в отсутствии гуанина.

Фиг. 2a. Схемы изменения доступности DSE в шпильке путем связывания аптамер/лиганд. Структура, формирующая шпильку со встроенной в нее последовательностью DSE, встроена в 3'-НТО. Аптамерная последовательность связана с 3' плечом структуры, формирующей шпильку, за которой следует комплементарная последовательность 3' плеча шпилечной структуры. В отсутствие аптамерного лиганда (верхняя панель) последовательность DSE блокируется посредством образования шпилечной структуры, тем самым ингибируя полиаденилирование и подавляя экспрессию гена-мишени. В присутствии аптамерного лиганда (нижняя панель) связывание аптамер/лиганд способствует образованию аптамерного стебля P1, тем самым разрушая шпилечную структуру и приводя к высвобождению последовательности DSE из заблокированного положения. Последовательность, которая меняется между стеблем эффекторной шпильки и аптамерным стеблем P1, обозначена жирной линией.

Фиг. 2b и Фиг. 2c. Регуляция экспрессии люциферазы посредством аптамер-опосредованного изменения доступности DSE. Клетки НЕК 293 трансфицировали указанными конструкциями и обрабатывали ДМСО (фиг. 2b) или NaOH (фиг. 2c) в качестве контрольных растворителей или 500 мкМ гуанозинном (фиг. 2b) или гуанином (фиг. 2c). Активность люциферазы представлена в виде среднего  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ), а кратность индукции выражали как отношение активности люциферазы, полученной в присутствии гуанозина или гуанина, деленной на значение, полученное в отсутствии гуанозина или гуанина.

Фиг. 3. Регуляция экспрессии люциферазы посредством аптамер-опосредованного изменения доступа к синтетической последовательности поли(A).

Фиг. 4. Последовательность петли в шпилечной структуре влияет на активность рибопереклювателя, полученного на основе поли(A) последовательности. *stbl\_ATA\_Gua\_1* имеет более стабильную TTCG петлю, *ATA\_Gua\_1* имеет GAAA петлю, а *gaat\_ATA\_Gua\_1* имеет GAAT петлю.

Фиг. 5а. Схемы одновременного изменения доступности AATAAA и последовательности DSE посредством аптамера. Две шпилечные структуры, каждая из которых встраивает в свою структуру AATAAA или последовательность DSE, вставляются в 3'-НТО гена-мишени, а аптамеры связаны с каждой шпилечной структурой, как это описано для фиг. 1b и фиг. 2а. Аптамер 1 и аптамер 2 представляют собой один и тот же аптамер или разные аптамеры, которые связывают один и тот же или разные лиганды. В отсутствие аптамерного лиганда (верхняя панель), AATAAA и DSE блокируются в шпилечных структурах, поэтому экспрессия гена подавляется. В присутствии аптамерного лиганда (нижняя панель), когда оба аптамера связывают свои лиганды, AATAAA и последовательность DSE высвобождаются из шпилечной структуры, тем самым способствуя экспрессии гена-мишени.

Фиг. 5b. Клетки НЕК 293 трансфицировали указанными конструкциями и обрабатывали NaOH в качестве контрольного растворителя или 500 мкМ гуанином. Активность люциферазы выражали в виде среднего  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ), а кратность индукции выражали как отношение активности люциферазы, полученной в присутствии гуанина, деленной на значение, полученное в отсутствие гуанина. Одновременное блокирование AATAAA и последовательности элемента DSE в последовательности поли(A) дополнительно снижает базальный уровень экспрессии люциферазы в конструкции *ATA\_DSE\_Gua*.

Фиг. 6а. Схема конструкции двойного переключателя, в котором рибопереклюватель *ATA\_Gua* расположен в 3'-НТО, а рибопереклюватель G15 вставлен в кодирующую последовательность люциферазы.

Фиг. 6b. Активность люциферазы в клетках НЕК 293, трансфицированных указанными конструкциями, которые обработаны 500 мкМ гуанином или не обработаны таковым. Конструкция с двумя переключателями *rFLuc-G15\_ATA\_Gua* производила более высокую кратность индукции, чем конструкция с одним рибопереклювателем.

Фиг. 7. Регуляция экспрессии люциферазы посредством специфичной к аденину аптамер-опосредованного изменения доступности AATAAA. Клетки НЕК 293 трансфицировали указанными конструкциями и обрабатывали NaOH в качестве контрольного растворителя или 1 мМ аденином. Активность люциферазы выражали в виде среднего  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ), а кратность индукции выражали как отношение активности

люциферазы, полученной в присутствии аденина, деленной на значение, полученное в отсутствии аденина.

Фиг. 8. 3'-НТО конструкций, использованных в примерах настоящего документа. Кодирующая последовательность гена люциферазы указана заглавными буквами; AATAAA и DSE выделены серым цветом; последовательность аптамера подчеркнута; последовательность шпильки подчеркнута волнистой линией; а последовательность аптамерного стебля P1 выделена курсивом.

### **Подробное раскрытие настоящего изобретения**

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США №62/461689, поданной 21 февраля 2017 года, которая включена в настоящий документ во всей своей полноте. Настоящая заявка ссылается на список последовательностей, предусматривающий перечисленные ниже SEQ ID NO, который предоставляется в качестве электронного документа и который включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Во многих ситуациях полезна или необходима регуляция экспрессии гена-мишени (например, терапевтического трансгена). В контексте терапевтической экспрессии генов, техники, которые обеспечивают регулируемую экспрессию трансгенов, могут повысить безопасность их применения путем регуляции уровня экспрессии и ее продолжительности. С целью контроля экспрессии белка регулируемая система играет практическую и, в некоторых случаях, критическую роль для обеспечения безопасных и эффективных терапевтических применений. Настоящее изобретение предусматривает полинуклеотидные конструкции для регуляции экспрессии генов за счет изменения полиаденилирования посредством аптамера, путем блокирования одного или нескольких сигналов полиаденилирования в шпилечной структуре (эффекторная шпилька), которая связана с аптамером, и способы использования конструкций для регуляции экспрессии генов в ответ на присутствие или отсутствие лиганда, связывающегося с аптамером.

Полинуклеотидная конструкция содержит по меньшей мере один рибопереключател, который содержит эффекторную шпильку и аптамер, где эффекторная шпилька содержит сигнальную последовательность полиаденилирования. Аптамер и эффекторная шпилька связаны меняющимся плечом стебля, которое может поочередно образовывать стебель либо с плечом аптамерного стебля, либо с плечом эффекторного стебля в зависимости от присутствия аптамерного лиганда. В присутствии аптамерного лиганда и его связывании с аптамером, аптамерный стебель

(аптамерный стебель Р1) стабилизируется и образует стебель, путем взаимодействия с поочередно меняющимся плечом стебля. Таким образом, в присутствии лиганда, шпилечная структура, образованная эффекторной шпилькой, дестабилизируется и становится доступным сигналом полиаденилирования, что способствует полиаденилированию, приводящему к усиленной экспрессии гена-мишени. В отсутствие лиганда эффекторная шпилька образует шпилечную структуру путем взаимодействия с поочередно меняющимся плечом стебля, тем самым блокируя сигнальную последовательность полиаденилирования, предотвращая полиаденилирование и уменьшая экспрессию гена-мишени.

В одном варианте осуществления эффекторная шпилька располагается на 3' конце аптамера таким образом, что поочередно меняющееся плечо стебля содержит всё или часть 3' плеча аптамерного стебля и всё или часть 5' плеча эффекторного стебля (см., например, фиг. 1a и 1b). В другом варианте осуществления эффекторная шпилька располагается на 5' конце аптамера таким образом, что поочередно меняющееся плечо стебля содержит всё или часть 5' плеча аптамерного стебля и всё или часть 3' плеча эффекторного стебля (см., например, фиг. 3).

Полинуклеотидная кассета для регуляции генов относится к рекомбинантной ДНК-конструкции, которая при встраивании в ДНК гена-мишени в 3'-НТО обеспечивает возможность регулирования экспрессии гена-мишени посредством аптамер/лиганд-опосредованной регуляции полиаденилирования. В контексте настоящего документа полинуклеотидная кассета или конструкция представляет собой нуклеиновую кислоту (например, ДНК или РНК), содержащую элементы, полученные из различных источников (например, различных организмов, различных генов одного и того же организма и т. д.).

### **Рибопереключатель**

Полинуклеотидная кассета содержит рибопереключатель. В контексте настоящего документа термин «рибопереключатель» относится к регуляторному сегменту полинуклеотида РНК (или ДНК, кодирующей рибопереключатель). Рибопереключатель в контексте настоящего изобретения содержит сенсорную область (например, аптамер) и эффекторную шпильку, которые вместе отвечают за определение присутствия лиганда (например, малой молекулы) и изменение доступности последовательности полиаденилирования, находящейся в эффекторной шпильке. В одном варианте осуществления рибопереключатель является рекомбинантным, использующим полинуклеотиды из двух или более источников. В контексте настоящего

документа термин «синтетический», в отношении рибопереключател я относится к рибопереключател ю, который не встречается в природе.

### **Эффекторная шпилька**

Эффекторная шпилька рибопереключател я содержит последовательность РНК (или ДНК, кодирующую последовательность РНК), которая в отсутствии лиганда, связывающегося с сенсорной областью (например, аптамером), образует структуру типа «стебель» (то есть двухцепочечную область), что уменьшает доступность сигнальной последовательности полиаденилирования. В одном варианте осуществления эффекторная шпилька содержит сигнальную последовательность полиаденилирования и последовательность, комплементарную сигнальной последовательности полиаденилирования. В некоторых вариантах осуществления часть стебля эффекторной шпильки содержит только часть сигнальной последовательности полиаденилирования. В некоторых вариантах осуществления вся или часть сигнальной последовательности полиаденилирования расположена в области петли эффекторной шпильки.

Сигнальная последовательность полиаденилирования может быть любой последовательностью в 3'-НТО гена-мишени, которая участвует в эффективном полиаденилировании мРНК, транскрибированной с гена-мишени, включая ААТAAA (или родственные последовательности), последовательность нисходящего элемента (DSE) (например, Т или GT-богатая последовательность) или последовательность восходящего элемента (USE). В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность полиаденилирования представляет собой эндогенную последовательность, находящуюся в 3'-НТО гена-мишени. В других вариантах осуществления сигнальная последовательность полиаденилирования представляет собой экзогенную последовательность (например, последовательность, полученную из другого гена или другого организма) или синтетическую сигнальную последовательность полиаденилирования.

Одно из плеч стебля эффекторной шпильки связано с аптамером посредством аптамерного стебля (см., например, фиг. 1a, 1b и 2a). Когда аптамер не связан со своим лигандом, эффекторная шпилька стабилизирована, что тем самым ингибирует доступ к сигнальной последовательности полиаденилирования, ингибируя полиаденилирование и приводя к разрушению матрицы. Когда аптамер связывается со своим лигандом, эффекторная шпилька находится в конформации, которая не ингибирует доступ к сигнальной последовательности полиаденилирования, обеспечивая полиаденилирование матрицы и повышенную экспрессию гена-мишени.

Часть стебля эффекторной шпильки должна иметь достаточную длину (и содержание GC), чтобы способствовать формированию шпилечной структуры и тем самым ингибировать доступ к сигнальной последовательности полиаденилирования когда аптамерный лиганд отсутствует в достаточных количествах. В вариантах осуществления по настоящему изобретению часть стебля эффекторной шпильки содержит, в дополнении к сигнальной последовательности полиаденилирования, последовательность самого стебля и комплементарную ей последовательность. Длина и последовательность части стебля могут быть изменены с использованием известных техник чтобы идентифицировать стебли, что обеспечит получение приемлемой фоновой экспрессию гена-мишени в отсутствии лиганда и приемлемых уровней экспрессии гена-мишени в присутствии лиганда. Например, если стебель слишком длинный, он может блокировать доступ к сигнальной последовательности полиаденилирования в присутствии или отсутствии лиганда. Если стебель слишком короткий, он может не образовывать стабильную шпилечную структуру, способную блокировать сигнальную последовательность полиаденилирования, и в этом случае полиаденилирование матрицы (приводящее к экспрессии гена-мишени) будет происходить в присутствии или отсутствии лиганда. В одном варианте осуществления общая длина эффекторного стебля (то есть части, образующей стебель в эффекторной шпильке) составляет от 4 до 24 пар оснований, от 5 до 20 пар оснований, от 9 до 14 пар оснований, 9 пар оснований, 10 пары оснований, 11 пар оснований или 12 пар оснований. В дополнение к длине стебля, содержание пары оснований GC в стебле может быть изменено с целью модификации его стабильности. В некоторых вариантах осуществления область эффекторного стебля содержит один или более несовпадающих нуклеотидов, которые не образуют пары оснований с комплементарным участком в области эффекторного стебля.

#### **Поочередно меняющееся плечо стебля**

Эффекторная шпилька и аптамер связаны посредством поочередно меняющегося плеча стебля, которое содержит последовательность, которая является комплементарной как индивидуальному плечу эффекторной шпильки, так и индивидуальному плечу аптамерного стебля. В связи с тем, что данная последовательность комплементарна индивидуальным плечам в аптамерном и эффекторном стеблях, меняющееся плечо стебля может поочередно формировать либо аптамерный стебель, либо эффекторный стебель (но не оба одновременно) в зависимости от присутствия аптамерного лиганда. В вариантах осуществления часть поочередно меняющегося плеча стебля, которое комплементарно последовательности в

аптамерном стебле и последовательности в эффекторной шпильке (то есть поочередно меняющаяся последовательность), содержит от 4 до 8 нуклеотидов, от 5 до 7 нуклеотидов, 5 нуклеотидов или 6 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления поочередно меняющееся плечо стебля содержит дополнительную последовательность, которая комплементарна только одному индивидуальному плечу эффекторного стебля или аптамерного стебля. В некоторых вариантах осуществления в дополнение к поочередно меняющейся последовательности, поочередно меняющееся плечо стебля содержит (а) последовательность, которая комплементарна индивидуальному плечу эффекторного стебля, но не комплементарна индивидуальному плечу аптамерного стебля; (б) последовательность, которая комплементарна индивидуальному плечу аптамерного стебля, но не комплементарна индивидуальному плечу эффекторного стебля; или (с) обе последовательности.

#### **Аптамер/лиганд**

В одном варианте осуществления сенсорная область содержит аптамер. В контексте настоящего документа термин «аптамер» относится к полинуклеотиду РНК, который специфически связывается с лигандом. Аптамер связан с эффекторной шпилькой посредством аптамерного стебля. Аптамерный стебель может содержать последовательность, которая типично является частью аптамера (например, последовательность аптамерного стебля дикого типа), или не содержать таковой. Таким образом, указание на аптамерный стебель не означает, что аптамерный стебель содержит какую-либо конкретную последовательность. Поэтому, аптамерный стебель может содержать последовательность, полученную из аптамера и/или дополнительную последовательность, способную образовывать стебель при связывании лиганд/аптамер.

Как и в случае со стеблем эффекторной шпильки, раскрытой выше, аптамерная шпилька должна иметь достаточную длину (и содержание GC), такую, что бы аптамер мог образовывать аптамерный стебель в присутствии аптамерного лиганда, а эффекторная шпилька образовывать стебель при отсутствии лиганда. Длина и последовательность аптамерного стебля могут быть изменены с использованием известных техник чтобы идентифицировать стебли, что обеспечит получение приемлемой фоновой экспрессию гена-мишени в отсутствии лиганда и приемлемых уровней экспрессии гена-мишени в присутствии лиганда. В вариантах осуществления аптамерный стебель содержит от 6 до 12 пар оснований, от 7 до 10 пар оснований, 8 пар оснований или 9 пар оснований.

Термин «лиганд» относится к молекуле, которая специфически связывается с аптамером. В одном варианте осуществления лиганд представляет собой молекулу с

низкой молекулярной массой (менее чем приблизительно 1000 Дальтон), включая, например, липиды, моносахариды, вторичные мессенджеры, кофакторы, ионы металлов, другие природные продукты и метаболиты, нуклеиновые кислоты, а также большинство терапевтических лекарственных средств. В одном варианте осуществления лиганд представляет собой полинуклеотид с двумя или более нуклеотидными основаниями.

В одном варианте осуществления лиганд выбран из группы, состоящей из 8-азагуанина, моногидрат аденозин-5'-монофосфата, амфотерицина В, авермектина В1, азатиоприна, ацетат хлормадинона, меркаптопурина, гидрохлорид морицизина, N6-метиладенозина, надида, прогестерона, гидрохлорид промазина, первиний памоата, сульфатуанидина, пропионат тестостерона, тиогуанозина, тилоксапола и вориностата.

Аптамерными лигандами также могут быть эндогенные компоненты клеток, концентрация которых значительно увеличивается при определенных физиологических/патологических условиях, таких как онкогенная трансформация - к ним могут относиться молекулы вторичных мессенджеров, такие как GTP или GDP, кальций; жирные кислоты или таковые, которые неправильно метаболизируются, такие как 13-HODE при раке молочной железы (Flaherty, JT et al., Plos One, Vol. 8, e63076, 2013, включенной в настоящий документ посредством ссылки); аминокислоты или их метаболиты; метаболиты гликолиза, которые обычно имеют более высокие уровни в раковых клетках или в нормальных клетках при метаболических заболеваниях; и ассоциированные с раком молекулы, такие как Ras или мутантный белок Ras, мутантный EGFR при раке легкого, индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO) при многих типах рака. Эндогенные лиганды включают метаболиты прогестерона при раке молочной железы, как это было раскрыто в работе JP Wiebe (Endocrine-Related Cancer (2006) 13:717-738, включенной в настоящий документ посредством ссылки). Эндогенные лиганды также включают метаболиты, имеющие повышенные уровни, что является следствием мутаций в ключевых ферментах метаболизма при раке почки, такие как лактат, глутатион, кинуренин, как это раскрыто в работе Minton, DR and Nanus, DM (Nature Reviews, Urology, Vol. 12, 2005, включенной в настоящий документ посредством ссылки).

Аптамеры имеют области связывания, которые способны образовывать комплексы с предполагаемой молекулой-мишенью (то есть лигандом). Специфичность связывания может быть определена путем сравнения констант диссоциации (Kd) аптамера со своим лигандом, относительно константы диссоциации аптамера с неродственными молекулами. Таким образом, лиганд представляет собой молекулу,

которая связывается с аптамером с большей аффинностью, чем другой неродственный материал. Как правило,  $K_d$  для аптамера в отношении его лиганда будет по меньшей мере приблизительно в 10 раз меньше, чем  $K_d$  для аптамера в отношении неродственных молекул. В других вариантах осуществления  $K_d$  будет по меньшей мере приблизительно в 20 раз меньше, по меньшей мере приблизительно в 50 раз меньше, по меньшей мере приблизительно в 100 раз меньше и по меньшей мере приблизительно в 200 раз меньше. Как правило, аптамер будет иметь длину от приблизительно 15 до приблизительно 200 нуклеотидов. Чаще всего аптамер будет иметь длину от приблизительно 30 до приблизительно 100 нуклеотидов.

Аптамеры, которые могут быть встроены как часть рибопереключателя, могут представлять собой встречающийся в природе аптамер или его модификации, или аптамеры, которые разработаны *de novo* и/или отобраны в процессе систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением (SELEX) или других способов отбора. Примеры аптамеров, которые связывают низкомолекулярные лиганды, включают без ограничения теофиллиновые, дофаминовые, связывающие сульфородамин В, целлобиозные, связывающие канамицин А, ливидомициновые, тобрамициновые, связывающие неомицин В, виомициновые, хлорамфениколовые, стрептомициновые, связывающие цитокины, связывающие молекулы клеточной поверхности и метаболиты. Для ознакомления с аптамерами, которые распознают малые молекулы, см., например, Famulok, *Science* 9:324-9 (1999) и McKeague, M. & DeRosa, M.C. *J. Nuc. Acі.* 2012 (обе из которых включены в настоящий документ посредством ссылки). В другом варианте осуществления аптамер представляет собой комплементарный полинуклеотид.

### **Способы идентификации аптамер/лиганда**

В одном варианте осуществления аптамер сконструирован таким образом, чтобы связывать определенный низкомолекулярный лиганд. Способы конструирования и отбора аптамеров, которые связывают определенные лиганды, раскрыты в патентной заявке WO/2018/025085, включенной в настоящий документ посредством ссылки. Другие способы отбора аптамеров включают, например, SELEX. Способы конструирования аптамеров, которые избирательно связывают малую молекулу, с использованием технологии SELEX, раскрыты, например, в патентах США №№5475096, 5270163 и работе Abdullah Ozer et al. *Nuc. Acі.* 2014, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. Модификации процесса SELEX раскрыты в патентах США №5580737 и 5567588, которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

Техники отбора для идентификации аптамеров обычно включают получение большого пула молекул ДНК или РНК требуемой длины, которые содержат область, которая рандомизирована или мутагенизирована. Например, пул олигонуклеотидов, предназначенных для отбора аптамеров может содержать область из 20-100 рандомизированных нуклеотидов, фланкированных областями с определенной последовательностью, которые имеют длину приблизительно 15-25 нуклеотидов и пригодны для связывания ПЦР праймеров. Пул олигонуклеотидов амплифицируют с использованием стандартных техник ПЦР или других способов, которые позволяют амплифицировать выбранные последовательности нуклеиновых кислот. Пул ДНК может быть транскрибирован *in vitro* для получения пула транскриптов РНК, когда требуется получение РНК-аптамера. Затем пул олигонуклеотидов РНК или ДНК подвергают отбору основываясь на их способности специфически связываться с требуемым лигандом. Техники отбора включают, например, аффинную хроматографию, при этом может использоваться любой протокол, который позволит отбирать нуклеиновые кислоты на основе их способности специфически связываться с другой молекулой. Техники отбора для идентификации аптамеров, которые связывают малые молекулы и функционируют внутри клетки, могут включать способы отбора, проводимые непосредственно в клетке. В случае аффинной хроматографии олигонуклеотиды контактируют с лигандом-мишенью, который был иммобилизован на субстрате в колонке или на магнитных шариках. Олигонуклеотид предпочтительно отбирается на связывание с лигандом в присутствии установленных концентраций солей, температур и других условий, которые имитируют нормальные физиологические условия. Олигонуклеотиды из общего пула, которые связываются с лигандом, остаются на колонке или шарике, а несвязывающие последовательности вымываются. Олигонуклеотиды, которые связывают лиганд, затем амплифицируют (после обратной транскрипции, если используются РНК-транскрипты) с помощью ПЦР (обычно после элюирования). Процесс отбора повторяется для отобранных последовательностей в общей сложности приблизительно от трех до десяти повторяющихся раундов данной процедуры отбора. Полученные олигонуклеотиды затем амплифицируют, клонируют и секвенируют, используя стандартные процедуры с целью идентификации последовательностей олигонуклеотидов, которые способны связывать лиганд-мишень. Как только аптамерная последовательность была идентифицирована, аптамер может быть дополнительно доведен до оптимальных параметров путем проведения дополнительных раундов отбора, начиная с этапа формирования пула олигонуклеотидов, содержащих мутагенизированную аптамерную последовательность.

*In vivo* скрининг аптамеров можно проводить после одного или нескольких *in vitro* раундов отбора (например, SELEX). Например, в работе Konig, J. et al. (RNA. 2007, 13 (4): 614–622, включенной в настоящий документ посредством ссылки) описывается комбинирование технологии SELEX и трехгибридной дрожжевой системы для *in vivo* отбора аптамера.

### **Гены-мишени**

Кассета для регуляции генов по настоящему изобретению представляет собой платформу, которая может использоваться для регулирования экспрессии любого гена-мишени, который может быть экспрессирован в клетке-, ткани- или организме-мишени с помощью мРНК, которая является полиаденилированной. Термин «ген-мишень» относится к полинуклеотиду, который вводится в клетку и способен транскрибироваться в РНК и транслироваться и/или экспрессироваться в соответствующих условиях. В качестве альтернативы, ген-мишень является эндогенным по отношению к клетке-мишени, а кассета для регуляции генов по настоящему изобретению расположена в 3'-НТО гена-мишени. Примером гена-мишени является полинуклеотид, кодирующий терапевтический полипептид. В одном варианте осуществления ген-мишень является экзогенным для клетки, в которой должна быть транскрибирована рекомбинантная ДНК-конструкция. В другом варианте осуществления ген-мишень является эндогенным для клетки, в которой должна быть транскрибирована рекомбинантная ДНК-конструкция.

Ген-мишень в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой ген, кодирующий белок. Например, ген-мишень может быть геном, кодирующим структурный белок, фермент, сигнальный белок клетки, митохондриальный белок, белок "цинковые пальцы", гормон, транспортный белок, фактор роста, цитокин, внутриклеточный белок, внеклеточный белок, трансмембранный белок, цитоплазматический белок, ядерный белок, молекулу рецептора, РНК-связывающий белок, ДНК-связывающий белок, фактор транскрипции, белки аппарата трансляции, каналный белок, моторный белок, молекулу клеточной адгезии, митохондриальный белок, фермент метаболизма, киназу, фосфатазу, факторы обмена, шаперон и модуляторы любого из них. В вариантах осуществления ген-мишень кодирует эритропоэтин (Еро), человеческий гормон роста (hGH), эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции (TALEN), человеческий инсулин, CRISPR-ассоциированный белок 9 (cas9) или иммуноглобулин (или его часть), включая например, терапевтическое антитело.

### **Экспрессионные конструкции**

Настоящее изобретение предусматривает использование рекомбинантного вектора для введения в клетки-мишени полинуклеотида, кодирующего ген-мишень и содержащего кассету для регуляции гена, описанную в настоящей заявке. Во многих вариантах осуществления рекомбинантная ДНК-конструкция по настоящему изобретению включает дополнительные элементы ДНК, включая сегменты ДНК, которые обеспечивают репликацию ДНК в клетке-хозяине и экспрессию гена-мишени в этой клетке при соответствующих уровнях. Специалист в данной области техники знает, что последовательности контроля экспрессии (промоторы, энхансеры и т. д.) выбираются на основе их способности стимулировать экспрессию гена-мишени в клетке-мишени. Термин «вектор» подразумевает рекомбинантную плазмиду, дрожжевую искусственную хромосому (YAC), мини-хромосому, мини-круг ДНК или вирусы (включая последовательности, полученные из вирусов), которые содержат полинуклеотид, который должен быть доставлен в клетку-хозяин либо *in vitro*, либо *in vivo*. В одном варианте осуществления рекомбинантный вектор представляет собой вирусный вектор или комбинацию множества вирусных векторов.

Вирусные векторы для аптамер-опосредованной экспрессии гена-мишени в клетке-, ткани- или организме-мишени известны в данной области техники и включают аденовирусные (AV) векторы, аденоассоциированные вирусные векторы (AAV), ретровирусные и лентивирусные векторы, и векторы вируса простого герпеса, тип 1 (HSV1).

Аденовирусные векторы включают, например, таковые, на основе человеческого аденовируса 2-го типа и человеческого аденовируса 5-го типа, в которые были внесены дефекты репликации посредством делеций в областях E1 и E3. В область E1 может быть вставлена транскрипционная кассета, получая тем самым рекомбинантный AV-вектор с удаленной E1/E3. Аденовирусные векторы также включают хелпер-зависимые аденовирусные векторы большой емкости (также известные как векторы большой емкости, «выпотрошенные» векторы), которые не содержат вирусных кодирующих последовательностей. Эти векторы содержат цис-действующие элементы, необходимые для репликации и упаковки вирусной ДНК, преимущественно последовательности инвертированного концевой повтора (ITR) и сигнал упаковки (Ψ). Эти хелпер-зависимые геномы AV-вектора способны переносить от нескольких сотен пар оснований до приблизительно 36 т.п.о. чужеродной ДНК.

Векторы рекомбинантного аденоассоциированного вируса «rAAV» включают любой вектор, полученный из любого аденоассоциированного вирусного серотипа, включая без ограничения AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-7 и AAV-8,

AAV-9, AAV-10 и т. д. Векторы гAAV могут иметь полностью или частично удаленные один или более генов AAV дикого типа, предпочтительно гены Rep и/или Cap, но сохранять функциональные фланкирующие последовательности ITR. Функциональные последовательности ITR сохраняются для восстановления, репликации, упаковки и потенциальной хромосомной интеграции генома AAV. ITR не обязательно должны быть нуклеотидными последовательностями дикого типа и могут быть изменены (например, путем вставки, удаления или замены нуклеотидов) до того момента, пока эти последовательности все еще обеспечивают функциональное восстановление, репликацию и упаковку.

В качестве альтернативы, другие системы, такие как лентивирусные векторы, могут быть использованы в вариантах осуществления настоящего изобретения. Лентивирусные системы могут преобразовывать как неделящиеся, так и делящиеся клетки, что делает их пригодными для использования, нацеленного, например, на неделящиеся клетки ЦНС. Получены из вируса иммунодефицита человека лентивирусные векторы, подобно этому вирусу, интегрируются в геном хозяина, обеспечивая возможность долгосрочной экспрессии генов.

Полинуклеотиды, включая плазмиды, YAC, мини-хромосомы и мини-круги, несущие ген-мишень, содержащий каскету для регуляции гена, также могут быть введены в клетку или организм с помощью векторных систем не вирусного происхождения, используя в качестве носителей, например, катионные липиды, полимеры или их комбинацию. Системы конъюгированных полимеров поли-L-лизина (PLL) и полиэтиленimina (PEI) также могут быть использованы для доставки вектора в клетки. Другие способы доставки вектора в клетку включают гидродинамическую инъекцию, электропорацию и использование ультразвука как для культур клеток, так и целых организмов. Для ознакомления с системами вирусной доставки и таковыми, не на основе вирусного происхождения, для доставки генов см. работу Nayerossadat, N. et al. (Adv Biomed Res. 2012; 1:27; включенная в настоящий документ посредством ссылки).

### **Способы изменения экспрессии целевого гена**

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает способ изменения экспрессии гена-мишени (например, терапевтического гена) путем (а) вставки в 3'-НТО гена-мишени одной или нескольких полинуклеотидных каскет для регуляции гена по настоящему изобретению; (б) введения в клетку гена-мишени, содержащего каскету для регулирования гена; и (с) воздействия на клетку лигандом, который связывается с аптамером. В одном варианте осуществления лиганд представляет собой малую молекулу. В аспектах настоящего изобретения экспрессия гена-мишени в клетках-

мишенях придает требуемое свойство клетке, в которую он был введен, или иным образом приводит к требуемому терапевтическому результату. Клетками-мишенями являются эукариотические клетки, например клетки млекопитающих. В вариантах осуществления клетки-мишени представляют собой человеческие клетки, полученные из ткани-мишени, включая, например, жировые клетки, клетки центральной нервной системы (ЦНС), мышечные клетки, клетки сердца, глаза, печени и т. д.

В одном варианте осуществления одна или несколько кассет для регуляции гена вставляются в 3'-нетранслируемую область гена-мишени. В одном варианте осуществления, одна кассета для регуляции гена вставлена в 3'-НТО гена-мишени. В одном варианте осуществления два рибопереключателя вставлены в 3'-нетранслируемую область гена-мишени, где эффекторная шпилька первого рибопереключателя содержит весь или часть сигнала полиаденилирования ААТААА (или АТТАА), а эффекторная шпилька второго рибопереключателя содержит весь или часть нисходящего элемента (DSE).

В одном варианте осуществления, когда несколько кассет для регуляции гена вставлены в ген-мишень, каждая из них может содержать один и тот же аптамер, таким образом, что можно использовать один лиганд для изменения экспрессии гена-мишени. В других вариантах осуществления, когда несколько кассет для регуляции гена вставлены в ген-мишень, каждая из них может содержать разный аптамер, таким образом, что изменение экспрессии гена-мишени осуществляется путем воздействия нескольких различных низкомолекулярных лигандов.

Полинуклеотидная кассета по настоящему изобретению может быть использована в сочетании с другими механизмами для регуляции экспрессии гена-мишени. В одном варианте осуществления полинуклеотидная кассета по настоящему изобретению используется в комбинации с кассетой для регуляции генов, которая модулирует экспрессию гена-мишени посредством аптамер-опосредованной регуляции альтернативного сплайсинга, как описано в патентной заявке WO 2016/126747, включенной в настоящий документ посредством ссылки. Настоящее изобретение также можно комбинировать с полинуклеотидными конструкциями и способами, описанными в патентных заявках PCT/US2017/016303 и PCT/US1207/016279, включенных в настоящий документ посредством ссылки.

### **Способы лечения и фармацевтические композиции**

Один аспект по настоящему изобретению предусматривает способ регулирования уровня терапевтического белка, доставляемого генной терапией. В этом варианте осуществления «ген-мишень» может кодировать терапевтический белок. «Ген-

мишень» может кодировать белок, который является эндогенным или экзогенным для клетки.

Последовательность терапевтического гена, содержащая кассету для его регуляции, с рибопереключателем, который управляется за счет аптамера, доставляется в клетки-мишени *in vitro* или *ex vivo*, например, вектором. Клеточная специфичность «гена-мишени» может контролироваться промотором или другими элементами в векторе. Доставка векторной конструкции, содержащей ген-мишень и полинуклеотидную кассету, и трансфекция тканей-мишеней, приводящая к стабильной трансфекции регулируемого гена-мишени, часто являются первыми шагами в процессе получения терапевтического белка.

Однако, из-за того, что в последовательности гена-мишени присутствует регуляторная кассета, он не экспрессируется на значительных уровнях (или экспрессируется на более низких уровнях), т.е. он находится в «выключенном состоянии» при отсутствии специфического лиганд, который связывается с аптамером, содержащимся внутри регуляторной кассете рибопереключателея. Только когда вводится специфический для аптамера лиганд (или иным образом присутствует в достаточных количествах), экспрессия гена-мишени активируется или увеличивается.

Доставка векторной конструкции, содержащей ген-мишень с полинуклеотидной кассетой, и доставка активирующего лиганда обычно разделяются по времени. Когда экспрессируется ген-мишень, доставка активирующего лиганда также будет контролировать уровень экспрессии белка. Лиганд может быть доставлен несколькими путями, включая без ограничения пероральный, внутримышечный (ИМ), внутривенный (ИВ), внутриглазной или местный пути введения.

Определенные сроки доставки лиганда будет зависеть от потребности в активации гена-мишени. Например, если терапевтический белок, кодируемый геном-мишенью, требуется на постоянной основе, низкомолекулярный лиганд перорального введения может доставляться ежедневно или несколько раз в день для обеспечения непрерывной активации гена-мишени и, таким образом, поддерживать непрерывную экспрессию терапевтического белка. Если ген-мишень обладает эффектом длительной активности, индуцирующий лиганд можно дозировать реже.

Настоящее изобретение позволяет контролировать экспрессию терапевтического трансгена в определенных промежутках времени способом, предусматривающим дозирование лиганда, специфичного к аптамеру, находящемуся в рибопереключателе регуляторной полинуклеотидной кассеты, в определенных промежутках времени. Повышенная экспрессия терапевтического трансгена, стимулируемая только в случае

введения лиганда, повышает безопасность лечения с использованием генной терапии путем отключения гена-мишени в отсутствие лиганда.

Могут быть использованы различные аптамеры, чтобы способствовать различным лигандам активировать гены-мишени. В определенных вариантах осуществления по настоящему изобретению каждый терапевтический ген, содержащий регуляторную кассету, будет иметь специфический аптамер внутри кассеты, который будет активироваться специфичной малой молекулой. Это означает, что каждый терапевтический ген может быть активирован только лигандом, специфичным для аптамера, размещенного в нем. В настоящих вариантах осуществления каждый лиганд будет активировать только один терапевтический ген. Это предоставляет возможность доставки одному индивиду сразу нескольких различных «генов-мишеней», каждый из которых будет активирован при доставке специфического лиганда для аптамера, содержащегося в регуляторной кассете, которая размещена в каждом гене-мишени.

Настоящее изобретение позволяет любому терапевтическому белку, ген которого может быть доставлен в организм (например, эритропоэтин (ЕРО) или терапевтическое антитело), вырабатываться организмом при доставке активирующего лиганда. Этот способ доставки терапевтического белка может заменить производство таких терапевтических белков вне организма, которые затем вводят путем инъекции или инфузии, например, антител, используемых при раке или для блокирования воспалительного или аутоиммунного заболевания. Организм, содержащий регулируемый ген-мишень, становится фабрикой по производству биологических веществ, которая включается при введении лиганда, специфичного для гена.

Уровни и сроки дозирования терапевтического белка могут быть важны для достижения терапевтического эффекта. Например, при доставке АВАСТИНА (антитело против VEGF) при раке. Настоящее изобретение повышает легкость дозирования в случае необходимости внесения изменений при контроле за уровнем терапевтического белка и его влиянием.

В одном варианте осуществления ген-мишень может кодировать нуклеазу, которая может нацеливать и редактировать определенную последовательность ДНК. Такие нуклеазы включают Cas9, нуклеазы, содержащие цинковые пальцы, или TALEN. В случае этих нуклеаз, они могут потребоваться только в течение короткого периода времени, которого достаточно для редактирования эндогенных генов-мишеней. Однако, если в организм доставляется нерегулируемый ген нуклеазы, этот белок может присутствовать в течении всего жизненного цикла клетки. Более длительное присутствие нуклеаз, в случае их использования, возрастает риск нецелевого

редактирования. В качестве преимущества регуляция экспрессии таких белков имеет значительно более высокую безопасность. В этом случае вектор, содержащий ген-мишень нуклеазы, содержащий регуляторную кассету, может быть доставлен в соответствующие клетки организма. Ген-мишень находится в выключенном состоянии при отсутствии лиганда, специфичного для кассеты, поэтому нуклеаза не продуцируется. Нуклеаза продуцируется только в случае введения активирующего лиганда. По истечении достаточного промежутка времени, достаточного для осуществления редактирования, лиганд будет извлечен и более не вводиться. Таким образом, после этого ген нуклеазы находится в «выключенном» состоянии и в дальнейшем нуклеаза не продуцируется, с последующим прекращением редактирования. Этот подход может использоваться для коррекции генетических состояний, включая ряд наследственных ретинопатий, такой как LCA10, вызванной мутациями в CEP290 и болезнь Старгардта, вызванной мутациями в ABCA4.

Введение регулируемого гена-мишени, кодирующего терапевтический белок, который активируется только при введении специфического лиганда, может использоваться для регуляции терапевтических генов с целью лечения различных типов заболеваний, например рака с помощью терапевтических антител, иммунных нарушений с помощью иммуномодулирующих белков или антител, метаболических заболеваний, редких заболеваний, таких как PNH с помощью антител против C5 или фрагментов антител в качестве регулируемого гена, или глазного ангиогенеза с помощью терапевтических антител и сухой AMD с помощью иммуномодулирующих белков.

Широкое разнообразие специфических генов-мишеней, позволяющих лечить самые разнообразные специфические заболевания и состояния, являются подходящими для использования по настоящему изобретению. Например, инсулин или его аналог (предпочтительно человеческий инсулин или его аналог) можно использовать в качестве гена-мишени для лечения диабета I типа, диабета II типа или метаболического синдрома; гормон роста человека может использоваться в качестве гена-мишени для лечения детей с нарушениями роста или взрослых с дефицитом гормона роста; эритропоэтин (предпочтительно человеческий эритропоэтин) можно использовать в качестве гена-мишени для лечения анемии, вызванной хроническим заболеванием почек, анемии, вызванной миелодисплазией, или анемии, вызванной химиотерапией при лечении рака.

В частности, настоящее изобретение может быть подходящим для лечения заболеваний, вызванных дефектами одного гена, такими как муковисцидоз, гемофилия, мышечная дистрофия, талассемия или серповидноклеточная анемия. Таким образом,

человеческий  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - или  $\zeta$ -глобин можно использовать в качестве гена-мишени для лечения  $\beta$ -талассемии или серповидноклеточной анемии; человеческий фактор VIII или фактор IX можно использовать в качестве гена-мишени для лечения гемофилии A или гемофилии B.

Лиганды, используемые по настоящему изобретению, обычно объединяют с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями для образования фармацевтических композиций, подходящих для введения пациенту. Фармацевтически приемлемые носители включают растворители, связующие вещества, разбавляющие вещества, разрыхлители, смазывающие вещества, дисперганты, покрывающие вещества, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие абсорбцию агенты и т. д., обычно используемые в фармацевтической области техники. Фармацевтические композиции могут быть в форме таблеток, пилюль, капсул, троше и т. д., и составлены таким образом, чтобы они были совместимы с предполагаемым путем введения. Примеры путей введения включают парентеральный, например, внутривенный, внутрикожный, интраназальный, подкожный, пероральный, ингаляционный, трансдермальный (местный), трансмукозальный и ректальный.

Фармацевтические композиции, содержащие лиганды, вводят пациенту по схеме дозирования таким образом, чтобы количество лиганда было достаточным для требуемого регулирования гена-мишени, который доставляется пациенту. Когда лиганд представляет собой малую молекулу, а лекарственная форма представляет собой таблетку, капсулу и т. д., предпочтительно, чтобы фармацевтическая композиция содержала 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 до 500 мг лиганда; или от 10 до 250 мг лиганда.

Фармацевтические композиции могут дозироваться один или несколько раз в день (например, 2, 3, 4, 5 или более раз в день). В качестве альтернативы, фармацевтические композиции могут дозироваться реже чем один раз в день, например, один раз каждые 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 дней, один раз в месяц или один раз в несколько месяцев. В некоторых вариантах осуществления по настоящему изобретению фармацевтические композиции могут вводиться пациенту только несколько раз, например, один раз, два раза, три раза и т. д.

Настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, нуждающегося в регулируемой экспрессии терапевтического белка, кодируемого геном-мишенью. Способ включает введение пациенту фармацевтической композиции, содержащей лиганд для аптамера, где пациенту ранее вводили рекомбинантный вектор, содержащий ген-мишень, где ген-мишень содержит кассету для регуляции гена по настоящему

изобретению, которая обеспечивает возможность регуляции экспрессии гена-мишени при помощи лиганда для аптамера путем обеспечения доступности одного или нескольких сигналов полиаденилирования. Введение лиганда повышает экспрессию терапевтического белка.

### **Изделия и наборы**

Также предусмотрены наборы или изделия для использования в способах, описанных в настоящем документе. В аспектах настоящего изобретения наборы содержат композиции, описанные в настоящем документе (например, композиции для доставки вектора, включающая ген-мишень, содержит кассету для регуляции гена), в подходящей упаковке. Подходящая упаковка для композиций (таких как глазные композиции для инъекций), описанных в настоящем документе, известна в данной области техники и включает, например, пробирки (такие как герметичные пробирки), сосуды, ампулы, флаконы, баночки, гибкую упаковку (например, герметичная майларовая пленка или полиэтиленовые пакеты) и т. д. Данные изделия могут быть дополнительно стерилизованы и/или герметично запечатаны.

Настоящее изобретение также предусматривает наборы, содержащие композиции, описанные в настоящем документе, и может дополнительно содержать инструкцию(инструкции) о способах использования композиции, которые описаны в настоящем документе. Наборы, описанные в настоящем документе, могут дополнительно включать требуемые с коммерческой и пользовательской точки зрения и другие материалы, включая другие буферы, разбавляющие вещества, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши в упаковку с инструкциями по способам введения, включая, например, любые способы, описанные в настоящем документе. Например, в некоторых вариантах осуществления набор содержит гAAV для экспрессии гена-мишени, включающий кассету для регуляции гена по настоящему изобретению, фармацевтически приемлемый носитель, подходящий для инъекции, и одно или несколько из: буфер, разбавляющее вещество, фильтр, иглу, шприц и вкладыш в упаковку с инструкциями по способам выполнения инъекций. В некоторых вариантах осуществления набор подходит для внутриглазной инъекции, внутримышечной инъекции, внутривенной инъекции и т. д.

«Гомология» и «гомологичный» в контексте настоящего документа относятся к проценту идентичности между двумя полинуклеотидными последовательностями или между двумя полипептидными последовательностями. Соответствие между одной последовательностью и другой может быть определено способами, известными в данной области техники. Например, гомология может быть определена путем прямого

сравнения двух полипептидных молекул путем выравнивания информации, заложенной в последовательности, и использования легкодоступного программного обеспечения. Две полинуклеотидные или две полипептидные последовательности являются «практически гомологичными» друг другу, когда после оптимального выравнивания с соответствующими вставками или делециями, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% и, по меньшей мере приблизительно 95% нуклеотидов или аминокислот, соответственно, совпадают по протяжению определенной длины молекулы, как это определено с использованием описанных выше методов.

«Процент идентичности последовательности» по отношению к ссылочной последовательности полипептида или нуклеиновой кислоты определяется как процент аминокислотных остатков или нуклеотидов в последовательности претендента, которые идентичны аминокислотным остаткам или нуклеотидам в ссылочной последовательности полипептида или нуклеиновой кислоты после выравнивания последовательностей и введения пропусков, если необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательностей. Выравнивание с целью определения процента идентичности последовательностей аминокислот или нуклеиновых кислот может быть достигнуто способами, известными специалисту в данной области техники, например, с использованием общедоступного программного обеспечения, включая программные обеспечения BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR).

Термин «полинуклеотид» или «нуклеиновая кислота» в контексте настоящего документа относится к полимерной форме нуклеотидов любой длины, является ли это рибонуклеотидом или дезоксирибонуклеотидом. Таким образом, данный термин включает без ограничения одно-, двух- или многоцепочечные ДНК или РНК, геномную ДНК, кДНК, ДНК-РНК-гибриды или полимер, содержащий пуриновые и пиримидиновые основания, или другие природные, химически или биохимически модифицированные, не природного происхождения или дериватизированные нуклеотидные основания.

Термин «гетерологичный» или «экзогенный» подразумевает материал, полученный из генотипически отличного объекта в отношении такового, с которым он сравнивается или в который он вводится или встраивается. Например, полинуклеотид, введенный техниками генной инженерии в клетку другого типа, представляет собой гетерологичный полинуклеотид (и при экспрессии может кодировать гетерологичный полипептид). Точно так же, клеточная последовательность (например, ген или его

часть), которая вставлена в вирусный вектор, представляет собой гетерологичную нуклеотидную последовательность по отношению к вектору.

Следует понимать и предполагать, что специалистом в данной области техники могут быть внесены вариации в принципы, раскрытые в настоящем изобретении, и предполагается, что такие модификации должны быть включены в объем настоящего изобретения. Последующие примеры дополнительно иллюстрируют настоящее изобретение, но их не следует истолковывать как каким-либо образом ограничивающие материалы в объем настоящего изобретения. Все ссылки, цитируемые в настоящем документе, включены в него посредством ссылки во всей своей полноте.

### **Примеры**

#### **Пример 1. Регуляция экспрессии гена-мишени посредством аптамеропосредованного изменения доступности поли(А) сигнального элемента ААТAAA.**

##### **Порядок проведения эксперимента:**

Плазмидные конструкции: Ген EGFP в векторе pEGFP-C1 (Clontech) заменяли кодирующей последовательностью гена люциферазы светлячка для получения вектора pFLuc-SV40, который содержит сигнальную последовательность раннего полиаденилирования SV40. Синтезировали сегмент ДНК (IDT), содержащий последовательности хрт-гуанинового аптамера, последовательности структуры эффекторной шпильки и поли(А) последовательности раннего полиаденилирования SV40. Синтезированные фрагменты ДНК расщепляли рестриктазами HpaI и MluI и клонировали в pFLuc-SV40, расщепленном при помощи HpaI и MluI. Сконструированные последовательности проверяли при помощи секвенирования ДНК (Genewiz).

Трансфекция и обработка аптамерным лигандом:  $3,5 \times 10^4$  клеток НЕК 293 высевали в 96-луночном планшете с плоским дном за день до трансфекции. Плазмидную ДНК (500 нг) добавляли в пробирку или 96-луночный планшет с U-образным дном. Отдельно реагент TransIT-293 (Mirus; 1,4 мкл) добавляли к 50 мкл среды opti-mem I (Life Technologies) и оставляли на 5 минут при комнатной температуре («КТ»). Затем 50 мкл данного разбавленного реагента для трансфекции добавляли к ДНК, перемешивали и инкубировали при КТ в течение 20 минут. После этого, 7 мкл данного раствора добавляли к клеткам в каждую лунку 96-луночного планшета. Через четыре часа после трансфекции отбирали старую и добавляли новую среду с (i) ДМСО (0,5%) или 500 мкМ гуанозиним; или (ii) NaOH (2 мМ) в качестве контрольного растворителя или 500 мкМ гуанином. Кратность индукции выражали как отношение активности люциферазы,

полученной в присутствии аптамерного лиганда, деленной на значение, полученное в отсутствие аптамерного лиганда.

Анализ люциферазы светлячка в культивируемых клетках: Через двадцать четыре часа после смены среды, планшеты извлекали из инкубатора и выдерживали их в течение нескольких минут на лабораторном столе для достижения ими комнатной температуры, после чего отбирали культуральную среду. Добавляли лизирующий буфер Glo (Promega, 100 мкл, КТ) и оставляли планшеты при комнатной температуре в течение по меньшей мере 5 минут. Затем содержимое лунок перемешивали с 50 мкл среды для тритурации, и 20 мкл каждого образца смешивали с 20 мкл реагента bright-glo (Promega), который был разбавлен до концентрации 10% буфером glo. Содержимое 96 лунок переносили в непрозрачный белый 384-луночный планшет. После 5-минутной инкубации при КТ измеряли люминесценцию с использованием устройства Tecan со временем считывания 500 мсек. Активность люциферазы выражали в виде среднего относительной световой единицы (RLU)  $\pm$  S.D.

Трансфекция и измерение флуоресценции GFP:  $3,5 \times 10^4$  клеток НЕК 293 высевали в 96-луночном планшете с плоским дном за день до трансфекции. Плазмидную ДНК (500 нг) добавляли в пробирку или 96-луночный планшет с U-образным дном. Отдельно реагент TransIT-293 (Mirus; 1,4 мкл) добавляли к 50 мкл среды Opti-mem I (Life Technologies) и оставляли на 5 минут при КТ. Затем к ДНК добавляли 50 мкл данного разбавленного реагента для трансфекции, перемешивали и инкубировали при КТ в течение 20 минут. После этого, 7 мкл данного раствора добавляли к клеткам в каждую лунку 96-луночного планшета. Интенсивность флуоресценции GFP измеряли с помощью планшет-ридера Tecan, используя длину волны возбуждения 484 нм, длину волны излучения 510 нм и ширину полосы возбуждения 5 нм. Интенсивность флуоресценции GFP выражали в виде значения, генерируемого GFP конструкциями, вычитаемого из значения, генерируемого клетками без трансфекции.

### **Результаты:**

Полиаденилированный хвост на 3' конце мРНК играет важную роль в стабильности мРНК, ядерном экспорте и эффективности трансляции. Для того, чтобы регулировать процесс полиаденилирования пре-мРНК, и тем самым регулировать экспрессию гена-мишени, были разработаны стратегии, которые модулируют доступность последовательности элементов полиаденилирования AATAAA (или ее близких вариантов), а также T или GT-богатой последовательности нисходящего элемента (DSE).

По одной стратегии (стратегия 1), как показано на фиг. 1a и 1b, используется шпилечная структура (эффекторная шпилька), в которой элемент сигнальной последовательности полиаденилирования ААТААА встроен в стебель структуры, образующей шпильку (эффекторная шпилька). 3'-конец аптамера соединяли с 5'-концом данной структуры, образующей шпильку, посредством поочередно меняющегося плеча стебля, которое содержит последовательность, комплементарную части 5' плеча аптамерного стебля и комплементарную части 3' плеча стержня эффекторной шпильки (см., например, фиг. 1a и 1b). В данной конфигурации, при отсутствии аптамерного лиганда, шпилечная структура блокирует элемент ААТААА, тем самым подавляя полиаденилирование и экспрессию гена. Однако в присутствии аптамерного лиганда, связывание аптамер/лиганд приводит к образованию аптамерного стебля Р1, тем самым нарушая шпилечную структуру, что приводит к высвобождению элемента ААТААА из заблокированного положения и последующей экспрессии гена. Таким образом, данная конфигурация генетических элементов формирует в рибопереключателе аптамерную чувствительность на наличие лиганда.

Данная стратегия была протестирована на хрт-гуаниновом аптамере с поли(А) последовательностью раннего полиаденилирования SV40, в которой было показано, что последовательность нисходящего элемента ААТААА в 3'-НТО SV40 является необходимой для полиаденилирования. Используя данную стратегию, было получено 4 конструкции, от АТА\_Gua\_1 до 4 (SEQ ID NO: 1–4), каждая из которых имела одинаковую последовательность хрт-гуанинового аптамера, связанную с 5'-концом шпилечной структуры эффекторной шпильки и последовательностью элемента ААТААА, которая была встроена в стебель шпилечной структуры эффекторной шпильки. Было предоставлено целесообразное обоснование, что длина и состав последовательности стебля в шпилечной структуре могут влиять на ее стабильность, и таким образом на доступность заблокированного элемента ААТААА с целью экспрессии генов. Следовательно, создавали стебли, содержащие 9, 10, 12 и 14 пар оснований (п.о.), соответственно в каждой из конструкций. Аптамерный стебель Р1 содержал 8 п.о. Как показано на фиг. 1с, при отсутствии аптамерного лиганда гуанозина активность люциферазы была приблизительно одинаковой у всех конструкций и ниже, чем у контрольной конструкции рFLuc-SV40 (данные не показаны), что указывает на то, что элемент ААТААА блокируется шпилечной структурой. После обработки гуанозином, каждая конструкция показала повышенную активность люциферазы по сравнению с образцами, обработанными ДМСО (контроль), при этом АТА\_Gua\_1 вызывала 6,7-кратную индукцию.

Эти конструкции были дополнительно протестированы с использованием гуанина в качестве аптамерного лиганда. Как показано на фиг. 1d, без обработки гуанином базальный уровень экспрессии конструкциями АТА\_Gua\_1-4 был сниженным, причем АТА\_Gua\_4 имела самый низкий уровень базальной экспрессии (16% от контрольного вектора рFLuc). После обработки гуанином экспрессия люциферазы увеличивалась по сравнению с образцами, не обработанными гуанином, вызывая приблизительно 2,5-кратную индукцию для всех конструкций.

Эти конструкции, содержащие рибопереключателю (стратегия 1), также использовались для регуляции экспрессии GFP. Конструкции АТА\_Gua\_2 и 4, которые имеют относительно более низкие базальные уровни экспрессии гена люциферазы (фиг. 1c, 1d), были использованы для получения конструкций рEGFP\_АТА\_Gua\_2 и 4. Как представлено на фиг. 1e, без обработки гуанином экспрессия GFP была сниженной по сравнению с конструкцией рEGFP-C1. Обработка гуанином приводила к увеличению экспрессии GFP в 1,5 и 1,6 раза (для конструкций АТА\_Gua\_2 и АТА\_Gua\_4, соответственно). При этом, контрольная конструкция не характеризовалась увеличением экспрессии GFP в ответ на обработку гуанином.

Эти данные демонстрируют, что в рибопереключателе аптамерная чувствительность на наличие лиганда у млекопитающих является эффективной для регуляции экспрессии гена-мишени путем изменения доступности элемента сигнальной последовательности полиаденилирования в шпилечной структуре посредством соседнего аптамера. Кратность индукции может быть улучшена путем снижения базального уровня экспрессии и увеличением индукции экспрессии гена-мишени конструкцией, путем оптимизации длины и последовательности аптамерного стебля Р1 и стебля в структуре эффекторной петли. В этой протестированной конфигурации генетических элементов, использовали гуаниновый аптамер и раннюю последовательность поли(А) SV40. Подобные стратегии могут быть использованы для получения рибопереключателю, используя различные аптамеры для изменением различных последовательностей поли(А), включая синтетические последовательности поли(А).

**Пример 2. Изменение экспрессии гена-мишени аптамер/лиганд-опосредованным полиаденилированием посредством доступности последовательности нисходящего элемента.**

**Порядок проведения экспериментов:**

как описано в Примере 1.

**Результаты:**

Другая стратегия (стратегия 2) была разработана для изменения полиаденилирования посредством изменения доступности T или GT-богатой последовательности нисходящего элемента (DSE). В данной стратегии, как показано на фиг. 2а, создавали шпилечную структуру, в которой последовательность DSE была встроена в стебель шпилечной структуры эффекторной шпильки. Аптамерную последовательность связывали с 3'-концом шпилечной структуры, за которой следовала комплементарная ей последовательность 3' плеча шпилечной структуры. В данной конфигурации, при отсутствии аптамерного лиганда, шпилечная структура блокирует последовательность DSE, ингибируя полиаденилирование, и тем самым подавляя экспрессию гена. Однако, в присутствии аптамерного лиганда связывание аптамер/лиганд приводит к образованию аптамерного стебля P1, нарушая структуру эффекторной шпильки и высвобождая последовательность DSE из заблокированного положения, и тем самым способствуя экспрессии гена. Таким образом, аналогично стратегии, продемонстрированной в примере 1, данная конфигурация генетических элементов формирует в рибопереключателе аптамерную чувствительность на наличие лиганда.

Данная стратегия была протестирована на xrt-гуаниновом аптамере с поли(A) последовательностью раннего полиаденилирования SV40, в которой было показано, что последовательность DSE вместе с элементом AATAAA в 3'-НТО SV40 отвечает за полиаденилирование пре-мРНК. Используя данную стратегию, было получено 4 конструкции, от DSE\_Gua\_1 до 4 (SEQ ID NO: 5-8), каждая из которых имела одинаковую последовательность xrt-гуанинового аптамера, связанную с 3'-концом шпилечной структуры, в стебель которой была встроена последовательность DSE. Было предоставлено целесообразное обоснование того, что длина и состав последовательности стебля в шпилечной структуре могут влиять на стабильность шпилечной структуры, и таким образом на доступность заблокированной последовательности DSE с целью экспрессии гена. Следовательно, создавали стебли, содержащие 9, 10, 12 и 14 пар оснований (п.о.), соответственно в каждой из этих конструкций. В этих конструкциях использовали аптамерный стебель P1, содержащий 8 или 9 п.н. Как показано на фиг. 2b, без аптамерного лиганда гуанозина активность люциферазы была приблизительно аналогичной таковой, для конструкций DSE\_Gua\_1-3, причем для DSE\_Gua\_4 она была самой низкой, и даже более низким, чем у контрольной конструкции pFLuc-SV40 (данные не показаны), что указывает на то, что элемент DSE заблокирован шпилечной структурой при отсутствии аптамерного лиганда. Тогда как после обработки гуанозином каждая конструкция показала

повышенную активность люциферазы по сравнению с образцами, обработанными ДМСО, где DSE\_Gua\_2, например, вызывая 3,7-кратную индукцию.

Эти конструкции также были протестированы с использованием гуанина в качестве аптамерного лиганда. Как показано на фиг.2с, без обработки гуанином активность люциферазы была сниженной на приблизительно 68% в отношении конструкций DSE\_Gua\_1-3 и на 80% в отношении конструкции DSE\_Gua\_4 по сравнению с контрольной конструкцией рFLuc. В присутствии гуанина экспрессия люциферазы увеличивалась примерно в 2,4 раза у всех конструкций по сравнению с образцами, которые не обрабатывались гуанином. Кратность индукции может быть улучшена путем снижения базального уровня экспрессии и увеличением индукции экспрессии гена-мишени конструкцией, путем оптимизации длины и последовательности стебля в шпилечной структуре, а также путем оптимизации длины и последовательности аптамерного стебля P1. Эти данные дополнительно демонстрируют формирование в рибопереключателе аптамерной чувствительности на наличие лиганда у млекопитающих, которая регулирует экспрессию гена путем изменения доступности последовательности элемента полиаденилирования посредством аптамера. В данной протестированной конфигурации генетических элементов, использовали гуаниновый аптамер и раннюю последовательность поли(A) SV40. Подобные стратегии могут быть использованы для получения рибопереключателей, содержащих различные аптамеры для изменения различных последовательностей поли(A), включая синтетические последовательности поли(A).

**Пример 3. Использование гуанинового аптамера для изменения доступности элементов в синтетической последовательности поли(A), лежащих в 3'-НТО.**

**Порядок проведения эксперимента:**

как описано в Примере 1.

**Плазмидная конструкция:**

Были синтезированы фрагменты ДНК (IDT), содержащие последовательности для синтетического поли(A) (SPA) (Levitt, N. et al., Definition of an efficient synthetic poly(A) site, Genes & Development. 1989; 3: 1019-1025, включенная в настоящий документ посредством ссылки), или SPA из рGLuc-Basic\_2 (NEB), называемой в настоящем документе как mtSPA, или для последовательностей хрт-гуанинового аптамера, шпилечной структуры и синтетического поли(A). Синтезированные фрагменты ДНК расщепляли при помощи рестриктаз XhoI и NheI и клонировали в конструкции Con8, расщепленной при помощи XhoI и XbaI для получения Con8-SPA (SEQ ID NO: 9), SPA\_ATA\_Gua (SEQ ID NO: 10), SPA\_DSE\_Gua (SEQ ID NO: 11),

mtCon8-SPA (SEQ ID NO: 12) и mtSPA\_ATA\_Gua (SEQ ID NO: 13). Сконструированные последовательности проверяли при помощи секвенирования ДНК (Genewiz).

Трансфекция, обработка аптамерным лигандом и анализ люциферазы в культивируемых клетках: как описано в примере 1.

### **Результаты:**

Регуляция экспрессии гена-мишени посредством аптамер-опосредованного изменения доступности последовательности поли(А) SV40 продемонстрирована в Примерах 1 и 2. Опосредованное аптамером полиаденилирование также тестировали при использовании синтетической последовательности поли(А) (SPA). Используя такую же стратегию, которая продемонстрирована в примере 1, получали конструкцию SPA\_ATA\_Gua с последовательностью хрт-гуанинового аптамера, который был связан с 5'-концом шпилечной структуры и последовательностью элемента ААТААА в синтетической последовательности поли(А), встроенной в стебель шпилечной структуры. Конструкция SPA\_DSE\_Gua также была получена используя стратегию, продемонстрированную в примере 2. Как показано на фиг. 3, без обработки гуанином связывание шпилечной структуры и хрт-гуанинового аптамера не приводило к снижению активности люциферазы в конструкции SPA\_ATA\_Gua, что свидетельствует о неэффективном блокировании последовательности элемента ААТААА в шпильке, находящейся в синтетической последовательности поли(А). Чтобы решить эту проблему была использована другая последовательность SPA (mtSPA), которая имеет разницу в 2 нуклеотида, но демонстрирует такую же функциональность по сравнению с Con8-SPA. Чтобы усилить стебель, в него было добавлено 2 пары оснований GC, что вместе с 7 нуклеотидами последовательности поли(А) и комплементарной ее последовательности приводило к образованию стебеля из 9 п.н. С использованием данной конструкцией mtSPA\_ATA\_Gua, базальный уровень экспрессии по показателю активности люциферазы был снижен по сравнению с mtCon8-SPA при отсутствии обработки гуанином. При этом, при обработке гуанином активность люциферазы была слегка повышена в 1,7 раза по сравнению с образцами, не обрабатываемыми гуанином. В конструкции SPA\_DSE\_Gua последовательность хрт-гуанинового аптамера связывали с 3'-концом шпилечной структуры и с последовательностью DSE, встроенной в стебель шпилечной структуры. Как показано на фиг. 3, обработка гуанином усиливала активность люциферазы в конструкции SPA\_DSE\_Gua в 1,9 раза по сравнению с образцами, не обрабатываемыми гуанином. Эти результаты демонстрируют регулируемость экспрессии гена-мишени путем изменения доступности элементов последовательности поли(А).

**Пример 4. Изменение последовательности петли шпилечной структуре для повышения регулируемости рибопереклювателя на основе поли(А).**

**Порядок проведения эксперимента:**

как описано в Примере 1.

**Результаты:**

Для всех конструкций, которые имеют аптамеры и шпилечные структуры, связанные с последовательностями поли(А) по примерам 1 и 2, базальный уровень экспрессии люциферазы снижается до 20-45% от контрольного вектора. И хотя уровень индуцированной экспрессии гена-мишени максимально достигает 80% от контрольной конструкции, кратность индукции базального уровня экспрессии все же в результате остается ниже. Чтобы уменьшить базальную экспрессию, шпилечные структуры могут быть усилены или стабилизированы для эффективного блокирования последовательности элементов AATAAA или DSE в отсутствие связывания аптамер/лиганд. Чтобы усилить стабильность шпилечной структуры, было протестировано влияние состава последовательности петли в шпилечной структуре на базальный уровень экспрессии гена люциферазы. Последовательность петли GAAA в ATA\_Gua\_1 была заменена более стабильной последовательностью петли TTCG (V.P. Antao, S. Y. Lai and I. Tinoco, A thermodynamic study of unusually stable RNA and DNA hairpins. *Nucleic Acids Research*. 1991; 19(21):5901-5905), получая конструкцию Stbl\_ATA\_Gua\_1 (SEQ ID NO: 14). Как показано на фиг. 4, по сравнению с ATA\_Gua\_1, Stbl\_ATA\_Gua\_1 демонстрировала более низкую активность люциферазы без обработки гуанином, что указывает на улучшенное блокирование сигнала AATAAA. При этом, в случае обработки гуанином активность люциферазы, индуцированной конструкцией Stbl\_ATA\_Gua\_1, была аналогична с используемой конструкцией ATA\_Gua\_1, таким образом вызывая более высокую кратность индукции. В то же время, конструкция, содержащая петлю GAAT, gaat\_ATA\_Gua\_1 (SEQ ID NO: 15), демонстрировала более высокий базальный уровень экспрессии люциферазы, чем конструкция ATA\_Gua\_1 или stbl\_ATA\_Gua\_1, демонстрируя несколько меньшую кратность индукции чем у этих двух конструкций. Эти результаты показывают, что более эффективная регуляция гена-мишени может быть достигнута путем модификации шпилечной структуры.

**Пример 5. Одновременное изменение доступности AATAAA и DSE в последовательности поли(А), лежащей в 3'-НТО.**

**Порядок проведения эксперимента:**

Бала синтезирована последовательность, содержащая переключатели ATA\_Gua\_1 и DSE\_Gua\_1, и клонирована в векторе pFLuc, расщепленном при помощи рестриктаз HpaI и MluI, для получения конструкции ATA\_DSE\_Gua (SEQ ID NO: 16).

Трансфекция и анализ люциферазы в культивируемых клетках: как описано в примере 1.

#### **Результаты:**

**[0100]** Третья стратегия для регулирования экспрессии гена-мишени (стратегия 3), как показано на фиг. 5a, была разработана путем комбинирования стратегии 1 и стратегии 2, тем самым одновременно изменяя доступность последовательностей AATAAA и DSE. В этой конфигурации, при отсутствии аптамерного лиганда, последовательности AATAAA и DSE блокируются в шпилечных структурах, следовательно экспрессия гена подавляется. Каждая шпилечная структура связана с аптамерной последовательностью, которая может отвечать на одинаковые или разные молекулы лигандов. Одновременное блокирование обеих необходимых элементов в последовательности поли(A) может снизить базовый уровень экспрессии гена в отсутствие лиганда(лигандов). В присутствии аптамерного лиганда связывание аптамер/лиганд способствует образованию аптамерного стебля P1, разрушая шпилечные структуры и высвобождая последовательности AATAAA и DSE из заблокированного положения. В этой конфигурации ген может эффективно экспрессироваться только при наличии лигандов для обоих аптамеров, что потенциально позволяет более точно регулировать экспрессию гена-мишени.

Действительно, как показано на фиг. 5b, без обработки гуанином блокирование последовательностей AATAAA и DSE за счет шпилечной структуры (ATA\_DSE\_Gua) дополнительно снизило экспрессию люциферазы до 20% от контрольной конструкции pFLuc, тогда как ATA\_Gua\_1 и DSE\_Gua\_1 снижали экспрессию лишь на 45% и 35%, соответственно. В случае обработки гуанином активность люциферазы восстанавливалась с повышением примерно в 2,1 раза в образце ATA\_DSE\_Gua по сравнению с необработанными образцами, что указывает на более точную регуляцию гена.

**Пример 6. Комбинированное использование рибопереклювателя на основе поли(A) и второго рибопереклювателя для повышения регулируемости гена-мишени.**

#### **Порядок проведения эксперимента:**

Кассету с рибопереклювателем G15 (см. примеры 5 и 8, и SEQ ID NO.: 46 в патентной заявке WO 2016/126747, включенной в настоящий документ посредством

ссылки) или контрольную кассету без аптамера клонировали в рFLuc для получения рFLuc-G15 или рFLuc-Con1, используя стратегию клонирования «Golden Gate». Для создания конструкции рFLuc-G15\_ATA\_Gua фрагмент, содержащий гуаниновый аптамер, шпилечную структуру и последовательности поли(А) SV40, высвобождали из конструкции ATA\_Gua\_1 путем ее расщепления с использованием рестриктаз HpaI и MluI, и затем клонировали их в конструкции рFLuc-G15, расщепленной теми же рестриктазами.

Трансфекция и анализ люциферазы в культивируемых клетках: как описано в примере 1.

### **Результаты:**

Конструкции для экспрессии, содержащие рибопереклюатели ATA\_Gua и DSE\_Gua, также имеют базальный уровень экспрессии гена-мишени. Совместное использование этих переключателей, со вторым переключателем в тандеме, может ограничить базальную экспрессию и, следовательно, повысить регулируемость гена.

Чтобы продемонстрировать это, рибопереклюатель G15 был объединен с рибопереклюателем на основе поли(А). Рибопереклюатель G15, основанный на хрт-гуаниновом аптамере, модулирует механизм альтернативного сплайсинга и имеет некоторый базальный уровень экспрессии, что уменьшает кратность индукции в ответ на обработку аптамерным лигандом гуанином. Чтобы уменьшить базальный уровень экспрессии в конструкции рFLuc-G15, последовательность поли(А) была заменена на ATA\_Gua\_1, получая конструкцию рFLuc-G15-ATA\_Gua (фиг. 6а). Как показано на фиг. 6б, при отсутствии аптамерного лиганда (гуанина) базальный уровень экспрессии люциферазы конструкцией рFLuc-G15 существенно снижается по сравнению с контрольной конструкцией рFLuc-Con1. Конструкция с двумя переключателями рFLuc-G15-ATA\_Gua еще больше снизила базальный уровень экспрессии по сравнению с конструкцией рFLuc-G15. В случае обработки гуанином, уровень индуцированной активности люциферазы немного снижен, чем у конструкции рFLuc-G15, но такой же, как уровень индуцированной активности люциферазы у конструкции ATA\_Gua\_1, вызывающей более высокую кратность индукции, чем конструкциями ATA\_Gua\_1 и рFLuc-G15 (фиг. 6б).

Данные результаты демонстрируют, что более надежный переключатель может быть получен путем объединения в тандем двух переключателей, которые имеют более высокие уровни базальной экспрессии. Аптамеры в этом двойном переключателе могут быть одинаковыми или разными, которые связываются с одинаковыми или разными

лигандами, как это продемонстрировано в настоящем документе, или аптамерами, отвечающими на различные лиганды.

**Пример 7. Использование аденинового аптамера для изменения доступности элемента ААТААА в поли(А) последовательности, находящейся в 3'-НТО.**

**Порядок проведения эксперимента:**

**Плазмидная конструкция:**

Был синтезирован фрагмент ДНК (IDT), содержащий последовательности для аденинового аптамера ydhl-A (M. Mandal and R.R. Breaker, Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. Nature Structural & Molecular Biology. 2004; 11: 29-35, включенной в настоящий документ посредством ссылки), шпилечной структуры и ранних последовательностей поли(А) SV40. Синтезированные фрагменты ДНК расщепляли рестриктазами HpaI и MluI и клонировали в pFLuc-SV40, расщепленным при помощи HpaI и MluI. Сконструированные последовательности проверяли при помощи секвенирования ДНК (Genewiz).

Трансфекция и анализ люциферазы в культивируемых клетках: как описано в примере 1.

Через четыре часа после трансфекции отбирали старую и добавляли новую среду с NaOH (1 mM) или 1 mM аденином (Calbiochem). Кратность индукции выражали как отношение активности люциферазы, полученной в присутствии аптамерного лиганда, деленной на значение, полученное в отсутствии аптамерного лиганда.

**Результаты:**

Был исследован способ использования дополнительных пар аптамер/лиганд с целью контроля экспрессии гена-мишени. Используя такую же стратегию, которая продемонстрирована в примере 1, была вставлена шпилечная структура (стабильная TTSCG петля), в которой последовательность элемента ААТААА встроена в стебель, содержащий 9 п.н., шпилечной структуры. В 3'-НТО к 5'-концу этой шпилечной структуры была вставлена комплементарная последовательность 5' плеча шпилечной структуры, за которой следовала последовательность аденинового аптамера ydhl-A, тем самым получая конструкцию ATA\_Ydhl (SEQ ID NO: 17). В этой конструкции длина последовательности ydhl аптамерного стебля P1 составляет 10 п.н. Как показано на фиг. 7, без обработки аденином конструкция ATA\_Ydhl экспрессировала низкий уровень люциферазы, приблизительно 52% от контрольной конструкции pFLuc, предположительно, посредством блокирования доступности последовательности элемента ААТААА. В присутствии аденина экспрессия люциферазы увеличивалась по сравнению с образцами, которые не обрабатывали аденином, на приблизительно 82% от

контрольной конструкции рFLuc при обработке аденином. Обработка аденином увеличивала активность люциферазы в 2,5 раза в контрольной конструкции посредством механизма, не связанного с аптамером. Однако, конструкция АТА\_ydh1 вызвала 4,0-кратное увеличение экспрессии люциферазы, что указывает на эффект специфичности связывания аденин/аптамер.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Полинуклеотидная кассета для регуляции экспрессии гена-мишени, содержащая рибопереключател, где рибопереключател содержит эффекторную шпильку и аптамер, где эффекторный стебель содержит сигнал полиаденилирования, и где аптамер с эффекторной шпилькой связаны поочередно меняющимся плечом стебля, содержащим последовательность, которая комплементарна индивидуальному плечу аптамерного стебля и индивидуальному плечу эффекторной шпильки.

2. Полинуклеотидная кассета по п. 1, в которой аптамер связывается с низкомолекулярным лигандом.

3. Полинуклеотидная кассета по п. 1, в которой часть поочередно меняющегося плеча стебля, которая комплементарна последовательности плеча аптамерного стебля и последовательности плеча эффекторной шпильки содержит от 4 до 8 нуклеотидов, от 5 до 7 нуклеотидов, 5 нуклеотидов или 6 нуклеотидов.

4. Полинуклеотидная кассета по п. 1, в которой аптамерный стебель содержит от 6 до 12 пар оснований, от 7 до 10 пар оснований, 8 пар оснований или 9 пар оснований.

5. Полинуклеотидная кассета по п. 1, в которой стебель эффекторной шпильки содержит от 4 до 24 пар оснований, от 5 до 20 пар оснований, от 9 до 14 пар оснований, 9 пар оснований, 10 пар оснований, 11 пар оснований или 12 пар оснований.

6. Полинуклеотидная кассета по любому из пп. 1-5, в которой эффекторная шпилька расположена на 3'-конце аптамера таким образом, что поочередно меняющееся плечо стебля содержит всё или часть 3' плеча аптамерного стебля и всё или часть 5' плеча эффекторного стебля.

7. Полинуклеотидная кассета по п. 6, в которой сигнал полиаденилирования представляет собой ААТААА или АТТААА.

8. Полинуклеотидная кассета по любому из пп. 1-5, в которой эффекторная шпилька расположена на 5'-конце аптамера таким образом, что поочередно меняющееся плечо стебля содержит всё или часть 5' плеча аптамерного стебля и всё или часть 3' плеча

эффекторного стебля.

9. Полинуклеотидная кассета по п. 8, в которой сигнал полиаденилирования представляет собой нисходящий элемент (DSE).

10. Полинуклеотидная кассета, содержащая два рибопереключателя по пп. 1-5, в которой эффекторная шпилька первого рибопереключателя содержит весь или часть сигнала полиаденилирования ААТAAA или АТТAAA, а эффекторная шпилька второго рибопереключателя содержит весь или часть нисходящего элемента (DSE).

11. Полинуклеотидная кассета по п. 10, в которой каждый из двух рибопереключателей содержит аптамер, который связывает один и тот же лиганд.

12. Полинуклеотидная кассета по п. 10, в которой два рибопереключателя содержат разные аптамеры, которые связывают разные лиганды.

13. Способ изменения экспрессии гена-мишени, предусматривающий
- вставку одной или нескольких полинуклеотидных кассет по любому из пп. 1-5 в 3'-нетранслируемую область гена-мишени,
  - введение в клетку гена-мишени, содержащего полинуклеотидную кассету, и
  - воздействие на клетку лигандом, который связывается с аптамером в количестве, эффективном для увеличения экспрессии гена-мишени.

14. Способ по п. 13, в котором лиганд представляет собой малую молекулу.

15. Способ по п. 13, в котором эффекторная шпилька расположена на 3'-конце аптамера таким образом, что поочередно меняющееся плечо стебля содержит всё или часть 3' плеча аптамерного стебля и всё или часть 5' плеча эффекторного стебля.

16. Способ по п. 15, в котором сигнал полиаденилирования представляет собой ААТAAA или АТТAAA.

17. Способ по п. 13, в котором эффекторная шпилька расположена на 5'-конце аптамера таким образом, что поочередно меняющееся плечо стебля содержит всё или

часть 5' плеча аптамерного стебля и всё или часть 3' плеча эффекторного стебля.

18. Способ по п. 17, в котором сигнал полиаденилирования представляет собой нисходящий элемент (DSE).

19. Способ по п.13 или п. 14, в котором два рибопереключателѐ вставлены в 3'-НТО гена-мишени, где эффекторная шпилька первого рибопереключателѐ содержит весь или часть сигнала полиаденилирования ААТAAA или АТТAAA, а эффекторная шпилька второго рибопереключателѐ содержит весь или часть нисходящего элемента (DSE).

20. Способ по п. 19, в котором каждый из двух рибопереключателѐ содержит аптамер, который связывает один и тот же лиганд.

21. Способ по п. 19, в котором два рибопереключателѐ содержат разные аптамеры, которые связывают разные лиганды.

22. Способ по п. 19, в котором две или более полинуклеотидные кассеты содержат один и тот же аптамер.

23. Способ по любому из пп. 13-22, в котором ген-мишень, содержащий полинуклеотидную кассету, вставлен в вектор для экспрессии гена-мишени.

24. Способ по любому из пп. 13-22, в котором ген-мишень дополнительно содержит кассету для регуляции гена, которая изменяет экспрессию гена-мишени посредством аптамер-опосредованной регуляции альтернативного сплайсинга.

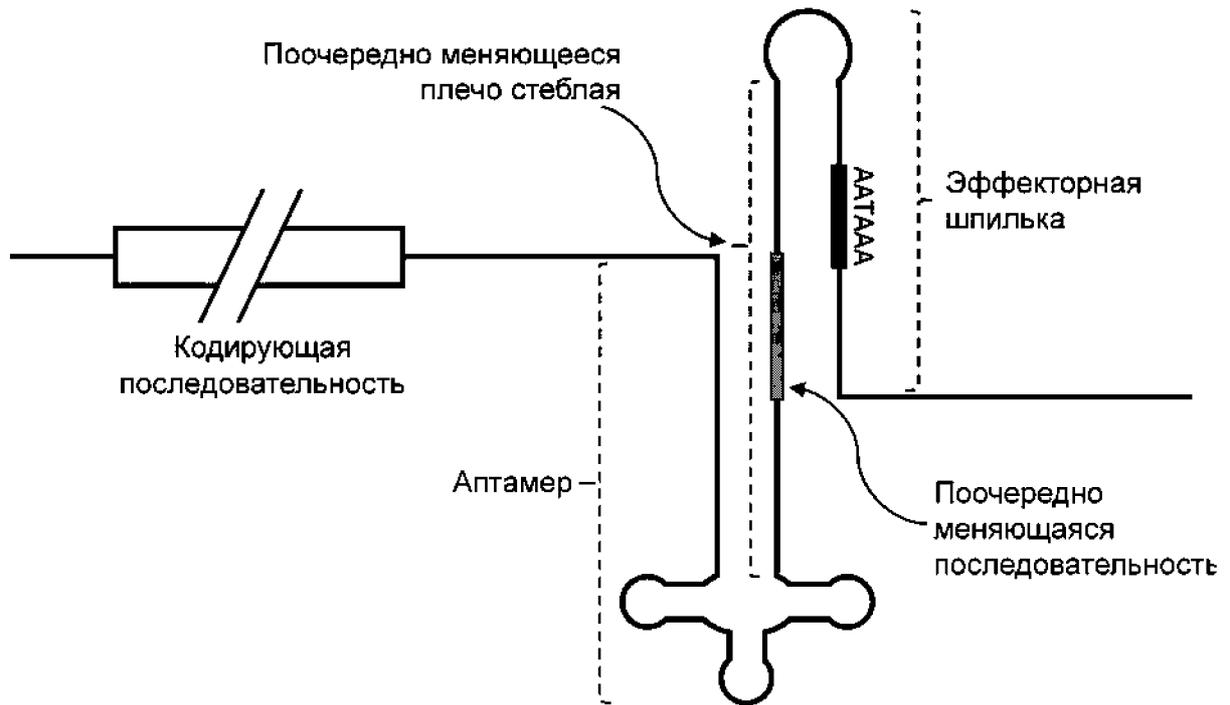
25. Способ по п. 23, в котором вектор представляет собой вирусный вектор.

26. Способ по п. 25, в котором вирусный вектор выбран из группы, состоящей из аденовирусного вектора, аденоассоциированного вирусного вектора и лентивирусного вектора.

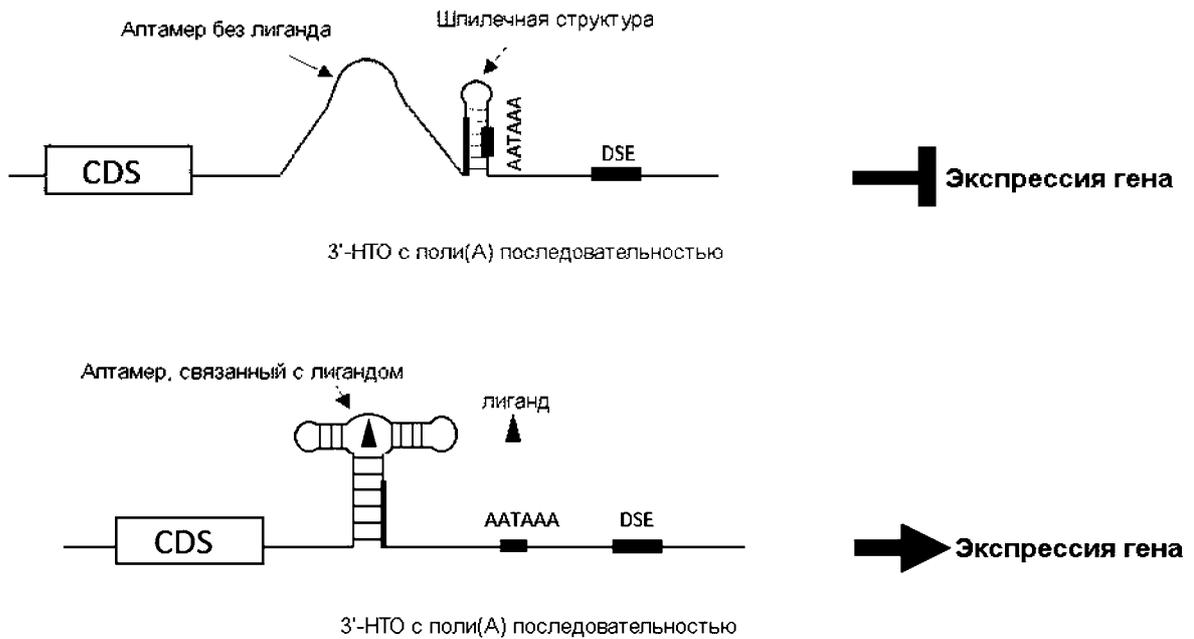
27. Вектор, содержащий ген-мишень, который содержит полинуклеотидную кассету по любому из пп. 1-12.

28. Вектор по п. 27, причем вектор представляет собой вирусный вектор.
29. Вектор по п. 28, причем вирусный вектор выбран из группы, состоящей из аденовирусного вектора, аденоассоциированного вирусного вектора и лентивирусного вектора.
30. Вектор по п. 27, который наряду с геном-мишенью дополнительно содержит кассету для регуляции гена, которая изменяет экспрессию гена-мишени посредством аптамер-опосредованной регуляции альтернативного сплайсинга.

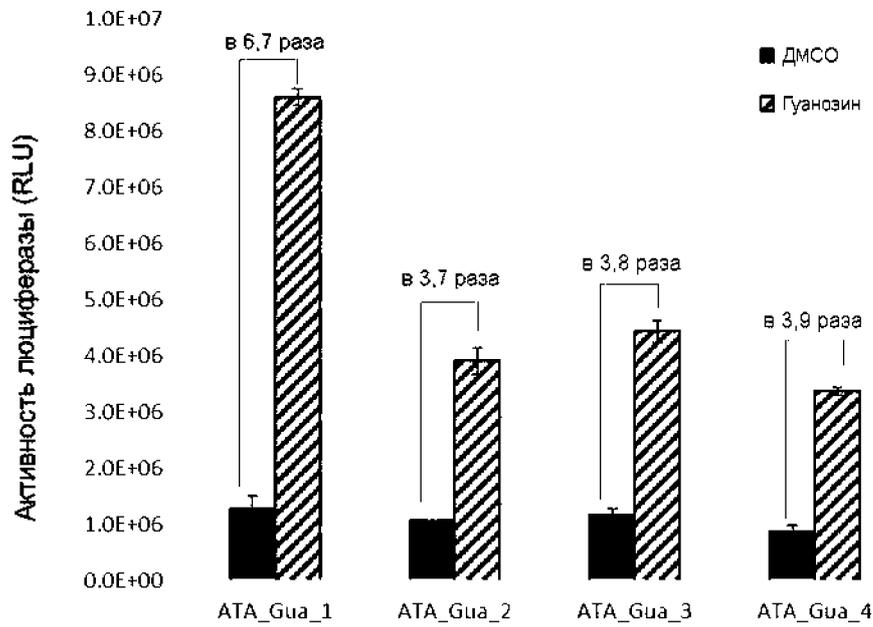
Фиг. 1а.



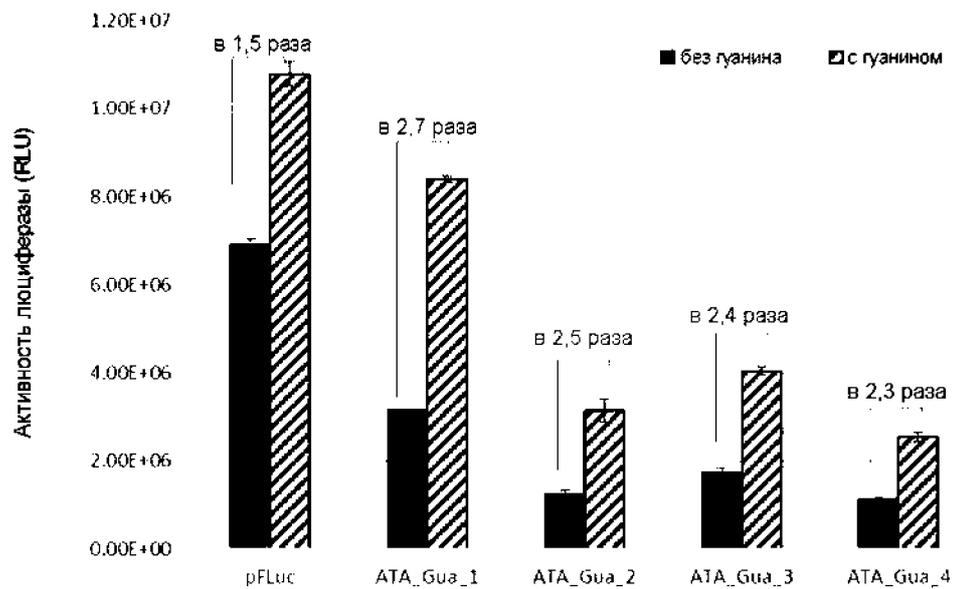
Фиг. 1б.



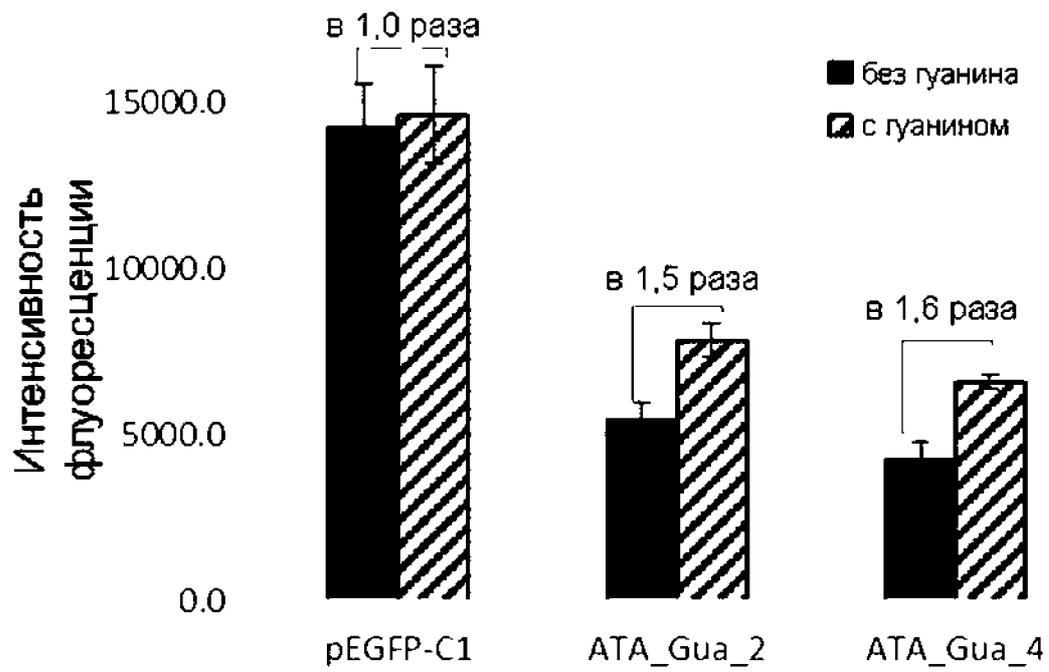
Фиг. 1с.



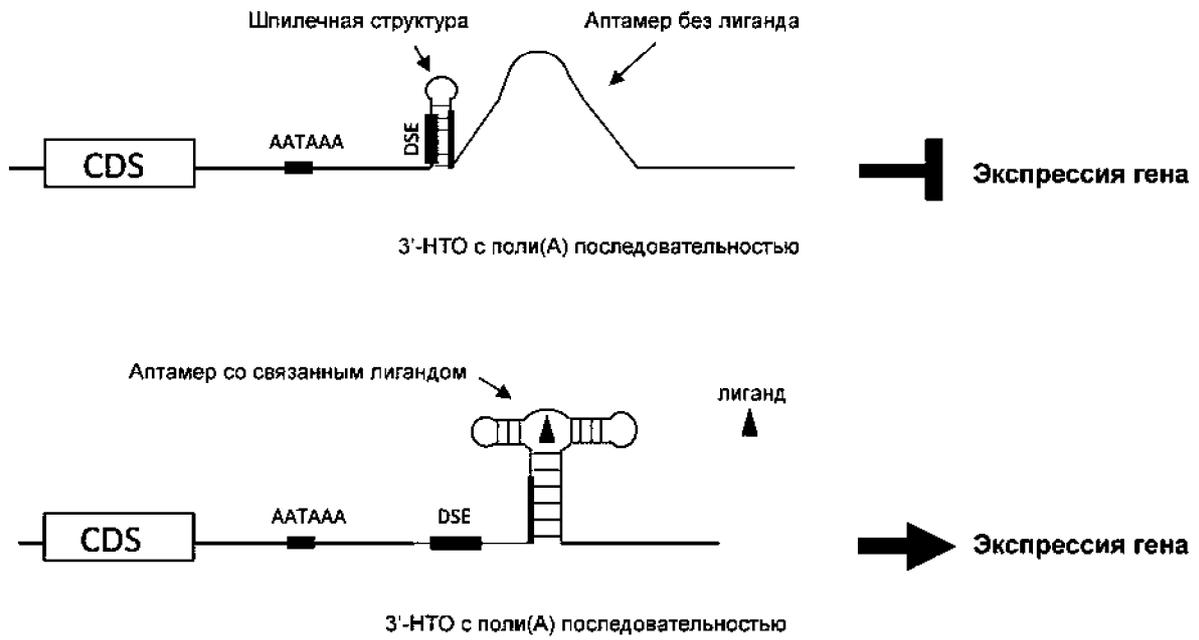
Фиг. 1d.



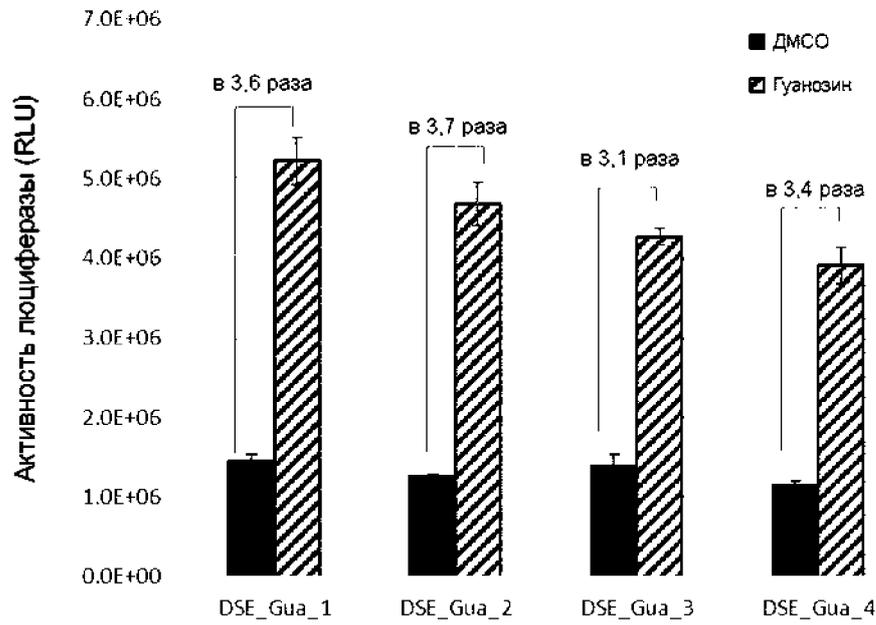
Фиг. 1е.



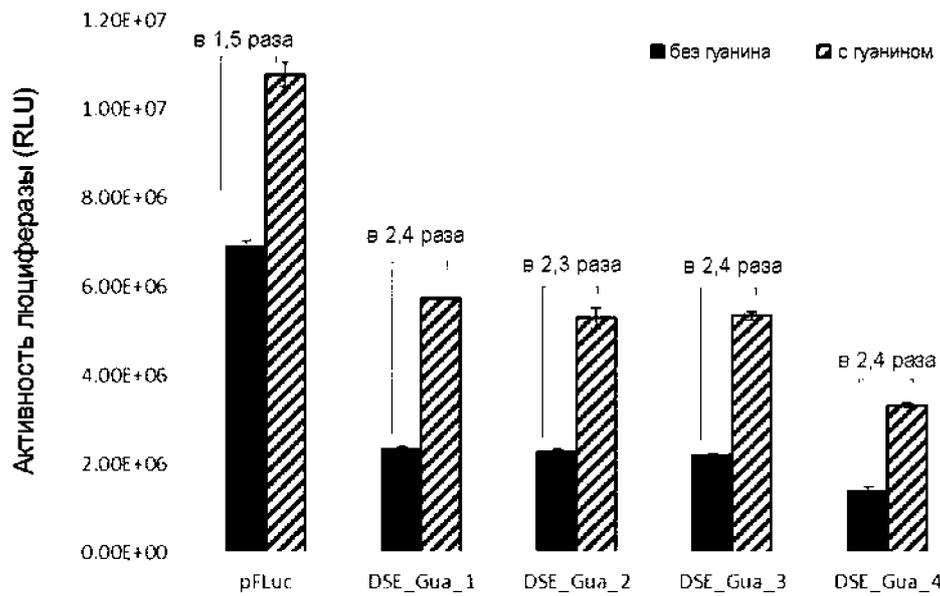
Фиг. 2а.



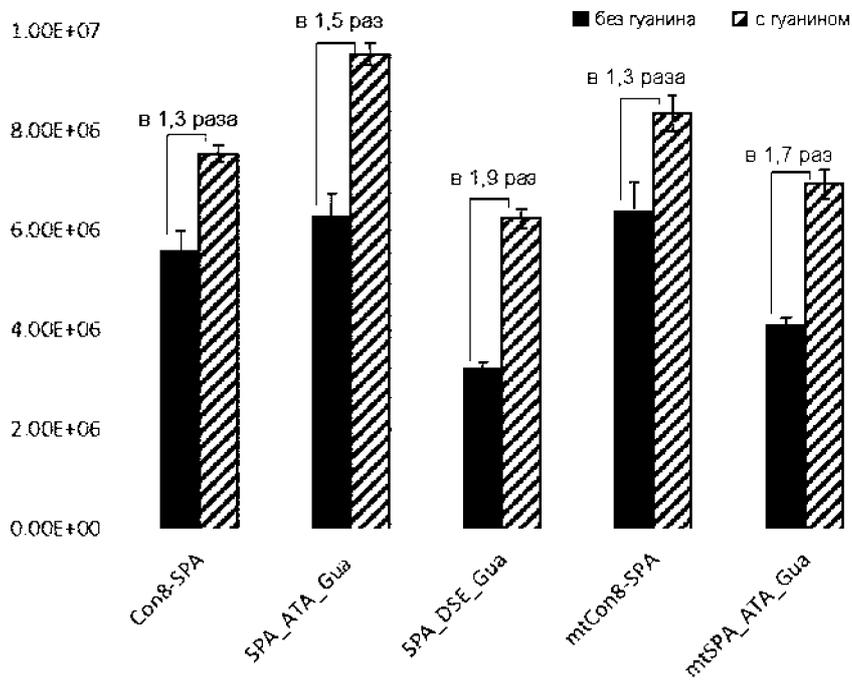
Фиг. 2b.



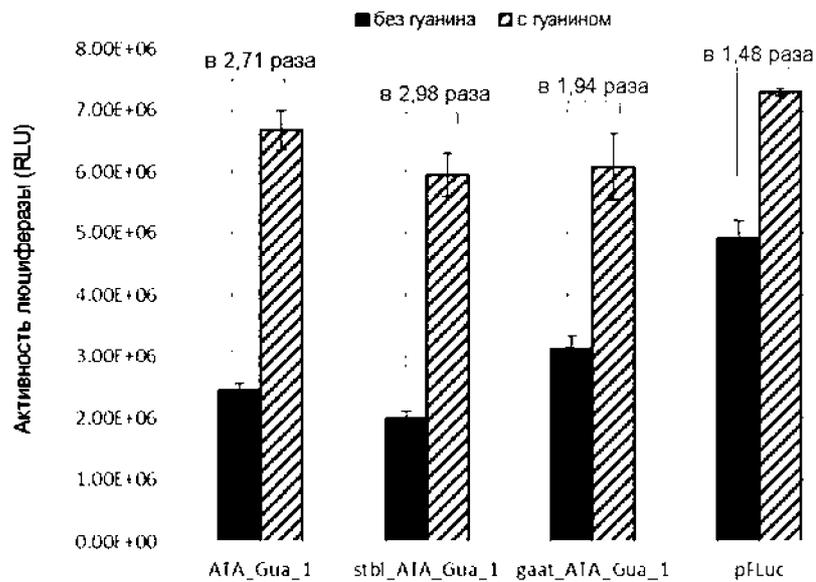
Фиг. 2с.



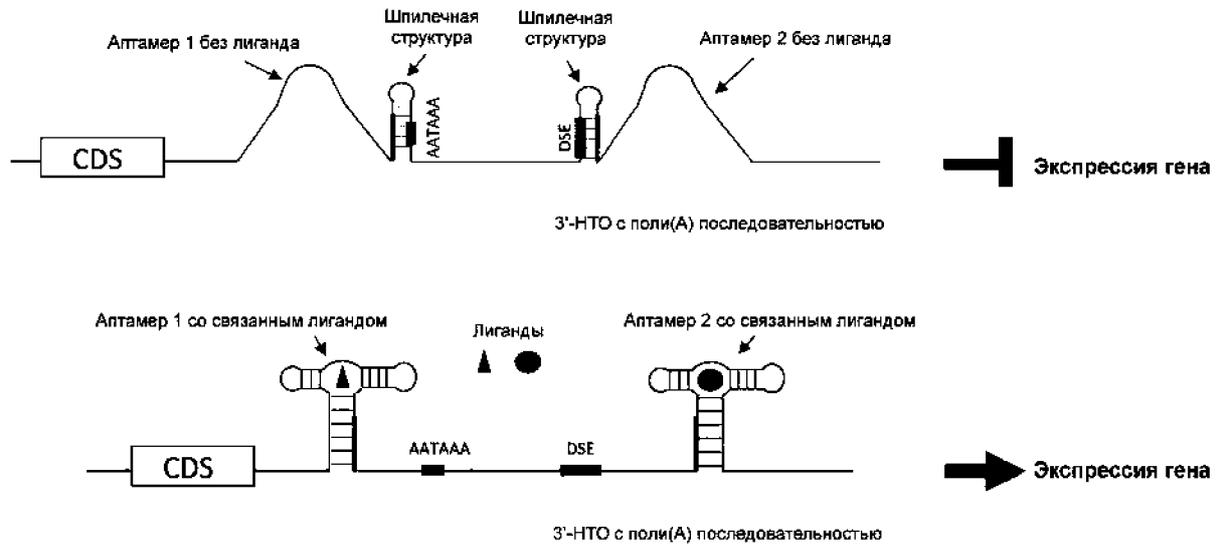
Фиг. 3.



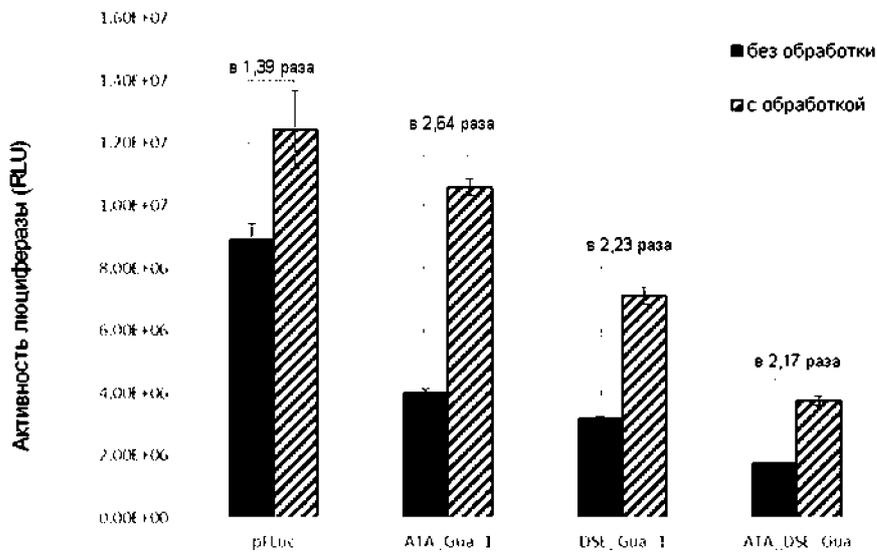
Фиг. 4.



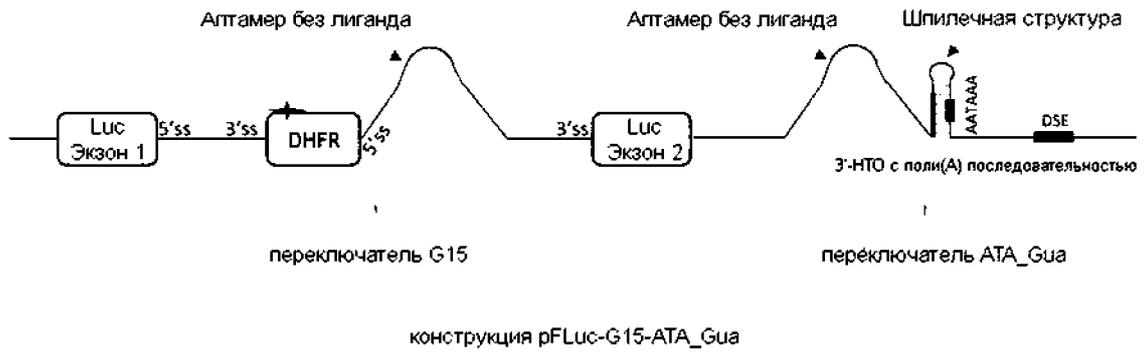
Фиг. 5а.



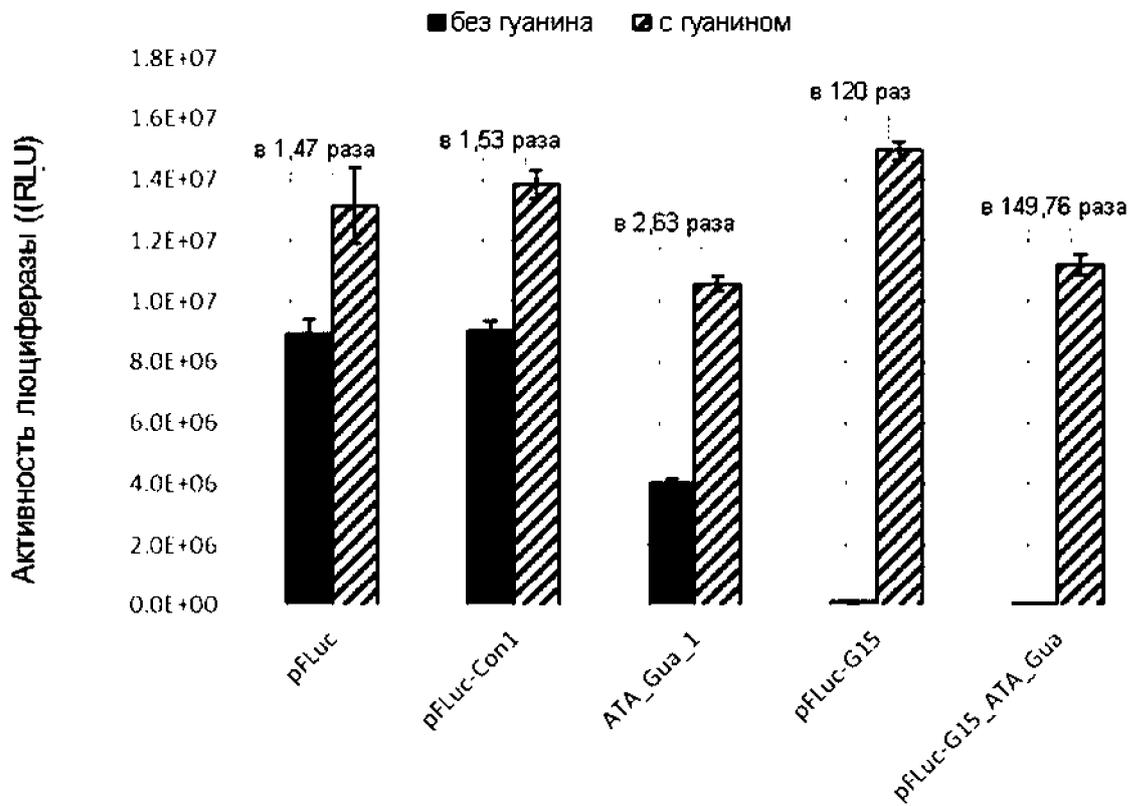
Фиг. 5б.



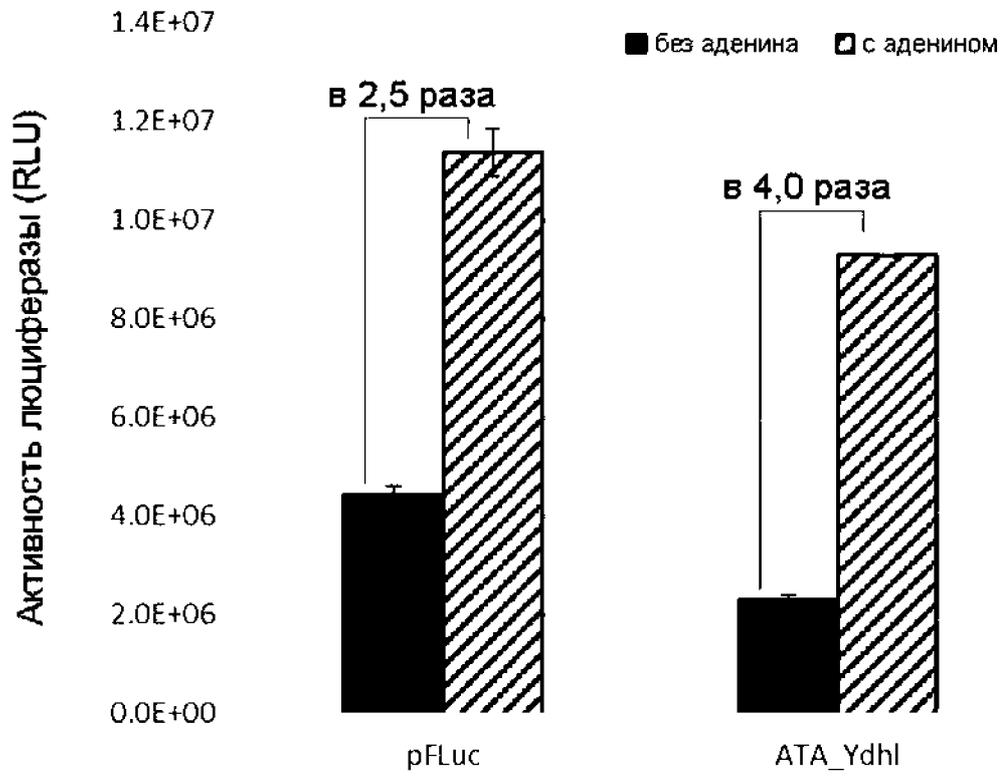
Фиг. 6а.



Фиг. 6б.



Фиг. 7.



Фиг. 8.

ATA\_Gua\_1 (SEQ ID NO: 1):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgccataccacattgtagaggtttacttgctttaa  
 aaacctcccacactccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattggtgtgtaactgtttattgcagcttataatggttacaataa  
 agcaatagcatcacaatttcaaggtataatcgctggatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaattgccgactacctta  
 ttcgaaagaataaagcattttttactgcattctagtgtggttgtccaaactcatcaatgtatcttaacgcgt

ATA\_Gua\_2 (SEQ ID NO: 2):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgccataccacattgtagaggtttacttgctttaa  
 aaacctcccacactccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattggtgtgtaactgtttattgcagcttataatggttacaataa  
 agcaatagcatcacaatttcacataaagcataatcgctggatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaattgccgactgctt  
 attcgaagaataaagcattttttactgcattctagtgtggttgtccaaactcatcaatgtatcttaacgcgt

ATA\_Gua\_3 (SEQ ID NO: 3):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgccataccacattgtagaggtttacttgctttaa  
 aaacctcccacactccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattggtgtgtaactgtttattgcagcttataatggttacaataa  
 agcaatagcatcacaatttataaagataatcgctggatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaattgccgactcttatt  
 gtgcgaaagcacaataaagcattttttactgcattctagtgtggttgtccaaactcatcaatgtatcttaacgcgt

ATA\_Gua\_4 (SEQ ID NO: 4):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgccataccacattgtagaggtttacttgctttaa  
 aaacctcccacactccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattggtgtgtaactgtttattgcagcttataatggttacaataa  
 agcaatagcatcacaattttaaagcaataatcgctggatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaattgccgactgcttatt  
 tgcgaaagcacaataaagcattttttactgcattctagtgtggttgtccaaactcatcaatgtatcttaacgcgt

DSE\_Gua\_1 (SEQ ID NO: 5):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgccataccacattgtagaggtttacttgctttaa  
 aaacctcccacactccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattggtgtgtaactgtttattgcagcttataatggttacaataa  
 agcaatagcatcacaatttcacaataaagcattttttactgcattctagtgtggttgtccgaaaggacaaaccataatcgctgga  
 tatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaattgccgactggttgtaactcatcaatgtatcttaacgcgt

DSE\_Gua\_2 (SEQ ID NO: 6):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgccataccacattgtagaggtttacttgctttaa  
 aaacctcccacactccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattggtgtgtaactgtttattgcagcttataatggttacaataa

agcaatagcatcacaatttcacaataaagcattttttcactgcattctagttgtggtttgtccgaaaggacaaaccaataatcgcggtg  
atatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaagtccgact/gtggllgaaactcatcaatgtatcttaacgcgt

DSE\_Gua\_3 (SEQ ID NO: 7):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgcataccacattgtagaggtttacttgctttaa  
aaacctcccacactccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgttgttaactgtttattgcagcttataatggttacaataa  
agcaatagcatcacaatttcacaataaagcattttttcactgcattctagttgtggtttgtccgaaaggacaaaccaataatcgcg  
ggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaagtccgact/gtggllgaaactcatcaatgtatcttaacgcgt

DSE\_Gua\_4 (SEQ ID NO: 8):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgcataccacattgtagaggtttacttgctttaa  
aaacctcccacactccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgttgttaactgtttattgcagcttataatggttacaataa  
agcaatagcatcacaatttcacaataaagcattttttcactgcattctagttgtggtttgtccgaaaggacaaaccaataatcg  
gtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaagtccgact/gtggllgaaactcatcaatgtatcttaacgcgt

Фиг. 8 (продолжение).

Con8-SPA (SEQ ID NO: 9):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgcatccaagcttatcgataccgtcgacctcgagg  
gcccagatctgcggccgaataaaagatcttttttcattagatctgtgtgtggtttttgtgtgtctagaataattcttactgtcat

SPA\_ATA\_Gua (SEQ ID NO: 10):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgcatccaagcttatcgataccgtcgacctcgagg  
gcccagatctgcggcaaaaggtataatcgcggtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaagtccgact/acctttattgg  
aaacaataaaagatcttttttcattagatctgtgtgtggtttttgtgtgtctagaataattcttact

SPA\_DSE\_Gua (SEQ ID NO: 11):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgcatccaagcttatcgataccgtcgacctcgagg  
gcccagatctgcggccgaataaaagatcttttttcattagatctgtgtgtggtttttgtgtgtcgaaagacacacaataataatcgcg  
ggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaagtccgact/gtggllgaaataattcttact

mtCon8-SPA (SEQ ID NO: 12):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgcatccaagcttatcgataccgtcgacctcgagg  
gcccagatctgcggccgaataaaataatcttttttcattacatctgtgtgtggtttttgtgtgtctagaataattcttact

mtSPA\_ATA\_Gua (SEQ ID NO: 13):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAggatccaagcttatcgataccgtcgacctcgagg  
gcccagatctgcggaaaaggtataatcgcgtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactacctttattgcg  
aaagcaataaaatatctttttttcattacatctgtgtgtgtgtgtgtgtgtctagaataaattcttact

Stbl\_ATA\_GUA\_1 (SEQ ID NO: 14):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgcataccacattttagaggttttacttgctttaa  
aaacctcccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgtgtgttaactgtttattgcagcttataatggttacaataa  
agcaatagcatcacaatttctaaaggtataatcgcgtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactaccttta  
tttcttcggaataaagcattttttcactgcattctagtgtgtgtgtgtccaaactcatcaatgtatcttaacgcgt

gaat\_ATA\_Gua\_1 (SEQ ID NO: 15):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgcataccacattttagaggttttacttgctttaa  
aaacctcccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgtgtgttaactgtttattgcagcttataatggttacaataa  
agcaatagcatcacaatttctaaaggtataatcgcgtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactaccttta  
tttcgaatgaaataaagcattttttcactgcattctagtgtgtgtgtgtccaaactcatcaatgtatcttaacgcgt

ATA\_DSE\_Gua (SEQ ID NO: 16):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgcataccacattttagaggttttacttgctttaa  
aaacctcccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgtgtgttaactgtttattgcagcttataatggttacaataa  
agcaatagcatcacaatttctaaaggtataatcgcgtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactaccttta  
tttcgaaagaaataaagcattttttcactgcattctagtgtgtgtgtgtccgaaaggacaaaccataatcgcgtggatatggcacgcaagf  
tttaccgggcaccgtaaatgtccgactggttgtaactcatcaatgtatcttaacgcgt

ATA\_ydhl (SEQ ID NO: 17):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgcataccacattttagaggttttacttgctttaa  
aaacctcccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgtgtgttaactgtttattgcagcttataatggttacaataa  
agcaatagcatcacaatttcaataaaggtataacctcaataatggtttgagggtgtctaccaggaaccgtaaaatcctgattaccttt  
atttcttcggaataaagcattttttcactgcattctagtgtgtgtgtgtccaaactcatcaatgtatcttaacgcgt