

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037923**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.06.07

(51) Int. Cl. **C12N 15/113** (2010.01)
A61K 31/7105 (2006.01)

(21) Номер заявки
201690951

(22) Дата подачи заявки
2014.11.07

(54) **мякРНК, КОМПОЗИЦИИ И ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **1360889**

(32) **2013.11.07**

(33) **FR**

(43) **2016.10.31**

(86) **PCT/EP2014/073991**

(87) **WO 2015/067727 2015.05.14**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НИНОВАКС (FR)

(72) Изобретатель:
Мартен Жан-Рене (FR)

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

(56) Z.-P. HUANG ET AL.: "Genome-wide analyses of two families of snoRNA genes from *Drosophila melanogaster*, demonstrating the extensive utilization of introns for coding of snoRNAs", RNA, vol. 11, no. 8, 1 August 2005 (2005-08-01), pages 1303-1316, XP055058371, ISSN: 1355-8382, DOI: 10.1261/rna.2380905, cited in the application, the whole document

-& DATABASE EMBL [Online] 3 February 2005 (2005-02-03), "*Drosophila melanogaster* psi28s-1153 snoRNA gene", XP055166324, retrieved from EBI accession no. EMBL:AJ809559 Database accession no. AJ809559, the whole document

MASAOMI KATO ET AL.: "Ageing and the small, non-coding RNA world", AGEING RESEARCH REVIEWS, vol. 12, no. 1, 6 April 2012 (2012-04-06), pages 429-435, XP055058373, ISSN: 1568-1637, DOI: 10.1016/j.arr.2012.03.012, the whole document

HUAQI JIANG ET AL.: "Intestinal stem cells in the adult midgut", EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, ACADEMIC PRESS, US, vol. 317, no. 19, 23 July 2011 (2011-07-23), pages 2780-2788, XP028103415, ISSN: 0014-4827, DOI: 10.1016/J.YEXCR.2011.07.020 [retrieved on 2011-08-11]

(57) Настоящее изобретение относится к применению конкретных последовательностей РНК в качестве лекарственного средства. Более конкретно оно относится к применению малых ядрышковых РНК (мякРНК), для которых авторы изобретения продемонстрировали участие в механизмах старения. мякРНК по изобретению можно использовать, в частности, для повышения устойчивости к стрессу индивидуума, для борьбы с неблагоприятными эффектами старения, как правило, для профилактики или лечения дегенеративного заболевания, ламинопатии, диабета, ожирения или злокачественной опухоли, а также, в более широком смысле, для увеличения продолжительности жизни индивидуума. мякРНК по изобретению также можно использовать при лечении бесплодия. Изобретение также относится к векторам, клеткам, трансгенным животным и композициям, способным экспрессировать мякРНК по изобретению, а также к способам, в которых используют один из указанных выше продуктов по изобретению, таких как средство идентификации молекулы, которая является активной для профилактики или лечения патологии, аномалии или нарушения, связанного с механизмом старения.

B1**037923****037923****B1**

Настоящее изобретение относится к применению конкретных последовательностей РНК в качестве лекарственного средства. В частности, оно относится к использованию малых ядрышковых РНК (мякРНК), для которых авторы изобретения продемонстрировали вовлеченность в механизмы старения. мякРНК по изобретению можно применять, в частности, для повышения устойчивости к стрессу индивидуума для борьбы с неблагоприятными эффектами старения, как правило, для профилактики или лечения дегенеративного заболевания, в частности нейродегенеративного, ламинопатии, в частности синдрома Хатчинсона-Гилфорда (HGPS) (также известного под названием прогерия), диабета, ожирения или злокачественной опухоли, а также в более широком смысле для увеличения продолжительности жизни индивидуума. мякРНК по изобретению также можно использовать в лечении бесплодия.

Кроме того, изобретение относится к векторам, клеткам, трансгенным животным и композициям, способным экспрессировать мякРНК по изобретению, а также к способам, в которых используют указанные выше продукты по изобретению, такие как средство идентификации активной молекулы, при профилактике или лечении аномалии, нарушения или видимого или функционального повреждения, связанного с механизмом старения.

Предшествующий уровень техники

Механизмы старения (т.е. прогрессирующее снижение способности к выживанию и самовоспроизведению с возрастом) на протяжении столетий оставались загадкой для общества и научного сообщества. В двух теориях, которые преобладают в настоящее время, утверждают, что согласно одной старение является результатом генетически запрограммированного эволюционного пути и что согласно другой старение является нормальным следствием существования, во время которого накапливаются повреждения клеток и молекул. Эти повреждения включают окислительные повреждения, вызываемые свободными радикалами, дефектные митохондрии, соматические мутации, прогрессирующее укорочение теломер, запрограммированную гибель клеток, пролиферацию поврежденных клеток и т.д. (Semsei I., (2000) On the nature of aging. *Mech. Aging Dev.*, 117:93-108).

На организмах, таких как дрожжи и мышь, было показано, что снижение поступления калорий оказывает значительное положительное влияние на увеличение продолжительности жизни (Sohal R.S., Weindruch R., (1998) Oxidative stress, calorie restriction, and aging. *Science*, 273:59-63; Finch C.E., Revkun G., (2001) The genetics of aging. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.*, 2:435-462). Последние исследования выявили, что ограничение калорийности также является эффективным у приматов, таких как люди (Roth G.S., Lasnikov V., Lesnikov M., Ingram D.K., Land M.A., (2001) Dietary calorie restriction prevents the age-related decline in plasma melatonin levels of rhesus monkeys. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86:3292-5; Roth G.S., Lane M.A., Ingram D.K., Mattison J.A., Elahi D., Tobin J.D., Muller D., Metter E.J., (2002) Biomarkers of calorie restriction may predict longevity in humans. *Science*, 297:811-813; Walford R.L., Mock D., Verdery R., MacCallum T., (2002) Calorie restriction in biosphere 2: alterations in physiologie, hématologie, hormonal., and biochemical parameters in humane restricted for a 2-year period. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 57:211-24). К сожалению, скорее всего большинство людей не сможет придерживаться строгого рациона питания, что необходимо для того, чтобы извлекать пользу от этого открытия.

В течение нескольких лет многие исследовательские группы занимаются идентификацией генов и путей сигнального каскада, вовлеченных в процесс старения. Соответствующие исследования проводили на многих организмах, таких как дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, червь *Caenorhabditis elegans* и дрозофила *Drosophila melanogaster* (Fontana et al., 2010), и они позволили идентифицировать растущий список генов. Многие из них участвуют в гуморальной передаче сигналов и являются консервативными среди большого разнообразия эукариотических организмов. Стало понятно, по меньшей мере для низших видов, что пути, ответственные за развитие и рост в начале жизни, сохраняют влияние на протяжении всей жизни и даже частично определяют ее продолжительность. Кроме того, в этих исследованиях опосредованно выявили важность метаболической емкости и устойчивости к стрессу для оценки продолжительности жизни индивидуума.

Например, мутанты гена *clk-1* *Caenorhabditis elegans* были связаны со снижением внемитохондриальной продукции активных форм кислорода (Hekimi S., Guarente L., (2003) Genetics and the specificity of the aging process. *Science*, 299:1351-1354). В патентной заявке WO 98/17823 описана функция гена *clk-1* в процессе развития и продолжительности жизни. В частности, в ней заявлен способ увеличения продолжительности жизни индивидуума путем регуляции экспрессии гена *clk-1*.

Также описано, что мутация гена *Methuselah* (который кодирует рецептор, сопряженный с G-белками) способна увеличивать приблизительно на 35% продолжительность жизни дрозофилы (US 6303768).

Также известно, что укорочение теломер является механизмом, ответственным за старение клеток. У позвоночных теломераза представляет собой обратную транскриптазу типа RiboNucleoProtein (RNP), роль которой заключается в поддержании длины теломеров путем добавления теломерной ДНК к концу хромосом в эукариотических клетках при делении (Kiss, 2002). У человека мутация в каскаде H/ACA мякРНК теломеразы приводит к плейотропному генетическому заболеванию, врожденному дискератозу, при котором у пациентов выявляют более короткие теломеры (Mitchell et al., 1999; Vulliamy et al., 2001). Несмотря на усилия, прикладываемые научным сообществом, в области расшифровки механизмов ста-

рения и идентификации новых терапевтических мишеней, позволяющих замедлять этот процесс и/или бороться с его неблагоприятными эффектами, доступные средства остаются недостаточными. Потребность в средствах, обеспечивающих возможность "хорошо стареть", т.е. без заболеваний и неудобств, как правило, связанных со старостью, все больше ощущается по мере того, как успехи в медицине, связанные с общим улучшением условий жизни, уже позволили населению всего лишь за несколько десятков лет значительно увеличить ожидаемую продолжительность жизни.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к использованию в профилактических и терапевтических условиях представляющих интерес последовательностей РНК, для которых авторы изобретения продемонстрировали практическую роль в механизмах старения. В частности, авторы изобретения продемонстрировали способность таких последовательностей увеличивать заметным образом продолжительность жизни индивидуума, препятствуя механизмам старения и борясь со связанными с ними неблагоприятными эффектами. Последовательности по изобретению, позволяющие, таким образом, бороться с заболеваниями, связанными со старостью, такими как дегенеративные заболевания, ламинопатии и злокачественные опухоли, а также с диабетом и ожирением. Выявлено, что такие последовательности также являются эффективными для лечения проблем бесплодия или стерильности (трудность или невозможность родить), а также для увеличения сопротивляемости индивидуумов, в частности индивидуумов, достигших половой зрелости, предпочтительно индивидуумов пожилого возраста, подвергающихся стрессу.

Первым объектом изобретения является выделенная или синтетическая последовательность РНК, содержащая последовательность SEQ ID NO: 1, гомологичную последовательность, предпочтительно ортологичную последовательность или функционально аналогичную последовательность, для применения в качестве лекарственного средства. Авторы изобретения продемонстрировали, что последовательность РНК SEQ ID NO: 1, обнаруженная у дрозофилы, соответствует ортологичным последовательностям у млекопитающих, таких как приматы и человек, и у грызунов, таких как мышь и крыса. Таким образом, изобретение также относится к использованию в одном или других применениях, описываемых в настоящем документе, выделенной или синтетической последовательности РНК, предпочтительно выбранной из последовательности SEQ ID NO: 2 человека и одной из последовательностей SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4 мыши.

Последовательности SEQ ID NO: 2, 3, 4, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 22, 24, 26 и 28, указанные в табл. 1 настоящего документа, являются примерами ортологичных последовательностей по отношению к последовательности SEQ ID NO: 1.

Другим предметом изобретения является последовательность ДНК, кодирующая представляющий интерес последовательности РНК по изобретению.

Изобретение также относится к вектору, обеспечивающему экспрессию *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo* последовательности РНК по изобретению.

Изобретение также относится к клетке, содержащей последовательности РНК по изобретению или трансформированной с помощью вектора по изобретению, а также к композиции, содержащей продукт по изобретению и носитель, приемлемый с пищевой и фармацевтической точки зрения. Изобретение также относится к использованию последовательности РНК, вектора, клетки или композиции по изобретению непрерывно или последовательно для восстановления или модулирования экспрессии указанной выше последовательности РНК *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo*.

Другим объектом изобретения является трансгенная мышь, геном которой генетически модифицировали для предотвращения или модификации, предпочтительно изменения экспрессии представляющий интерес последовательности РНК по изобретению, как правило, одной и/или другой из последовательностей SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4.

Изобретение также относится к способу оценки косметической или терапевтической эффективности тестируемого соединения для борьбы с неблагоприятными эффектами старения или стресса или для борьбы с бесплодием, где указанный способ включает i) воздействие на клетку или популяцию клеток, не экспрессирующих последовательности РНК по изобретению или экспрессирующих аномальный вариант указанной последовательности РНК, или на трансгенную мышь по изобретению, ii) оценку эффектов, в случае их наличия, тестируемого соединения на фенотип указанной или указанных клеток или указанной трансгенной мыши, iii) определение косметической или терапевтической эффективности указанного тестируемого соединения, где восстановление активности и/или экспрессии указанной последовательности РНК коррелирует с эффективностью указанного тестируемого соединения.

Кроме того, изобретение относится к способу оценки косметической или терапевтической эффективности тестируемого соединения для борьбы с неблагоприятными эффектами старения или стресса или для борьбы с бесплодием, где указанный способ включает i) воздействие на клетку по изобретению, содержащую последовательности РНК по изобретению, или на популяцию клеток, содержащих клетку по изобретению, ii) оценку эффектов, в случае их наличия, тестируемого соединения на фенотип указанной клетки или указанной популяции клетки, iii) определение косметической или терапевтической эффективности указанного тестируемого соединения, где восстановление активности и/или экспрессии указанной последовательности РНК коррелирует с эффективностью указанного тестируемого соединения.

Изобретение также относится к наборам, содержащим нуклеиновые кислоты, векторы, кассеты и/или клетки, такие как описанные выше.

Подробное описание

Изобретение является результатом открытия авторами изобретения влияния малой последовательности ядерной РНК (мякРНКА28S-1153, называемой "молодость", указанной в настоящем документе в качестве SEQ ID NO: 1) на продолжительность жизни дрозофил. Такую мякРНК идентифицировали при системном скрининге мякРНК, ассоциированных с геномом дрозофилы (Huanget al., 2005), в настоящее время с которой не связана ни одна функция.

Авторы изобретения охарактеризовали эту последовательность и, в частности, продемонстрировали, что геномная делеция 632 пар оснований области F4 генома дрозофилы, содержащая последовательность мякРНКА28S-1153, сокращает продолжительность жизни дрозофил приблизительно на 30%. Затем они выявили, что сверхэкспрессия этой последовательности РНК, например с помощью трансгена, содержащего геномную ДНК, кодирующую эту мякРНК, заметно увеличивает продолжительность жизни дрозофил, приблизительно на 100%. Мушки, у которых сверхэкспрессируется последовательность РНК по изобретению, таким образом, живут дольше в два раза. Авторы изобретения также идентифицировали и детектировали экспрессию ортологических последовательностей "молодости" у мыши и у человека.

Характеристики последовательностей РНК и других продуктов по изобретению

Как было объяснено выше, изобретение относится к выделенной или синтетической рибонуклеотидной последовательности (последовательности РНК), обладающей функциональными характеристиками последовательности SEQ ID NO: 1, первоначально идентифицированной у дрозофилы (*Drosophila melanogaster*), для использования в качестве лекарственного средства у индивидуума, для которого, вероятно, оно будет являться эффективным, как правило, у животного или насекомого, например у млекопитающего или у грызуна, предпочтительно у человека.

Под "лекарственным средством" подразумевают вещество, обладающее профилактическими или лечебными свойствами. В контексте изобретения лекарственное средство предназначено лечить, способствовать выздоровлению, облегчать состояние или оказывать профилактическое действие у индивидуума, такого как определено выше, патологии, аномалии или нарушения, связанного с аномальным или просто нежелательным процессом старения.

У дрозофилы представляющая интерес последовательность РНК содержится в области генома, идентифицированной как область F4, которая находится на хромосоме 2R. Эта нуклеотидная последовательность для первого вида дрозофилы (*Drosophila melanogaster*), изучаемого авторами изобретения, состоит из 148 пар оснований. В настоящем документе ее обозначают как SEQ ID NO: 1.

Гомологи/ортологи, как и функциональные аналоги и варианты последовательности SEQ ID NO: 1, а также последовательность SEQ ID NO: 1, представляющие интерес последовательности являются объектами настоящего изобретения.

Термин "гомолог" используют в контексте настоящего изобретения для обозначения структуры, нуклеотидная последовательность которой является идентичной или достаточно близкой к этой последовательности SEQ ID NO: 1, идентифицированной у этого первого вида дрозофилы, чтобы ее можно было считать ее эквивалентом в пределах другого вида (дрозофилы, насекомого или любого другого животного). Считают, что последовательность является гомологичной последовательности SEQ ID NO: 1, если по отношению к этой последней последовательности или одному из ее фрагментов по меньшей мере 50 последовательных нуклеотидов она обладает идентичностью последовательности по меньшей мере 70, 80 или 85%, предпочтительно по меньшей мере 90 или 95%, еще более предпочтительно по меньшей мере 96, 97, 98 или 99%, получаемой, например, с использованием программы выравнивания последовательностей blastN (Altschul et al., 1990), а также с использованием программы INFERNAL для "INFERENCE of RNA ALIGNMENT", которой идентифицируют последовательности ДНК на основании структуры РНК и их сходство последовательности. Считают, что две генетические гомологичные последовательности двух различных видов являются ортологичными, если они происходят от уникальной последовательности, представленной у последнего общего предка двух видов.

Процент идентичности определяют сравнением двух последовательностей, для которых проводили оптимальное выравнивание. Процент идентичности рассчитывают путем определения числа положений, для которых идентичный остаток появляется для двух последовательностей в одинаковом положении, делимого на число общих положений и умножаемого на 100. Оптимальное выравнивание двух последовательностей можно получать, например, с использованием алгоритма поиска локальной гомологии (Smith and Watherman, 1981) или эквивалентных систем, известных специалисту в данной области.

Термин "аналог" означает любой миметик, который представляет собой химическое соединение, существующее в природе и выделенное из естественных условий или получаемое искусственным путем, и который обладает, по меньшей мере, функциями эндогенных нуклеотидных последовательностей так, что он имитирует (последовательность РНК, эквивалентную с функциональной точки зрения), например, совокупность эндогенных функций нуклеотидной последовательности, которую он имитирует. Пример аналогичного соединения представляет собой, например, последовательность, обеспечивающую сплайсинг одних и тех же генов. Конкретным предметом изобретения также является последовательность,

аналогичная SEQ ID NO: 1, которая обеспечивает сплайсинг одного или многих генов, выбранных из генов Ir56d, buttonhead, klarsicht, CG3262, CG30502 ("fatty acid 2-hydroylase" - fa2h), CG11125, CG9339 и CG40006 *Drosophila melanogaster*. Опыты, проводимые авторами изобретения, продемонстрировали, например, что ген CG9339 (называемый: skywalker) (Uytterhoeven et al., 2011) некорректно сплайсирован в мутанте F4, что свидетельствует о том, что мРНК "молодости" участвует в альтернативном сплайсинге этого гена (см. фиг. 17). Аналогичные результаты также получали для транскрипта гена klarsicht, для которого наблюдают меньшее количество сплайсированной РНК у мутанта F4 по сравнению с контрольными мушками дикого типа Canton-S (фиг. 18A), а также для гена CG30502, кодирующего ген fa2h (фиг. 18B), где последний у человека участвует в различных формах демиелинизации, такой как нейродегенерация, связанной с накоплением железа, лейкодистрофиями (как правило, лейкодистрофиями, связанными с мутациями гена fa2h) и наследственной спастической параплегией, как правило, наследственной спастической параплегией SPG35 (Dicket al., 2008, 2010; Pierson et al., 2012).

Термин "функциональный вариант" означает любую нуклеиновую кислоту, содержащую одну или несколько модификаций или мутацию (т.е., например, делецию, замену или добавление одного или нескольких оснований) по сравнению с исходными последовательностями, описываемыми в настоящей заявке и обеспечивающими возможность применений, описываемых в контексте настоящего изобретения.

Последовательность, рассматриваемая в контексте изобретения, такая как гомолог, предпочтительно ортолог эталонной последовательности, является примером функционального варианта в контексте изобретения указанной эталонной последовательности. Такая последовательность может являться природной, рекомбинантной или синтетической.

Последовательность SEQ ID NO: 1 представляет собой последовательность, хорошо сохранившуюся в процессе эволюции, и представлена у многих видов животных. Таким образом, авторы изобретения продемонстрировали, в частности, что эта последовательность представлена у 12 других видов дрозофил, геном которых является известным. Примеры гомологичных/ортологичных последовательностей последовательности РНК SEQ ID NO: 1, таким образом, включают последовательности РНК SEQ ID NO: 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 22, 24, 26 и 28, указанные в табл. 1 настоящего документа (см. фиг. 9).

Авторы изобретения также идентифицировали ортологичную последовательность РНК у человека, локализованную на хромосоме 11, в положении 12822722-12822811. Речь идет о последовательности, указанной в настоящем документе как SEQ ID NO: 2. Авторы изобретения также идентифицировали две ортологичные последовательности РНК у мыши (речь идет о последовательностях, указанных соответственно как SEQ ID NO: 3 и 4 в настоящем документе), локализованные на хромосоме 15 в положении 3033688930337017 (SEQ ID NO: 7) и на хромосоме 18 в положении 6495012-6495091 (SEQ ID NO: 8).

Представляющий интерес нуклеотидные последовательности, идентифицированные у дрозофилы, человека и мыши, перечислены в табл. 1 ниже.

Таблица 1

Вид	Последовательности РНК (5'-3')	SEQ ID NO:
<i>Drosophila melanogaster</i>	AAAGCGUUAGAUUUAAACUGUGGUUGAAUUCACAAAUAAGGCCACAGUUAU GCAAUAAACGCUAGAAAAAACGGUAGUUAUUAUAACGUGUUGACUAACA UCUGCGGAUAAGAAGCUUUUGCGUUUUGAGGUACUAACCACAGUA	1
Человек	GUAAGUGUAGCCUAGAAUUGGGGCGUGAUUUGAAAAUAGCCCCAAUUCUG CAAUUUUCACCGCAAUAAAAGCUUCUCCAGUUAUACAUGGUGAUUGGUCUUG AUGGGCUAUUGUGGACAGAGGAGGGUGCUAGGUUGGGGUGGACGGGGCCACA GCU	2

Мышь 1	AAAGGGGUUGAAGAAUGGUAUGGAUUCAGAAUGAACUAUCAGAGAAACUCCA GAGCCAGCAGGAAACAUUAUAGAGCCUUUGCUACAAUGUCCUGUUUCUUUCU UGGCUUUUAGUUCUGUCCACAGAU	3
Мышь 2	GAAAGCAUUUAAUAAUUUACCAUAGUUUUAUCCGAGCUAGGGUAAAGCAGUC AGUGCUAGAAAAUGAGAAAAACACAAUACAUAAGACCUCUCAAGGGGAGAUG CUGUACUGUAUAUACUG	4
<i>Drosophila simulans</i>	AAAGCGUAGGUUAUAAACCGUGGUUGAAUUCACAAAUAGGCCACAGUUUAU GCAUAAAACGCUAGAAAAAAACGGUAGUAUUUAAUACGUGUUGACUAACA UCUGCGGAUAAAACAGCUUUGCGUUUUGAGGUACUAACCACAGUA	9
<i>Drosophila sechellia</i>	AAAGCGUAGGUUAUAAACCGUGGUUUAAUUCACAAAUAGGCCACAGUUUAU GCAUAAAACGCUAGAAAAAAACGGUAGUAUUUAAUACGUGUUGACUAACA UCUGCGGAUAAAAGCUUUGCGUUUUGAGGUACUAACCACAGUA	11
<i>Drosophila yakuba</i>	CAAGCGUUGUAUAAUUAUAAACUGUGGAAACUUCACAAAUAGGCCACAGUUA UGCAAGAAACGCUAGAAAAACUUGGUAGUAUUUAAUACGUGCUGACUAACG UCUGCGGAUAAAAGCUUUGCGUUUUGAGGUACUAACCACAUUA	13
<i>Drosophila erecta</i>	CAUGCGUUGUAUAAUUAUAAACUGUGGACGAAUCCCAAUAGCCACAGUU AUGCAAGAAACGCUAGAAAAAAUAGGUAGUAUUUAAUACGUGCUGACUAAC AUCUGCGGAUAAAGAGCUUUGCGUUUUGAGGUACUAACCACAAUA	15
<i>Drosophila ananassae</i>	UUAGGCGUUCAAAACAUUAAACGUUGGCUGAUUUUAGAUUAGGCUAGUGUUA UGCACGCAACGCUAGAGAAAAUUGGUAGUAUUUAAUAAUGCGUUGGUGGCAA AUCUAUCGAUUUUGAUCUUCGCAUUUUGAGGUACUAGCACAGUU	17
<i>Drosophila pseudoobscura</i>	CAUGGCGCUCAAACAUUAAUCGGUGGCCUGAUCCACACGUCGGCCACAUUUA UGCACGCAGCGCCAGAUAAUAGUAGGCAGCAUUUAAUAAUGUAUUGGUUCCA AAUGACUCAGACUUUUGCAUUUUGAGGUGUAGCCACAACG	19
<i>Drosophila persimilis</i>	CAUGGCGCUCAAACAUUAAUCGGUGGCCUGAUCCACACGUCGGCCACAUUUA UGCACGCAGCGCCAGAUAAUAGUAGGCAGCAUUUAAUAAUGUAUUGGUUCCA AAUGACUCAGACUUUUGCAUUUUGAGGUGUAGCCACAAAG	21
<i>Drosophila willistoni</i>	AGAGGCGUUCACAUUUAAACUUUAGCCGUUCUUUAAACUAAGCUAUUUGUU AUGCAAGUAAACGCUAGAAUUAUUUUCUGCAACAUUUAAUAAUGCUUUGGUC GUUAUCUAACAAAAUCUCAGCAUUUUGAGGUGUCUGCUACAAUU	22
<i>Drosophila mojavensis</i>	CCCUGCGUUGAGCAGUAAAUUGUCGCGAUUGAUAAUAGGCGACGAUAAUG CAAACAACGGUAGAAAAACUAACGACAUUUAAUAAUACAUUGACCACUAAA UCCCAUGAACAUUGCAUUUUGAGGUGUCGCGACAUGU	24
<i>Drosophila virilis</i>	UUAUGCGUUCACAGUAAAUUGUCGCCGAUAGAUUACUAGGCGACAGUUUUG CAAGGCAACGCUAGAAUAGCAGACGACAUUUAAUAAUGCAUUGGCCGACAA ACUCCACGGCCUUUGCGUUUUGAGGUGUCGCCACAUGU	26
<i>Drosophila grimshawi</i>	UUGUGCGUUCGACAGUAAAUUUCGAUGACUGUAGAUAGGCGAAAAUUAUGC AAGGCAACGCUAGACCAAUAGAUGACGACAUUUAAUAAUGCAUUGGCCGAU UAACUCAGAUUUUGCAUUUUGAGGUGUCGCCACAUGU	28
	Соответствующие последовательности ДНК	

<i>Drosophila melanogaster</i>	AAAGCGTTAGATATTAACTGTGGTTGAATTCACAAAATAGGCCACAGTTAT GCAATAAACGCTAGAAAAAACGGTAGTATTTAATAACGTGTTGACTAACAT CTGCGGATAAGAAGCTTTGCGTTTTGAGGTACTAACCACAGTA	5
Человек	GTAAGTGTAGCCTAGAAATTTGGGGCTGGATTTGAAAATTAGCCCCAATTCTG CAATTTTCACCGCAATAAAAGCTTCTCCAGTTATACATGGTGATTGGTCTTG ATGGGCTATTGTGGACAGAGGAGGGTGCTAGGTTGGGGTGGACGGGGCCACA GCT	6
Мышь 1	AAAGGGGTTGAAGAATGGTATGGATTGAGAATGAACATCAGAGAACTCCA GAGCCAGCAGGAAACATTATAGAGCCTTTGCTACAATGTCTGTTTCTTTCT TGGCTTTTAGTTCTGTTCCACAGAT	7
Мышь 2	GAAAGCATTTAATATTTACCAATAGTTTATTCGAGCTAGGGTAAAGCAGTC AGTGCTAGAAAAATGAGAAAAACAATACATAAGACCTCTCAAGGGGAGATG CTGTTACTGTATATACTG	8
<i>Drosophila simulans</i>	AAAGCGTTAGGTATAAACCTGTGGTTGAATTCACAAAATAGGCCACAGTTAT GCAATAAACGCTAGAAAAAACGGTAGTATTTAATAACGTGTTGACTAACA TCTGCGGATAAACAGCTTTGCGTTTTGAGGTACTAACCACAGTA	10
<i>Drosophila sechellia</i>	AAAGCGTTAGGTATTAACCTGTGGTTTAAATTCACAAAATAGGCCACAGTTAT GCAATAAACGCTAGAAAAAACGGTAGTATTTAATAACGTGTTGACTAACA TCTGCGGATAAAATAGCTTTGCGTTTTGAGGTACTAACCACAGTA	12
<i>Drosophila yakuba</i>	CAAGCGTTGTATAATATTTAACTGTGGAACTTCACAAATAGGCCACAGTTA TGCAAGAAACGCTAGAAAACTTGGTAGTATTTAATAACGTGCTGACTAACG TCTGCGGATAAAAGCTTTGCGTTTTGAGGTACTAACCACATTA	14
<i>Drosophila erecta</i>	CATGCGTTGAATAATATTTAACTGTGGACGAATTCACAAATAAGCCACAGTT ATGCAAGAAACGCTAGAAAAATAGGTAGTATTTAATAACGTGCTGACTAAC ATCTGCGGATAAGAGCTTTGCGTTTTGAGGTACTAACCACAATA	16
<i>Drosophila ananassae</i>	TTAGGCGTTCAAAACATTAAACGTTGGCTGATTTATGATTAGGCTAGTGTTA TGCACGCAACGCTAGAGAAAATTTGGTAGTATTTAATAATGCGTTGGTGCAA ATCTATCGATTTTGATCTTCGCATTTTGAGGTACTAGCACAGTT	18
<i>Drosophila pseudoobscura</i>	CATGGCGCTCAAACATTAATCGGTGGCCTGATCCACACGTCGGCCACATTTA TGCACGCAGCGCCAGATAATAGTAGGCAGCATTTAATAATGTATTGGTTCCA AATGACTCAGACTTTTGCAATTTTGAGGTGTTAGCCACAACG	20
<i>Drosophila persimilis</i>	CATGGCGCTCAAACATTAATCGGTGGCCTGATCCACACGTCGGCCACATTTA TGCACGCAGCGCCAGATAATAGTAGGCAGCATTTAATAATGTATTGGTTCCA AATGACTCAGACTTTTGCAATTTTGAGGTGTTAGCCACAAAG	22
<i>Drosophila willistoni</i>	AGAGGCGTTCAACATTTAACTTTAGCCGTTCTTTTAACTAAGCTATTTGTT ATGCAAGTAACGCTAGAATATAATTTCTGCAACATTTAATAATGCTTTGGTC GTATACTAACAAAAATCTCAGCATTTTGAGGTGTCTGCTACAATT	24
<i>Drosophila mojavensis</i>	CCCTGCGTTGAGCAGTAAATTTGTCGCTGATTGATAATTAGGCGACGATAATG CAAACAACGGTAGAAAAACTAACGACATTTAATAATACATTGACCACTAAA TCCCATGAACATTGCATTTTGAGGTGTCGCGACATGT	26
<i>Drosophila virilis</i>	TTATGCGTTCAACAGTAAATTTGTCGCCGATAGATTACTAGGCGACAGTTATG CAAGGCAACGCTAGAATAAGCAGACGACATTTAATAATGCATTGGCCGACAA ACTCCACGGCCTTTGCGTTTTGAGGTGTCGCCACATGT	28
<i>Drosophila grimshawi</i>	TTGTGCGTTTCGACAGTAAATTTTCGATGACTGTAGATAGGCGAAAATTATGC AAGGCAACGCTAGACCAATTAGATGACGACATTTAATAATGCATTGGCCGAT TAACTCAGATCTTGCAATTTTGAGGTGTCGCCACATGT	30

Конкретным предметом изобретения является использование последовательности РНК SEQ ID NO: 1 для идентификации гена-мишени, отличающегося тем, что указанная последовательность SEQ ID NO: 1 способна распознавать последовательность-мишень в гене *Drosophila melanogaster*, выбираемом предпочтительно из Ir56d, buttonhead, klarsicht, CG3262, CG30502 (fatty acid 2-hydroylase: fa2h) и CGI 1125, CG9339, CG40006, где указанную последовательность-мишень выбирают предпочтительно из

SEQ ID

NO:31 (TGTTGAATTCACAAAA), SEQ ID NO:32 (TTGAATTCACAAAATA), SEQ ID NO:33 (AATTCACAAAATAGGC), SEQ ID NO:34 (AAGCGTTAGATATTAA), SEQ ID NO:35 (ACATCTGCGGATAAGA), SEQ ID NO:36 (AAGCTTTGCGTTTTGA) и SEQ ID NO:37 (AGAAGCTTTGCGTTTT)

или аналогичной ей последовательности.

В контексте настоящего изобретения представляющие интерес последовательности РНК предпочтительно находятся в форме мякРНК. В контексте изобретения термин "мякРНК" включает группу некодирующих РНК, содержащихся во всех эукариотических клетках. Они локализованы в ядре и более конкретно в ядрышке, где они являются связанными с белками, с которыми они образуют малые ядерные рибонуклеопротеины (small nucleolar ribonucleoproteins или snoRNP). Как правило, они образуются из интронов пре-иРНК. На эволюционном уровне такие некодирующие РНК присутствуют от архебактерий до млекопитающих. мякРНК могут обладать многими функциями, такими как модификация рибосомальных РНК, такой как метилирование 2'-О-рибозы или псевдоуридилирование различных классов РНК. Они участвуют в нуклеотическом процессе рибосомальных РНК, а также в синтезе теломерной ДНК (Kiss, 2002; Kiss et al., 2010; Ye, 2007). Различают два основных класса мякРНК: мякРНК, содержащие каскету (Box) C/D, и мякРНК, содержащие каскету H/ACA (фиг. 2A). Кассеты C/D служат направляющим механизмом для метилирования 2'-О-рибозы на конкретных участках, тогда как кассеты H/ACA регулируют преобразование уридина в псевдоуридин (Kiss, 2002; Gardner et al., 2010; Huang et al., 2005) (фиг. 2B).

Представляющая интерес мякРНК A28S-1153 ("молодости"), идентифицированная у первого вида дрозофилы, принадлежит к классу H/ACA, т.е. ее структура содержит каскету H/ACA. Таким образом, она участвует в псевдоуридилировании (т.е. преобразовании уридина в псевдоуридин) во время созревания рибосомальных РНК и регулирует синтез белков определенных генов.

мякРНК по изобретению можно химически модифицировать, как правило, для увеличения устойчивости мякРНК к нуклеазам, для придания лучшей аффинности/селективности и, таким образом, лучшей функциональности мякРНК. Как правило, модификации затрагивают нуклеозид или межнуклеозидную связь. Они могут затрагивать сахар (как правило, положение 2' сахара), азотное основание нуклеозида (которое может, как правило, содержать заместитель в положении 2, 4 или 6) или одну (или несколько) фосфатных групп.

Модификация может заключаться, например, в аминировании, галогенировании, например фторировании, или в алкилировании, например в метилировании. Таким образом, модифицированную группу сахаров можно выбирать, например, из групп 2'-О-метил и 2'-О-метоксиэтил.

Модифицированный нуклеотид может представлять собой нуклеотид, содержащий гетероциклическое основание, которое не способно образовывать водородные связи с гетероциклическими основаниями ДНК или РНК.

Модификацию межнуклеозидной связи выбирают, например, из фосфоротиоатной, метилфосфатной, фосфотриэфирной, фосфородитиоатной и фосфоселенатной связи.

Настоящее изобретение также относится к последовательностям дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), ответственным за экспрессию представляющих интерес последовательностей РНК по изобретению. Последовательность ДНК, обеспечивающая экспрессию последовательности РНК SEQ ID NO: 1, представляет собой последовательность, идентифицированную в настоящем изобретении как SEQ ID NO: 5, последовательность ДНК, обеспечивающая экспрессию SEQ ID NO: 2, представляет собой последовательность, идентифицированную в настоящем изобретении как SEQ ID NO: 6, последовательность ДНК, обеспечивающая экспрессию SEQ ID NO: 3, представляет собой последовательность, идентифицированную в настоящем изобретении как SEQ ID NO: 7, и последовательность ДНК, обеспечивающая экспрессию SEQ ID NO: 4, представляет собой последовательность, идентифицированную в настоящем изобретении как SEQ ID NO: 8.

Объектом изобретения также является последовательность выделенной или синтетической ДНК, выбираемой в группе, содержащей последовательности SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 30, и отличающаяся тем, что она обеспечивает экспрессию представляющий интерес последовательности РНК по изобретению.

Так же, как и мякРНК, ДНК по изобретению можно химически модифицировать (см. выше возмож-

ные химические модификации).

Изобретение также относится к любой рекомбинантной экспрессирующей кассете, отличающейся тем, что она содержит последовательность представляющей интерес нуклеиновой кислоты по изобретению, такую как определено в настоящем документе. Термин "экспрессирующая кассета" означает конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, обеспечивающей экспрессию представляющий интерес последовательности РНК по изобретению, и функционально связанную регуляторную область. "Функционально связанная" экспрессия указывает на то, что элементы объединены таким образом, что экспрессия последовательности нуклеиновой кислоты (ответственной за экспрессию представляющей интерес последовательности РНК) и/или ее направленное воздействие на представляющую интерес последовательность РНК находятся под контролем промотора транскрипции. Как правило, последовательность промотора помещают выше последовательности нуклеиновой кислоты, на расстоянии от последовательности нуклеиновой кислоты, обеспечивающей возможность контроля экспрессии. Между регуляторными элементами и кодирующей последовательностью могут содержаться спейсерные последовательности, при условии, что они не препятствуют экспрессии и/или направленному воздействию на представляющую интерес последовательность РНК.

Другим объектом изобретения является любой вектор (для экспрессии), содержащий нуклеиновую кислоту или кассету, такие как определено выше, обеспечивающие экспрессию представляющий интерес последовательности РНК по изобретению в клетке-хозяине или в организме-хозяине. Вектор может представлять собой ДНК или РНК, кольцевую или некольцевую, одноцепочечную или двухцепочечную. Как правило, это плазида, фаг, вирусный вектор (выбранный, например, из аденовирусного вектора, ретровирусного вектора, вектора на основе аденоассоциированного вируса, лентивирусного вектора, вектора на основе поксвирусов, вектора на основе вируса герпеса и т.д.), космида или искусственная хромосома. Преимущественно это вектор, способный трансформировать эукариотическую клетку, предпочтительно животную клетку, как правило, клетку человека, предпочтительно клетку кишечника или яичника. Такие векторы хорошо известны специалисту в данной области и, в частности, были описаны в патентной заявке WO 06/085016 или в статьях de Barton and Medzhitov, 2002; Tiscornia et al., 2004; Xia et al., 2002 и Shen et al., 2003.

Предпочтительный вектор, обеспечивающий экспрессию представляющий интерес последовательности РНК по изобретению, можно выбирать, например, из плазмиды, космиды, вирусного вектора или фага. Предпочтительный вектор, пригодный для использования у дрозофилы, представляет собой вектор pChs-Gal4, в который выше фактора транскрипции Gal4 вводят конкретную последовательность ДНК, которая, как известно, регулирует экспрессию данного гена в данной ткани, такую как, например, Myo1A-Gal4, escargot-Gal4, Su(H)-GBE-Gal4, Delta-Gal4.

Параллельно второй вектор (pUAS-мякРНК), содержащий представляющий интерес эффекторный ген, в данном случае мякРНК, предпочтительно помещают ниже регуляторных последовательностей UAS (Upstream Activating Sequence), где последние распознает фактор транскрипции P[GAL4]. Затем каждый из этих двух векторов посредством трансгеноза вводят животному. Затем скрещивают эти две линии животных. Такая система называется бинарной системой экспрессии P[GAL4] (Brand and Perrimon, 1993; Elliott and Brand, 2008). Таким образом, более конкретно векторы Myo1A-Gal4, escargot-Gal4, Su(H)-GBE-Gal4, Delta-Gal4 несут промотор и регуляторные элементы, способствующие экспрессии указанной последовательности РНК в клетках кишечника, тогда как векторы panos-Gal4 или MTD-(maternal-Tubulin)-Gal4 несут промотор и регуляторные элементы, способствующие экспрессии указанной последовательности РНК в яичниках.

Кроме того, векторы по изобретению могут содержать точку репликации, выбранный ген, репортерный ген и/или последовательность рекомбинации и т.д. Векторы можно конструировать общепринятыми способами молекулярной биологии, хорошо известными специалисту в данной области, с использованием, например, ферментов рестрикции, лигирования, клонирования, репликации и т.д. Конкретные примеры векторов в контексте изобретения приведены в экспериментальной части. Эти векторы могут включать, например, бинарную систему P[GAL4] (указанная выше) (Brand and Perrimon, 1993; Elliott and Brand, 2008).

Изобретение также относится к клетке, содержащей последовательность РНК по изобретению или трансформированной с использованием конструкции или вектора по изобретению. Предпочтительно клетка представляет собой клетку кишечника или яичника. Еще более предпочтительно клетка представляет собой стволовую клетку кишечника, энтеробласт, энтероцит, энтероэндокринную клетку, клетку-кормилицу или овоцит.

Изобретение также относится к использованию продукта по изобретению, как правило, последовательности РНК, последовательности ДНК, вектора или клетки по изобретению, непрерывно или последовательно для восстановления или модулирования, как правило, амплификации, *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo* экспрессии представляющей интерес последовательности РНК по изобретению.

Изобретение также относится к трансгенной мыши, геном которой (как правило, последовательность SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8) генетически модифицировали способами, хорошо известными специалисту в данной области, для предотвращения или модификации, например, повышения или сни-

жения экспрессии, предпочтительно изменения экспрессии одной или другой из последовательностей SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4.

Преимущественно мышь генетически модифицируют посредством гомологичной рекомбинации (knock-in, knock-out, knock-down) способами, известными специалисту в данной области, включая, например, использование системы CRE/LOX.

Изобретение также относится к композициям, содержащим последовательность РНК, последовательность ДНК, конструкцию, вектор или клетку по изобретению.

Последовательности РНК по изобретению являются очень стабильными и очень устойчивыми *in vitro*. Однако в случае введения подлежащему лечению индивидууму композиции по изобретению могут также преимущественно содержать носитель, приемлемый с пищевой и фармацевтической точки зрения.

Выражение "приемлемый с пищевой точки зрения носитель" означает носитель, позволяющий индивидууму проглатывать и переваривать без риска композицию, содержащую последовательность РНК, конструкцию, вектор или клетку по изобретению, содержащую такую последовательность, и способный защищать указанную последовательность от любого неблагоприятного воздействия, в частности связанного с перевариванием пищевого продукта, подвергающегося изменению до того, как он оказывает свое терапевтическое действие.

Выражение "фармацевтически приемлемый носитель" означает носитель, обеспечивающий введение без риска композиции, содержащей последовательность РНК, конструкцию, вектор или клетку по изобретению, содержащую такую последовательность, одним из возможных путей введения, описываемых ниже.

Преимущественно носитель настоящей композиции облегчает проникновение представляющей интерес РНК, конструкции или экспрессирующего вектора по изобретению в клетки, по возможности в конкретные клетки, такие как указанные в настоящем документе, подлежащего лечению индивидуума и/или защищает РНК, конструкцию или экспрессирующий вектор от возможного разрушения, которое может ухудшать его эффективность.

Выбор носителя, а также содержание активного вещества в носителе, как правило, определяют в зависимости от растворимости и химических свойств активного вещества, способа введения и характеристик подлежащего лечению индивидуума.

Среди носителей или пригодных, фармацевтически приемлемых носителей можно привести, в частности, природные катионные полимеры, такие как хитозан или ателоколлаген, или синтетические полимеры, такие как поли(L-лизин), полиэтиленмин (PEI) или дендримеры, которые образуют комплексы с нуклеиновыми кислотами по изобретению; липосомы; катионные липосомы; галактозиловые липосомы; липосомы, покрытые лигандом, обеспечивающие их направленную доставку в определенный тип клеток, такие как иммунолипосомы, покрытые антителом, специфическим к клетке-мишени (Zhenget al., 2009); липосомы, располагаемые внутри наночастицы, образуемой полимерами (Carmona et al., 2009), а также многослойные пленки поликатионов и полианионов.

Для получения таблеток можно использовать эксципиенты, такие как лактоза, цитрат натрия, карбонат кальция, дикальцийфосфат, и средства дезинтеграции, такие как амидон, альгиновые кислоты, и определенные силикатные комплексы, объединенные со смазками, такими как стеарат магния, лаурилсульфат натрия и тальк. Для получения пастилки предпочтительно использовать лактозу и полиэтиленгликоли с высокой молекулярной массой. Водные суспензии содержат эмульгаторы или средства, облегчающие суспендирование. Также пригодными являются растворители, такие как сахар, этанол, полиэтиленгликоль, пропиленгликоль, глицерин и хлороформ или их смеси.

Для улучшения эффективности композиции также можно добавлять адъюванты, такие как соли алюминия, (например, гидроксид алюминия, фосфат алюминия, сульфат алюминия), поверхностно активные вещества (такие как лизилецитин, полиолы-плюроники, полианионы, пептиды и эмульсии), полный и неполный адъювант Фрейнда, адъювант MPL-TDM (монофосфорилипид А, синтетический дианомикоат тегарозы), тирозин, алюминий, сапонины, такие как StimulonTM, и цитокины.

Последовательности РНК по изобретению можно получать со средством, таким как инъеклируемые микросферы, биоразрушаемые частицы, полимерные соединения (такие как полимолочная кислота или полигликолевая кислота), шарики или липосомы, которые могут обеспечивать контролируемое или пролонгированное высвобождение продукта.

Примеры носителей, приемлемых с пищевой точки зрения, включают, например, сахара, сапонины и т.д.

Композиция также может содержать одно или несколько других активных веществ, предпочтительно выбранных из средства, используемого для лечения ламинопатии, в частности в лечении синдрома Хатчинсона-Гилфорда или HGPS (также известного под названием прогерия и который заключается в преждевременном и ускоренном старении человека), ожирения, диабета, злокачественной опухоли, дегенеративного заболевания, в частности нейродегенеративного (например, лейкодистрофии или наследственной спастической параплегии, также обозначаемой как SPG35), стресса или бесплодия. Активное вещество при лечении ожирения может представлять собой, например, лептин или одно из его производных.

Активное вещество при лечении диабета может представлять собой, например, инсулин или одно

из его производных.

Активное вещество при лечении злокачественной опухоли может представлять собой, например, средство цитотоксической химиотерапии, общепринято выбираемое из ингибитора репликации ДНК (такого как средства, связывающие ДНК, в частности интеркалирующие или алкилирующие соединения), антиметаболическое средство (такое как ингибиторы ДНК-полимеразы или ингибитор топоизомеразы I или II), антимитогенное средство (например, алкалоид) и средство, блокирующее рост раковой опухоли (такое как ингибитор тирозиназы или моноклональное антитело).

РНК по изобретению (при необходимости содержится или экспрессируется с помощью другого продукта по изобретению, описываемого в настоящем документе) и другое или другие активные соединения можно вводить одновременно при необходимости в одной и той же композиции или последовательно.

Продукты по изобретению (последовательности нуклеиновых кислот, векторы, клетки, композиции) можно адаптировать для введения внутривенным, пероральным, сублингвальным, парентеральным, ректальным, местным, чрескожным, подкожным, через слизистую, внутримышечным, внутрилегочным, интраназальным, влагалищным путем и т.д., в соответствии с общепринятыми протоколами, хорошо известными специалисту в данной области.

Предпочтительно продукт адаптируют для введения пероральным путем, и он находится в твердой или жидкой форме. Продукт может, например, находиться в форме продукта питания, таблетки, желатиновой капсулы, пилюли, драже, пастилки, гранул или пригодного для питья раствора. В случае введения парентеральным путем предпочтительно он находится в форме жидкого раствора, эмульсии или суспензии. В случае введения внутривенным, внутрикожным или подкожным путем он, как правило, находится в форме инъектируемого раствора.

Представляющую интерес нуклеотидную последовательность также можно вводить электропорацией, в мышцы или через кожу индивидуума.

Специалист в данной области легко определяет дозирование (или терапевтически эффективное количество) для достижения желаемых эффектов (т.е. увеличения продолжительности жизни, борьба с неблагоприятными эффектами старения, со стрессом и/или с бесплодием). Конкретную дозу продукта необходимо адаптировать для конкретного индивидуума и к желаемому применению. Она зависит от совокупности факторов, таких как масса, состояние здоровья, пол, режим питания индивидуума, путь введения, процент всасывания и экскреции, и возможной комбинации с одной или несколькими другими активными молекулами.

Общая суточная доза вводимого продукта являющемуся человеком индивидууму в одной дозе или в нескольких дозах может, например, составлять приблизительно от 1 мкг до 20 мг на кг, предпочтительно от 100 мкг и 5 мг. Введения могут быть еженедельными или ежесуточными, даже повторяющимися несколько раз в сутки. РНК по изобретению или их содержащие композиции можно вводить в форме единичной дозы, содержащей от 0,05 до 20 мг РНК, предпочтительно от 0,1 до 5 мг.

В одном из конкретных вариантов осуществления представляющую интерес последовательность РНК по изобретению используют в терапевтической композиции, например вакцинной композиции.

В другом конкретном варианте осуществления представляющую интерес последовательность РНК по изобретению используют в косметической композиции.

Применения продуктов по изобретению

Настоящее изобретение, в частности, относится к продукту, такому как описано в настоящем документе, состоящему из или содержащему представляющую интерес последовательность РНК или последовательность ДНК по изобретению, для использования в качестве лекарственного средства.

Оно также относится к продукту или композиции по изобретению для использования: i) для профилактики или лечения патологии, аномалии, нарушения или расстройства, выраженного или функционального, связанного с механизмом старения, ii) для увеличения продолжительности жизни индивидуума или iii) для повышения устойчивости индивидуума к стрессу.

В конкретном аспекте настоящее изобретение относится к использованию такого продукта в эффективном количестве с терапевтической точки зрения для получения фармацевтической композиции, предназначенной i) для профилактики или лечения патологии, аномалии, нарушения или расстройства, выраженного или функционального, связанного с механизмом старения, ii) для увеличения продолжительности жизни индивидуума или iii) для повышения устойчивости индивидуума к стрессу.

В еще одном конкретном аспекте настоящее изобретение относится к использованию такого продукта для получения косметической композиции.

Термин "лечение", как используют в этом документе, относится к улучшению или исчезновению симптомов, замедлению прогрессирования заболевания или процесса старения, прекращению развития заболевания или исчезновению заболевания.

Авторы изобретения выявили неожиданную эффективность последовательностей РНК по изобретению в замедлении процесса старения или процесса старения и борьбе с патологиями и неблагоприятными эффектами, связанными с этим(и) процессом(ми).

В частности, авторы изобретения продемонстрировали, что сверхэкспрессия у дрозофилы *мякРН-*

KA28S-1153 последовательности SEQ ID NO: 1 заметно удваивает продолжительность жизни указанной дрозифилы. В частности, они продемонстрировали, что мушки, мутантные по мякРНКА28S-1153, характеризуются большим количеством нейродегенеративных повреждений, чем мушки дикого типа в возрасте 40 суток (фиг. 12). Кроме того, мушки, у которых сверхэкспрессируется мякРНКА28S-1153, характеризуются меньшими повреждениями, даже их отсутствием, головного мозга, что свидетельствует о защитном характере мякРНК по изобретению в отношении нейродегенеративных патологий. Также, авторы изобретения продемонстрировали, что мушки в возрасте 40 суток, у которых сверхэкспрессируются мякРНКА28S-1153, обладают лучшими сенсомоторными характеристиками (представленными в настоящем описании как расстояние, пройденное во время количественной оценки двигательной активности), чем дикие мушки, и, таким образом, являются защищенными от неблагоприятных эффектов, связанных с механизмами старения (фиг. 13).

Авторы изобретения продемонстрировали, что сверхэкспрессия представляющей интерес последовательности РНК по изобретению позволяет увеличивать продолжительность жизни индивидуума, замедлять механизмы старения и бороться против неблагоприятных эффектов, связанных с этими механизмами. В частности, они продемонстрировали, что эта сверхэкспрессия является нейропротекторной и обеспечивает, в частности, профилактику или лечение дегенеративного заболевания, в частности нейродегенеративного, как правило, нейродегенеративных заболеваний, связанных с накоплением железа, которые приводят к демиелинизации в головном мозге, таких как, например, нейродегенеративные заболевания, вызываемые одной или несколькими мутациями гена *fa2h*. В частности, изобретение позволяет лечить лейкодистрофии (как правило, лейкодистрофии, связанные с мутациями гена *fa2h*) или наследственную спастическую параплегию (как правило, наследственную спастическую параплегию SPG35). Оно также позволяет проводить профилактику или лечить диабет, ожирение, злокачественную опухоль или бороться с проблемой фертильности или стерильностью (фиг. 14), и кроме того способствует поддержанию двигательной активности подлежащего лечению индивидуума.

Под "индивидуумом" понимают любое живое существо, для которого такое лечение будет эффективным, независимо от его пола или возраста. Предпочтительно индивидуум представляет собой взрослого индивидуума. Индивидуум может представлять собой насекомое, такое как дрозфила, или животное, например млекопитающее (предпочтительно примата или человека) или грызуна (предпочтительно мышь или крысу).

Предпочтительно индивидуум, у которого i) не экспрессируется представляющая интерес последовательность РНК или экспрессируется аномальный вариант указанной последовательности РНК, ii) представляет собой индивидуума, находящегося в условиях стресса (в частности, индивидуума, достигшего половой зрелости, предпочтительно индивидуума пожилого возраста), таких как голодание, тепловой шок, окислительный стресс (такой как воздействие параквата) или стресс (на уровне кишечника), вызывающий детектируемую клеточную пролиферацию или ослабление регуляции пути Delta/Notch, и/или iii) представляет собой индивидуума, страдающего заболеванием, связанным со старением или которому способствует старение, как правило, дегенеративным заболеванием, в частности нейродегенеративным, ламинопатией, такой как прогерия, ожирением, диабетом, злокачественной опухолью или проблемой способности к оплодотворению (в частности, включая бесплодие или стерильность).

В одном конкретном варианте осуществления геном индивидуума, для которого изобретение будет эффективным, i) не экспрессирует представляющей интерес последовательности РНК, такой как описываемая в настоящем документе, ii) экспрессирует аномальный вариант указанной представляющей интерес последовательности РНК или iii) содержит последовательность ДНК, содержащую мутацию, обуславливающую отсутствие экспрессии или аномальную экспрессию (т.е. нефункциональную) указанной представляющей интерес последовательности РНК.

Нормальный вариант (дикого типа) последовательности ДНК можно выбирать, например, из последовательностей SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 30, идентифицированных ранее. Мутацию, которая может повлиять на нормальный вариант последовательности ДНК, т.е. препятствовать экспрессии представляющей интерес последовательности РНК по изобретению, как правило, выбирают из делеции, добавления и/или замены одного или нескольких нуклеотидов.

Термин "срок жизни" или "продолжительность жизни" относится к продолжительности жизни, к которой индивидуум является запрограммированным как биологический вид, при условии проживания в идеальных условиях и при отсутствии заболевания или травмы. "Максимальный срок жизни" или "максимальная продолжительность жизни" соответствуют максимальной продолжительности жизни, которую могли бы достигать индивидуумы данного вида. На практике оценивают максимальный срок жизни индивидуума по максимальному возрасту, достигаемому одним из представителей популяции. "Средний срок жизни" или "средняя продолжительность жизни" представляют собой возраст, до которого доживает 50% данной популяции.

Широко известный способ оценки эффекта лечения на "увеличение продолжительности жизни" основан на максимальном сроке жизни или среднем сроке жизни. Если лечение значительно увеличивает мак-

симальный или средний срок жизни группы индивидуумов по сравнению с группой контрольных индивидуумов, то считают, что оно вызывает увеличение продолжительности жизни и замедление старения.

У дрозофилы половая зрелость наступает в среднем в возрасте одних суток. Средняя продолжительность жизни составляет приблизительно 30 суток. Максимальная продолжительность жизни находится в диапазоне приблизительно от 60 до 80 суток в зависимости от вида или линии дрозофилы и условий жизни или разведения. У мышей половая зрелость наступает в среднем на 42 сутки после рождения. Средняя продолжительность жизни составляет 832 суток. У человека половая зрелость наступает в период от 9 и 14 лет. Средняя продолжительность жизни составляет 73 года для мужчин и 79 лет для женщин. Максимальная продолжительность жизни на сегодняшний день составляет 122 года, 5 месяцев и 14 суток.

Термин "старение" в контексте настоящего изобретения представляет собой процесс постепенных и спонтанных изменений, происходящих от созревания, в детстве и пубертатном периоде до упадка функций индивидуума. Таким образом, старение включает положительный компонент развития и созревания и отрицательный компонент упадка.

Представляющие интерес последовательности РНК по изобретению увеличивают максимальный или средний срок жизни (или продолжительность жизни) индивидуума. Предпочтительно эти последовательности увеличивают продолжительность жизни и замедляют старение индивидуума или подпопуляции взрослых индивидуумов, определяемое, например, полом и/или возрастом (т.е. минимальным возрастом, или максимальным возрастом, или окном возрастов).

С использованием настоящего изобретения, как правило, можно увеличивать продолжительность жизни дрозофилы, а также млекопитающих, включая мышь, и в частности человека, приблизительно на 50%, даже на 100%, при этом улучшая условия старения.

С использованием последовательностей РНК по настоящему изобретению также можно бороться с "неблагоприятными эффектами старения". В контексте настоящего изобретения это выражение означает отрицательный компонент старения, т.е. упадок функций индивидуума. Прогрессирующий с возрастом упадок физиологических способностей варьируется от одного органа к другому и от одного индивидуума к другому. Физиологический упадок индивидуума приводит к снижению способности реагировать на стимул окружающей среды и повышению восприимчивости и подверженности воздействию заболеваний и нарушениям. Неблагоприятные эффекты старения включают накопление нежелательных изменений, оказывающих влияние на ослабление данного индивидуума и способных ускорять его гибель. Такие изменения можно отнести к развитию, врожденному процессу старения, к возможным генетическим аномалиям, к окружающей среде, а также к заболеваниям, поражающим или поражавшим индивидуума.

Также с использованием настоящего изобретения возможной является профилактика или лечение дегенеративных заболеваний, в частности нейродегенеративных, как правило, дегенеративных заболеваний, поражающих центральную и/или периферическую нервную систему.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретение обеспечивает профилактику или лечение нейродегенеративных заболеваний, связанных с накоплением железа, которые приводят к демиелинизации в головном мозге, в частности нейродегенеративных заболеваний, вызываемых одной или несколькими мутациями гена *fa2h*. Изобретение также позволяет лечить лейкодистрофии (как правило, лейкодистрофии, связанные с мутациями гена *fa2h*) или наследственную спастическую параплегию (как правило, наследственную спастическую параплегию *SPG35*).

В других вариантах осуществления изобретение обеспечивает профилактику или лечение патологии, выбранной из миопатии, болезни Хантера, врожденного дискератоza, синдрома Прадера-Вилли, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, болезни Гентингтона, рассеянного склероза, бокового амиотрофического склероза (SLA).

В другом варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает профилактику или лечение ламинопатий, таких как синдром Хатчинсона-Гилфорда (или прогерия), мандибулоакральная дисплазия (MAD), мышечная дистрофия Эмери-Дрейфуса, атипичный синдром Вернера, рестриктивная дермопатия, летальная фетальная акинезия и LIRLLC (Generalized lipoatrophy, Generalized lipoatrophy, insulin-resistant diabetes, leukomelanodermic papules, liver steatosis and hypertrophic cardiomyopathy), предпочтительно синдром Хатчинсона-Гилфорда.

В еще одном другом варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает профилактику или лечение диабета или ожирения.

Кроме того, его также можно использовать в профилактике или лечении злокачественной опухоли или неопластического процесса. Злокачественная опухоль, как правило, представляет собой злокачественную опухоль, выбранную из карциномы, саркомы, лимфомы, меланомы, опухоли у детей, лейкоз. Злокачественная опухоль может, например, представлять собой рак груди, яичника, эндометрия, простаты, пищевода, толстой кишки, прямой кишки, почки, легких, щитовидной железы, остеосаркому, меланому, лейкоз, нейробластому и т.д.

В одном конкретном варианте осуществления настоящее изобретение является особенно пригодным для борьбы со злокачественной опухолью, индуцированной свободными радикалами, такой как рак толстой кишки и рак желудка.

С использованием продукта по изобретению также можно бороться с проблемами бесплодия или

стерильности. Под "бесплодием" или "стерильностью" понимают затруднение, даже неспособность дать жизнь. В рамках такого использования индивидуум, как правило, является женщиной, достигшей полового созревания и имеющей трудности, например преждевременные, воспроизведения. Как правило, индивидуум является стерильным, бесплодным или характеризуется ранним или преждевременным снижением фертильности. Представляющие интерес последовательности РНК по изобретению обеспечивают лечение бесплодия или восстановление, повышение, усиление или стимуляцию фертильности подлежащего лечению индивидуума.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения патологии, аномалии, нарушения, неблагоприятного эффекта или расстройства, видимого или функционального, связанного с механизмом старения или стрессом, как описано в настоящем документе.

Способы, позволяющие оценивать профилактическую или терапевтическую эффективность тестируемого соединения

Изобретение также относится к способу, позволяющему оценивать косметическую или терапевтическую эффективность тестируемого соединения для борьбы с неблагоприятными эффектами старения или стресса, а также с патологиями, связанными с таким стрессом или механизмом старения, или для борьбы с бесплодием.

Под "тестируемым соединением" подразумевают любое соединение, теоретически участвующее в борьбе с неблагоприятными эффектами старения, со стрессом или с бесплодием. Оно может представлять собой, например, природную или химическую молекулу, металл, облучающее средство и т.д.

Соединение можно тестировать в отношении его возможной терапевтической эффективности, т.е., его способности предотвращать, лечить или содействовать лечению патологий и неблагоприятных эффектов старения или стресса, например ламинапатии, дегенеративного заболевания или злокачественной опухоли, такой как описано выше, в отношении профилактики, лечения или содействия лечению диабета или ожирения, а также в отношении профилактики, лечения или содействия лечению бесплодия.

С другой стороны, соединение можно тестировать относительно его возможной косметической эффективности, т.е., его способности улучшать физический внешний вид индивидуума и, таким образом, бороться с видимым нарушением индивидуума, связанным с механизмом старения. Тестируемое соединение может оказаться, например, эффективным при косметическом лечении эпидермы, волосяного покрова и/или капиллярной системы, ногтей, губ, наружных половых органов, зубов и слизистых оболочек.

В первом варианте осуществления описываемый в изобретении способ включает следующие ниже этапы:

- i) воздействие на клетку, популяцию клеток или ткани, не экспрессирующей последовательность РНК по изобретению или экспрессирующей аномальный вариант указанной последовательности РНК, или на трансгенную мышь по изобретению;
- ii) оценка эффектов, при их наличии, тестируемого соединения на фенотип указанной или указанных клеток, или указанной ткани, или указанной трансгенной мыши и
- iii) определение косметической или терапевтической эффективности указанного тестируемого соединения, где восстановление активности и/или экспрессии указанной последовательности РНК коррелирует с эффективностью указанного тестируемого соединения.

Косметическую или терапевтическую эффективность указанного тестируемого соединения можно оценивать или определять относительно контрольного значения. Это контрольное значение можно устанавливать на уровне активности и/или экспрессии указанной последовательности РНК в клетке, популяции клеток или ткани, не экспрессирующей или экспрессирующей аномальный вариант указанной последовательности РНК, или у трансгенной мыши по изобретению.

Если активность и/или экспрессия указанной последовательности РНК присутствует в клетке, в популяции клеток, в ткани или у трансгенной мыши, на которую(ые) воздействует тестируемым соединением, является выше активности и/или экспрессии последовательности РНК в клетке, популяции клеток или ткани, не экспрессирующей или экспрессирующей аномальный вариант указанной последовательности РНК, или у трансгенной мыши по изобретению, тогда тестируемое соединение обладает косметической или терапевтической эффективностью.

Во втором варианте осуществления описываемый в изобретении способ включает следующие ниже этапы:

- i) воздействие на клетку по изобретению, содержащую последовательность РНК по изобретению, популяцию клеток или ткань, содержащую клетку по изобретению;
- ii) оценка эффектов, при их наличии, тестируемого соединения на фенотип указанной клетки, указанной популяции клеток или указанной ткани и
- iii) определение косметической или терапевтической эффективности указанного тестируемого соединения, где восстановление активности и/или экспрессии указанной последовательности РНК коррелирует с эффективностью указанного тестируемого соединения.

По этому аспекту изобретения контрольное значение можно устанавливать по уровню активности и/или экспрессии указанной последовательности РНК в клетке или популяции клеток, экспрессирующей указанную последовательность РНК.

В этом случае, если активность и/или экспрессия указанной последовательности РНК присутствует в клетке или в популяции клеток, на которую(ые) воздействуют тестируемым соединением, является выше активности и/или экспрессии последовательности РНК в клетке или популяции клеток, экспрессирующих указанную последовательность РНК, то тестируемое соединение обладает косметической или терапевтической эффективностью.

Количественное определение уровня активности и/или экспрессии последовательности РНК можно проводить способами, известными специалисту в данной области, как правило, количественной ПЦР или иммуногистохимией (окрашивание антителами, направленными против генов/белков, регулируемых представляющий интерес мкРНК).

С другой стороны, оценку терапевтического эффекта можно проводить, например, путем определения продолжительности жизни клетки, путем измерения числа клеточных делений и т.д.

Предпочтительно клетка или популяция клеток, на которую(ые) воздействуют тестируемым соединением, происходит из кишечника или яичника. Предпочтительные клетки можно выбирать из клеток, указанных в настоящем документе, как правило, из энтеробластов, энтероцитов, энтероэндокринных клеток, стволовых клеток кишечника, клеток-кормилиц, как правило, клеток-кормилиц яйцевой камеры, овоцита, овобласта и т.д.

Другие аспекты и преимущества настоящего изобретения станут понятны при чтении фигур и примеров, которые следуют ниже, которые следует рассматривать как иллюстративные, а не ограничивающие.

Описание чертежей

Фиг. 1: карта геномной области локуса P[Gal4]4C, позиционирование мкРНК "молодость" и делеции F4.

Фиг. 2: А) мотив кассеты Н/АСА ("Н/АСА box"); В) схема псевдоуридирования. (из Kiss et al., (2010) Molecular Cell, 37, 597-606).

Фиг. 3: срок жизни самок мушек. Совокупное уменьшение (в %) числа живых мушек в зависимости от числа суток. Cont-CS=контрольные мушки дикого типа. F4=мутант F4, G5=мушки, несущие геномный трансген мкРНК G5, F4; G5=мушки, несущие геномный трансген мкРНК G5 в мутантном генофонде F4, для восстановления дикого фенотипа (в скобках - число мушек).

Фиг. 4: тестирование устойчивости к стрессу (тепловой шок, голод, паракват), проводимое на мушках в возрасте 3 суток.

А) Тепловой шок: мутанты F4 являются более устойчивыми, чем контроли (только самки). Мушки, у которых сверхэкспрессируется мкРНК (G5), а также мутантные мушки F4, несущие трансген (F4;G5), являются более устойчивыми, чем контрольные мушки (самцы и самки).

В) Голод: мутанты F4 являются более устойчивыми, чем контроли (самцы и самки). Мушки, у которых сверхэкспрессируется мкРНК (G5), являются более устойчивыми (только самки). Самки мушек-мутантов F4, несущие трансген (F4;G5), являются сходными с контрольными мушками, т.к. происходит восстановление дикого фенотипа трансгеном.

С) Паракват: мутанты F4 являются более устойчивыми, чем контроли (самцы и самки). Мушки, у которых сверхэкспрессируется мкРНК (G5), являются более устойчивыми (только самки). Мутантные мушки F4, несущие трансген (F4;G5), являются сходными с контрольными мушками, т.к. происходит восстановление дикого фенотипа трансгеном.

Фиг. 5: гибридизация in situ на кишечнике и яичниках.

А) На контрольных мушках дикого типа (Canton-S) мкРНК экспрессируется в эпителиальных клетках кишечника. Синим: окрашивание ДНК в ядре Dapi. Красным: окрашивание мкРНК. Следует отметить, что окрашивание мкРНК (красные точки) является четким и дополняющим окрашивание ядра (синее), демонстрируя, что последние локализованы в ядрышке.

В) У мутанта F4 (делеция мкРНК) видно окрашивание синим (dapi), но никакого окрашивания красным, т.к. мкРНК удалена и, таким образом, не экспрессируется.

С) Контрольные мушки дикого типа (Canton-S). мкРНК экспрессируется в клетках-кормилицах яичника.

Д) Мутантные мушки F4. мкРНК не экспрессируется в яичниках.

Фиг. 6: целевая экспрессия мкРНК в эпителиальных клетках кишечника посредством четырех различных пилотных линий Gal4, управляющих экспрессией репортерного гена GFP (UAS-GFP). Детекция экспрессии мкРНК посредством гибридизации in-situ (красным и/или оранжевым) (левая колонка: a1, b1, c1, d1, e1), окрашивания ядра dapi (синим) (вторая колонка: a2, b2, c2, d2, e2), экспрессии GFP иммунным окрашиванием (антитела против GFP, выявляемые FITC (зеленым)) (третья колонка: a3, b3, c3, d3, e3). Конка справа (a4, b4, c4, d4, e4) - совмещение 3 предыдущих изображений, демонстрирующее совместную локализацию. Можно наблюдать двойное мечение только на (А) (Myo1A-Gal4), демонстрирующее, что мкРНК экспрессируется только энтероцитами. А) Целевая экспрессия мкРНК в энтероцитах под контролем Myo1A-Gal4 (Myo1A-Gal4;UAS-mCD8-GFP). В) Целевая экспрессия в энтероцитах Myo1A-Gal4, в мутантном генофонде F4 (Myo1A-Gal4, F4/F4;UAS-мкРНК-8M/+). С) Целевая экспрессия в кишечнике под контролем esg-Gal4 (esg-Gal4,UAS-GFP), метящая стволовые клетки кишечника (ISC). D) Целевая экспрессия в кишечнике под контролем Su(H)-Gal4 (Su(H)-GBE-Gal4;UAS-mCDB-GFP), ме-

тящая энтеробласты. Е) Целевая экспрессия в кишечнике под контролем Delta-Gal4 (D1-Gal4,UAS-GFP), метящая стволовые клетки кишечника (ISC).

Фиг. 7: целевая экспрессия мякРНК в других типах клеток эпителия кишечника посредством трех других различных пилотных линий Gal4, управляющих экспрессией мякРНК (UAS-8M), демонстрирующая, что мякРНК могут экспрессироваться эктопически в других типах клеток.

А) Целевая экспрессия под контролем esg-Gal4 (esg-Gal4, F4/F4;UAS-8M/+).

В) Целевая экспрессия под контролем Su(H)-Gal4 (Su(H)-GBE-Gal4, F4/F4;UAS-8M/+).

С) Целевая экспрессия под контролем Delta-Gal4 (Delta-Gal4,F4/F4;UAS-8M/+).

Фиг. 8: устойчивость различным видам стресса в результате целевой экспрессии (реэкспрессии мякРНК в мутантном генофонде F4) мякРНК в кишечнике мушек в возрасте 3 суток.

А) Голод: целевая экспрессия мякРНК (UAS-8M) под контролем Myo1A-Gal4. Наблюдают выраженное увеличение устойчивости у мушек, у которых экспрессируется мякРНК (Myo,F4/F4; 8M/+), по сравнению с двумя контрольными линиями.

В) Голод: целевая экспрессия мякРНК (UAS-8M) под контролем esg-Gal4. Наблюдают выраженное увеличение устойчивости у мушек, у которых экспрессируется мякРНК (esg,F4/F4; 8M), по сравнению с двумя контрольными линиями.

С) Голод: целевая экспрессия мякРНК (UAS-8M) под контролем Su(H)-Gal4. Наблюдают выраженное увеличение устойчивости у мушек, у которых экспрессируется мякРНК (Su(H),F4/F4; 8M), по сравнению с двумя контрольными линиями.

Д) Тепловой шок при 36°C: целевая экспрессия мякРНК (UAS-8M) под контролем Su(H)-Gal4. Наблюдают выраженное увеличение устойчивости у мушек, у которых экспрессируется мякРНК (Su(H),F4/F4;8M), по сравнению с двумя контрольными линиями.

Фиг. 9: А) гомологи у двенадцати видов дрозофилы, геном которых является известным; В) консенсусная структура 12 видов дрозофилы.

Фиг. 10: гомолог человека на хромосоме 11.

Фиг. 11: 2 гомологичных гена у *Mus musculus* (мышь 1 и мышь 2).

Фиг. 12: гистология головного мозга - видимая нейродегенерация головного мозга мушек в возрасте 40 суток. Контрольные мушки (дикого типа Canton-S) (a1) имеют нейродегенеративные повреждения (вакуоли/отверстия), тогда как мутантные мушки F4 (a2) имели больше повреждений. Мушки, у которых экспрессировалась мякРНК в мутантном генофонде (спасенная: F4;G5) (b1), имели меньше повреждений, чем CS и F4, а также мушки, у которых сверхэкспрессируется мякРНК (G5) (b2). Мутантные мушки F4, у которых реэкспрессировалась мякРНК конкретно в энтероцитах (Myo,F4/F4;UAS-мякРНК) (c2), также имели меньше повреждений, чем мушки, у которых не экспрессировалась (Myo,F4/F4) (c1). На (d) количественное определение повреждений у молодых мушек (в возрасте 4 суток) и старых мушек (в возрасте 40 суток) для этих двух различных генотипов. Все эти результаты демонстрируют, что экспрессия мякРНК защищает от нейродегенеративных повреждений у старых мушек (0, +, ++, +++=степень тяжести повреждений на основании их числа и их площади).

Фиг. 13: сенсорно-моторный параметр (двигательная активность), количественно определяемая по видеомониторингу, представленная здесь в виде расстояния, пройденного в течение 7 ч регистрации. Мушки в возрасте 40 суток являлись сравнимыми с молодыми мушками в возрасте 4 суток. А) Расстояние, пройденное самками. В) Расстояние, пройденное самцами.

Фиг. 14: фертильность мушек (число откладываемых яиц А) самкой/сутки и В) самкой на 17 суток). В целом мутанты F4 откладывают немного больше яиц, чем контроли (CS), но с незначительным запазданием. Экспрессия трансгена (мякРНК) у мутанта F4 (F4;G4 - называемого также F4;4M) снижает фертильность. Сверхэкспрессия трансгена (G4 - называемого также 4M) повышает фертильность (число откладываемых яиц).

Фиг. 15: схема эпителия кишечника (из Jiang and Edgar, Exp. Cell. Res., 2011).

А) Модель регенерации эпителия кишечника у взрослой дрозофилы.

В) Модель функционирования Notch в энтероэндокринных клетках у дрозофилы (эмбрион, личинка, куколка, взрослая форма) и у млекопитающих. DI=Delta, N=Notch, NO=сигнал Notch отсутствует. Эта схема ясно демонстрирует высокое сходство эпителия кишечника дрозофилы и эпителия кишечника человека.

Фиг. 16: механизм обратной связи, регулирующий гомеостаз и регенерацию кишечника (средняя кишка) у дрозофилы (из Jiang and Edgar, Exp. Cell. Res., 2011). (Такие же сокращенные обозначения как для фиг. 15.)

Фиг. 17: мякРНК "молодость" участвует в альтернативном сплайсинге гена CG9339 (skywalker). Проводили сравнительные ОТ-ПЦР на определенных возможных генах-мишенях для исследования, не являются ли неправильно сплайсированными у мутанта F4 некоторые из этих генов по сравнению с таковыми у мушек дикого типа (Control-CS). Кроме того, анализировали 4 транскрипта 345-400-432-462 п.о. гена CG9339 (skywalker). В качестве внутреннего контроля использовали ген gr49 (фрагмент 300 п.о.), а также контроль РНК (без ОТ предварительно) для демонстрации, что используемая РНК не загрязнена следами ДНК. Следует отметить отсутствие малого транскрипта 345 п.о. гена CG9339 (skywalker) у му-

танта F4 (стрелка).

Фиг. 18: мякРНК "молодость" участвует в регуляции уровня РНК двух других генов: *klarsicht* и гена CG30502 (*fa2h*). А) Для гена *klarsicht* амплификация фрагмента 464 п.о. (содержащегося в экзоне) демонстрирует, что присутствует меньше транскрипта продукта у мутанта F4, чем у контрольных мушек дикого типа (Canton-S). В) Для гена *fa2h* амплификация фрагмента 429 п.о. (содержащегося в экзоне) *montre* присутствует меньше транскрипта у мутанта F4, чем у контрольных мушек дикого типа (Canton-S).

Фиг. 19: модель, описывающая роль *klarschit*. А) *klarsicht*, через свой домен KASH, взаимодействует с ламинной, локализованной на внутренней поверхности ядерной мембраны (по Patterson et al., 2004). В) Схематическое представление, демонстрирующее структуру и функцию ядерных ламин. Ламинны локализованы на внутренней поверхности ядерной оболочки и служат для поддержания стабильности ядра, организации хроматина и связывают ядерные поры (NPC). Также схематично изображены многие белков, взаимодействующие с ламинами (по Coutinho et al., Immunity and Ageing, 2009).

Фиг. 20: ортологические последовательности млекопитающих мякРНК "молодость" экспрессируются у мыши и человека (детекция ОБ-ПЦР гомологов мыши и человека). Экспрессия таких мякРНК указывает на то, что они с большой вероятностью являются функциональными. У человека мякРНК 159 п.о. (SEQ ID NO: 2) экспрессируется в кишечнике, головном мозге и незначительно в яичниках и почках (отмечено красной звездочкой для уточнения). У мыши мякРНК-1 129 п.о. (SEQ ID NO:3) экспрессируется только в головном мозге. В противоположность этому мякРНК-2 122 п.о. (SEQ ID NO:4) экспрессируется в кишечнике, головном мозге и яичниках, но не в почках.

Фиг. 21: мушки, мутантные по мякРНК "молодость" (мутант F4) характеризуются гипертрофией жирового тела. Важные изменения последнего наблюдают у старых мушек в возрасте 40 суток по сравнению с их соответствующими контролями, все также в возрасте 40 суток. Эти повреждения выявляют мечением антителом против активированной каспазы 3, которая метит клетки в апоптозе. А) Контрольные мушки "CS": жировое тело, окруженное белой пунктирной линией, является достаточно однородным и ровным. В) Мутантные мушки F4: отмечают крупные агрегаты клеток (белая стрелка). С) У мушек, несущих трансген мякРНК (G5): жировое тело, без агрегатов, сходно с контрольным жировым телом "CS". D) У мушек, несущих трансген G5 в мутантном генофонде F4 (F4;G5), у этих мушек отмечают только несколько агрегатов, и размеры агрегатов являются небольшими, что свидетельствует о частично сохраненном трансгене, повреждения жирового тела вследствие мутации. Эти результаты убедительно свидетельствуют о нарушении метаболизма углеводов и/или липидов.

Экспериментальная часть

1) Генетическая и молекулярная характеристика мякРНК:*F28S-1153 ("молодость") локализованной в локусе P[GAL4]4C.

Этот эксперимент является частью исследования нейронных основ, вовлеченных в двигательное поведение у дрозофилы и изучением отношения структуры и функции центрального комплекса и более конкретно эллипсоидальном теле. В этом контексте скрининг библиотеки линий enhancer-trap P[GAL4] позволил идентифицировать линию P[GAL4]4C, которая конкретно экспрессируется в эллипсоидальном теле (фиг. 1). Различные генетические подходы, в частности целевая экспрессия столбчатого токсина, позволили продемонстрировать, что блокада этих нейронов вызывает дефицит двигательной активности (Martinet et al., 2002). Во-вторых, для более подробной характеристики этих нейронов и для лучшего определения их функции в нейронной сети, участвующей в двигательной активности, проводили генетическую и молекулярную характеристику локуса вставки линии P[GAL4]4C. Проводили ПЦР-спасения, и она позволяла выявлять точку вставки элемента-P P[GAL4]4C на хромосоме 2R (справа: т.е. на правом рукаве) в положении 50A между двумя генами: CG13333 и CG13334 (фиг. 1). Затем, для выявления фенотипа и соответствующей функции этих двух генов получали мутации этих генов путем повторного удаления элемента-P (посредством генетического подхода, называемого: "jump-out" или ревертрант). Также получали небольшую делецию 632 пар оснований (п.о.), называемую F4 (фиг. 1). мякРНК A28S-1153 предварительно идентифицировали в этом локусе в положении 67331 (фиг. 1) в ходе систематического скрининга, проводимого Huang et al., (2005), всех возможных малых ядрышковых ДНК (мякРНК) в геноме дрозофилы. Однако в соответствующей статье не выделяют какой-либо конкретной мякРНК и главным образом не ассоциируют какую-либо функцию с мякРНК A28S-1153. В контексте настоящего изобретения эту мякРНК, в которой отсутствует небольшая делеция F4, точно локализовали и характеризовали со структурной и функциональной точек зрения. Таким образом, эта мякРНК состоит из 148 пар оснований (п.о.), и ее структура содержит кассету H/ACA (H/ACA box).

2) Фенотипическая характеристика делеции F4: снижение продолжительности жизни.

Параллельно с исследованием, проводимым для количественного определения двигательной активности мушек, посредством целевой экспрессии столбчатого токсина в кольцевых нейронах, отличающих линию P[GAL4]4C, автор изобретения наблюдал, что эти мушки имели очень низкую продолжительность жизни, и решил точно количественно определить указанную продолжительность жизни мушек P[GAL4]4C/UAS-tetanus-toxin, а также продолжительность жизни мушек F4 (мутантных в локусе 4C). Таким образом, мушки F4 характеризуются сниженной продолжительностью жизни (приблизительно на 30% по сравнению с контрольными мушками дикого типа), что подтверждает, что делеция мякРНК мо-

жет влиять на продолжительность жизни (срок жизни) (фиг. 3). Авторы изобретения также наблюдали, что этот эффект различается в зависимости от пола мушек, где эффект является более выраженным у самок, чем у самцов.

3) Генез трансгенной линии, содержащей геномную область мякРНК ("молодость") для восстановления фенотипа дикого типа ("спасение" или "rescue").

Для демонстрации того, что фенотип мутанта F4 обусловлен делецией мякРНК, получали линию трансгенной дрозофилы, содержащую последовательность геномной ДНК 1723 п.о. области (от 66377 до 68100), содержащую мякРНК (фиг. 1) и ее регуляторные последовательности. Более конкретно, ПЦР амплифицировали фрагмент геномной ДНК области 1723 п.о. PCR и встраивали по участку рестрикции XbaI в вектор pCaSpeг-4 (где последний не содержит кокой-либо промоторной/регуляторной последовательности). Затем стандартным способом получали трансгенных мушек и получали линии мушек, экспрессирующих один и тот же трансген, но встроенный в различные места генома (независимые вставки: G4, G5).

Затем для подтверждения того, что, если трансген является функциональным и может спасти (rescue) мутацию F4 (т.е. восстанавливать дикий фенотип, может восстанавливать продолжительность жизни, эквивалентную продолжительности жизни, наблюдаемой без делеции F4), автор изобретения вводил эти трансгенные линии в мутантный генетический фон F4 путем стандартных генетических скрещиваний (F4;G4 и F4;G5). Таким образом, можно было демонстрировать, что трансген может спасти фенотип, обусловленный мутацией, вызывающей снижение продолжительности жизни (фиг. 3) (см., например: F4 в сравнении с F4;G5). Кроме того, этот трансген, помещаемый в геном дикого типа (нормальный), что соответствует сверхэкспрессии этой мякРНК, т.к. теперь присутствует 4 копии мякРНК вместо двух эндогенных копий (G5), увеличивает продолжительность жизни (даже удваивает продолжительность жизни в случае F4;G5 или увеличивает приблизительно на 30% для G5) (фиг. 3). Таким образом, этот эксперимент ясно демонстрирует, что можно увеличивать продолжительность жизни животного посредством сверхэкспрессии этой мякРНК (или модификацией ее уровня экспрессии). Таким образом, небольшая геномная делеция области (632 пар оснований, называемой F4) (фиг. 1), соответствующей или эквивалентной мутации этого гена, укорачивает продолжительность жизни, тогда как сверхэкспрессия (в результате трансгена, содержащего геномную ДНК этой мякРНК) посредством генетической терапии не только спасает мутацию, но и наглядно увеличивает (удваивает) продолжительность жизни индивидуума, получающего обработку (фиг. 3).

4) Тестирования устойчивости к стрессу.

В настоящее время широко признано, что гены, действующие на срок жизни, также повышают устойчивость к стрессу. Автор изобретения верифицировал и получал подтверждение того, что сверхэкспрессия этой мякРНК действительно может увеличивать продолжительность жизни рассматриваемого индивидуума в условиях стресса, такого как голод, тепловой шок и окислительный стресс (вызываемый паракватом) (фиг. 4).

А) Тестирование устойчивости к теплу (тепловой шок: heat-shock test).

Самцов и самок выращивают вместе в стандартных пробирках, содержащих корм, в течение 3 суток. В возрасте 3 суток самцов и самок распределяют отдельно по группам по 20 в стандартной пробирке, содержащей корм. Для того чтобы подвергать мушек тепловому шоку (heat-shock) пробирки, содержащие мушек, помещают в инкубатор при 36°C. Каждые 6 часов подсчитывают количество погибших мушек. По отношению к тепловому шоку (36°C) на фиг. 4А следует отметить, что мутантные мушки F4 (только самки) являются более устойчивыми, чем контрольные мушки. Однако мушки G5 (самцы и самки) являются более устойчивыми, чем контроли и мутант F4, тогда как вследствие экспрессии трансгена G5 в мутанте F4 (мушки F4;G5) являются также гораздо более устойчивыми, чем контрольные мушки и мутантные мушки F4.

В) Тестирование голодом.

Так же, как и для тестирования устойчивости к теплу, самцов и самок выращивают вместе в стандартных пробирках, содержащих корм, в течение 3 суток. В возрасте 3 суток самцов и самок распределяют отдельно по группам по 20 в стандартной пробирке, содержащей только фильтровальную бумагу и 400 мкл воды, чтобы предотвратить обезвоживание. Мушек хранят во влажной комнате при 24°C и каждые 6 ч подсчитывают количество погибших мушек. Касательно голода на фиг. 4В следует отметить, что мутантные мушки F4 (самцы и самки) являются более устойчивыми, чем контрольные мушки. Кроме того, мушки G5 (самки) являются еще более устойчивыми, тогда как экспрессия трансгена в мутанте F4 (F4;G5) восстанавливает нормальную выживаемость (у самок).

С) Устойчивость к окислительному стрессу (паракват).

Паракват (1,1'-диметил-4,4'-бипиридинийдихлорид) восстанавливает NADH, что приводит к генерации свободных радикалов параквата, которые взаимодействуют с кислородом с образованием ROS (reactive oxygen species). Таким образом, ROS вызывают повреждения клеток (Rzezniczak et al., 2011). Так же, как и для двух предшествующих тестов самцов и самок выращивают вместе в стандартных пробирках, содержащих корм, в течение 3 суток. В возрасте 3 суток самцов и самок распределяют отдельно по группам по 20 в стандартную пустую пробирку для того, чтобы их подвергать голоду в течение 6 ч. За-

тем мушек переносят в пробирку, содержащую фильтровальную бумагу и 450 мкл параквата, 20 mM разведенного в сахарозе до 1% сахарозы для облегчения приема пищи. Мушек хранят во влажной комнате при 24°C и каждые 6 ч подсчитывают количество погибших мушек.

Касательно окислительного стресса на фиг. 4С следует отметить, что мутантные мушки F4 (только самки, хотя отмечают значительную тенденцию также для самцов) являются более устойчивыми, чем контрольные мушки. Аналогично самки мушек G5 являются более устойчивыми, чем контроли, и сходны с мутантами F4, тогда как экспрессия трансгена в мутанте F4 (F4;G5) восстанавливает выживаемость мушек (равную контрольными мушками).

Таким образом, мутантные мушки F4 являются более устойчивыми, чем контрольные мушки, тогда как сверхэкспрессия (G5) еще больше увеличивает устойчивость (эффект более выраженный и устойчивый у самок по сравнению с самцами). Кроме того, в двух тестах (голод и окислительный стресс) экспрессия трансгена в мутанте F4 (F4;G5) восстанавливает, в частности у самок, выживаемость мушек. Таким образом, в отличие от срока жизни, где мутация F4 снижает продолжительность жизни, мутация F4 увеличивает устойчивость в трех тестах стресса, проводимых на молодых мушках в возрасте трех суток, и этот эффект можно восстанавливать геномным трансгеном мякРНК (в двух тестах). В заключение, модуляция экспрессии (подавление, снижение или повышение) мякРНК "молодость" модифицирует продолжительность жизни тестируемых индивидуумов.

5) Определение пространственно-временного профиля экспрессии мякРНК (гибридизация *in situ*).

Для определения, в каких клетках и/или тканях экспрессируется и действует представляющая интерес мякРНК, определяли пространственно-временной профиль экспрессии этой мякРНК в рамках изобретения у взрослых мушек гибридизацией *in situ* (HIS) с использованием антисмыслового зонда мякРНК. Для амплификации маркера использовали тирамид. Как у самцов, так и у самок мякРНК "молодость" экспрессируется в стенке (эпителий) кишечника (фиг. 5А), тогда как, как и ожидалось, она отсутствует у мутанта F4 (фиг. 5В). Более конкретно, использование конкретных линий P[Gal4] различных типов клеток кишечника в сочетании с двойным мечением позволяло демонстрировать, что мякРНК "молодость" экспрессируется конкретно в ядрышке энтероцитов основных и преобладающих клеток, образующих кишечный эпителий (фиг. 6А), тогда как она не экспрессируется в других типах клеток (фиг. 6В, С, D, E). Кроме того, у самок она также экспрессируется в яичниках и более конкретно в клетках-кормилицах (*nurse cells*) (фиг. 5С и D).

6) Целевая экспрессия мякРНК в других типах клеток эпителия кишечника.

Проводили целевую экспрессию (эктопическая) мякРНК (UAS-8M) в других типах клеток эпителия кишечника с использованием трех других различных пилотных линий Gal4: *esg-Gal4* (*esg-Gal4,F4/F4;UAS-8M/+*) и *Delta-Gal4* (*Delta-Gal4,F4/F4;UAS-8M/+*), определяющие стволовые клетки кишечника (ISC), тогда как *Su(H)-Gal4* (*Su(H)-GBE-Gal4, F4/F4; UAS-8M/+*) определяют энтеробласты (фиг. 7). Эти результаты демонстрируют, что: 1) мякРНК могут экспрессироваться эктопически в других типах клеток, 2) такая эктопическая экспрессия также увеличивает устойчивость к определенным видам стресса (фиг. 8). Таким образом, эти результаты демонстрируют, что мякРНК также может обеспечивать защиту, когда она экспрессируется в других типах клеток эпителия кишечника.

7) Целевая экспрессия (селективная) мякРНК, приводящая к спасению устойчивости к стрессам.

Автор изобретения продемонстрировал двумя независимыми подходами, что целевая экспрессия в клетки кишечника является достаточной для восстановления фенотипа устойчивости к стрессам. Способом гибридизации *in situ*, проводимым на трансгенных геномных линиях (которые увеличивают срок жизни: G5, так же как и с другой независимой вставкой, G4), удалось продемонстрировать, что мякРНК экспрессируется в клетках кишечника и что экспрессии мякРНК в клетках кишечника является достаточной для регуляции срока жизни.

Для подтверждения этого первого результата мякРНК метили только в клетках кишечника с использованием бинарной системы экспрессии P[Gal4]. Конструировали плазмидный вектор (p[UAS-мякРНК]), в котором помещали представляющую интерес мякРНК (только 148 п.о.) под контролем регуляторных элементов (Upstream Activating Sequence: UAS) Gal4. Затем получали линии трансгенных мушек (UAS-мякРНК: 4M, 5M и 8M). Для целевой экспрессии использовали называемые "пилотными" линии трансгенных мушек, содержащих трансген (pChs-Gal4) (линии плазмидных векторов Myo1A-Gal4, *esg-Gal4* (улитка-6a14), *Su(H)-GBE-Gal4*, *etDl-Gal4* (Delta-Gal4)), которые, как известно, экспрессируются, в частности, в клетках кишечника (Jiang and Edgar, 2011; Takashima et al., 2011). Затем эти различные трансгены помещали в мутантный генофонд F4 и гибридизацией *in situ* удалось продемонстрировать, что мякРНК хорошо экспрессируется в этих различных типах клеток кишечника (фиг. 6 и 7) в результате своей целевой экспрессии (*esg-Gal4,F4/F4; UAS-мякРНК-8M*) (*Myo1A-Gal4,F4/F4; UAS-мякРНК-8M*) (*Su(H)-GBE-Gal4, F4/F4 ; UAS-мякРНК-8M*) (*F4/F4; Delta-Gal4,UAS-мякРНК-8M*). Результаты демонстрируют, что такая целевая экспрессия (в мутанте F4) по существу восстанавливает фенотип устойчивости к стрессу (голоду и тепловому шоку) (фиг. 8).

Эти эксперименты ясно демонстрируют, что манипуляция этой мякРНК в клетках кишечника и более конкретно в энтероцитах является необходимой и достаточной для восстановления устойчивости к стрессу. Эти эксперименты, несмотря на то, что проведены на дрозофиле, позволяют предположить, что

резэкспрессия (восстановление экспрессии или спасение) или сверхэкспрессия мякРНК в эпителиальных клетках кишечника может приводить к увеличению продолжительности жизни у млекопитающих, и в частности у человека.

8) Идентификация гомологов последовательности "молодость" у других видов дрозофилы и у млекопитающих, таких как мышь и человек.

Исследования гомологии последовательностей продемонстрировали, что эти мякРНК также существуют у 11 других видов дрозофил, геном которых является доступным (фиг. 9А) (см. также консенсусную структуру 12 видов дрозофилы: фиг. 9В).

Кроме того, исследование гомологии, и в частности через структуру РНК (с использованием программного обеспечения "INFERNAL"), позволило идентифицировать гомолог у человека, локализованный на хромосоме 11 в положении: 12822722-12822811 (фиг. 10). У мыши также были идентифицированы два гомолога: на хромосоме 15 положения 3033688 9-30337017 и на хромосоме 18 положения: 6495012-6495091 (фиг. 11А и В).

Как и у дрозофилы, с большой вероятностью сверхэкспрессия этого гена и/или синтетического аналога (либо генетически, либо при пероральном введении, либо посредством инъекции) увеличивает продолжительность жизни у человека. Такая экспрессия также способна защищать от неблагоприятных эффектов различных дегенеративных заболеваний.

9) Роль мякРНК в нейродегенерации и нейропротекции Исследовали мушек F4 со сниженной продолжительностью жизни, при этом мушки, у которых сверхэкспрессируется мякРНК (G5), живут дольше, старых мушек (в возрасте 40 суток) для подтверждения возможного наличия у них нейродегенеративных повреждений (наличия отверстий более или менее многочисленных и размера более или менее значимого в головном мозге). В целом у контрольных мушек (Canton-S) приблизительно 60% мушек характеризовались повреждениями (но следует подчеркнуть, что 50% мушек CS уже погибают на 40 сутки) (фиг. 12), для точности: см. фиг. 12d для полуколичественного анализа. У мутантов F4 все мушки (100%) характеризуются повреждениями, и повреждения являются, как правило, более тяжелыми, чем повреждения контролей (размер и число отверстий), тогда как мушки F4;G5 характеризуются заметно меньшими отверстиями (приблизительно только 10% мушек), где размер последних также является заметно меньше. Наконец, у мушек G5 приблизительно тот же процент мушек, что контроли CS, характеризуется повреждениями (приблизительно 40%), но эти повреждения являются заметно менее тяжелыми (фиг. 12d). Таким образом, геномный трансген (F4;G5) спасает (частично) фенотип нейродегенерации, тогда как сверхэкспрессия мякРНК (G5) защищает от нейродегенерации.

10) Роль мякРНК в защите сенсорно-моторных параметров Аналогично, для исследования, оказывает ли эффект нейропротекция, обеспечиваемая мякРНК, на определенные физиологические параметры, такие как сенсорно-моторные параметры, количественно определяли двигательную активность мушек в возрасте 40 суток (посредством видеоотслеживания) (Martin, 2004), затем сравнивали с двигательной активностью молодых мушек в возрасте 4 суток (фиг. 13). Сначала наблюдают очень большую разницу между мушками в возрасте 4 суток и мушками в возрасте 40 суток; мушки в возрасте 40 суток проходят расстояние приблизительно в три раза меньше, чем расстояние, проходимое мушками в возрасте 4 суток. Однако старые мушки в возрасте 40 суток, мушки, у которых сверхэкспрессируется мякРНК (G5), проходят больше, чем контрольные мушки (Canton-S), мутанты F4 и мушки, у которых экспрессируется мякРНК в мутантном генофонде (F4;G5). Этот эффект является более заметным у самцов, чем у самок. В заключение, на старых мушках в возрасте 40 суток видно, что мушки, у которых сверхэкспрессируется мякРНК, обладают лучшими сенсорно-моторными характеристиками, чем контрольные мушки. Эти результаты демонстрируют защитный характер мякРНК в отношении неблагоприятных эффектов, связанных с механизмами старения.

11) Исследование функции мякРНК в яичниках: роль в фертильности (воспроизведении).

У самок мякРНК также экспрессируется в яичниках и более конкретно в клетках-кормилицах (фиг. 5С, D). Авторы изобретения также продемонстрировали, что мутантные мушки (F4) также характеризуются модификациями фертильности (воспроизводящего фенотипа). Мушки F4 откладывают немного больше яиц, чем контрольные мушки (CS) (фиг. 14). Мушки, несущие мякРНК в мутантном генофонде (F4;G4), откладывают намного меньше яиц (пониженная фертильность), тогда как мушки, у которых сверхэкспрессируется мякРНК (G4), откладывают намного больше яиц, чем контрольные мушки (фиг. 14). Эти результаты демонстрируют неопровержимо важный эффект, оказываемый мякРНК в яичниках, и его влияние на фертильность самок.

12) Лечение мякРНК (введение пероральным путем или посредством инъекции).

мякРНК можно вводить пероральным путем (per os) или посредством инъекции. Другие пути введения, такие как, например, ингаляция и местное нанесение/на кожу, также являются применимыми в зависимости от типа используемого вектора.

Как это демонстрируют эксперименты, проводимые в рамках изобретения, пероральное введение мякРНК является возможным, учитывая ее стабильность и устойчивость *in vitro*, а также ее способность действовать локально на клетки стенки кишечника (энтеробласты, энтероциты, ISC). Как объясняется выше, введение представляющей интерес мякРНК также может обеспечивать экспрессию, отсутствующую

щую в другом случае (или, другими словами, спасти существование мутации) или при необходимости обеспечивает сверхэкспрессию для защиты стенки кишечника от агрессивных факторов, сохраняя при этом лучшее эндокринное и метаболическое равновесие.

13) Лечение злокачественной опухоли.

У млекопитающих, так же, как у дрозофилы, было продемонстрировано, что гены *delta/notch* регулируют дифференциацию клеток-предшественников кишечника (*gut*), тогда как путь сигнального каскада *Wnt* участвует в поддержании и пролиферации ISC. Аналогично путь сигнального каскада цитокинов (*Upd/Jak/Stat*), так же, как и путь сигнального каскада *EGFR* (*Epidermal Growth Factor Receptor*), регулирует пролиферацию ISC (фиг. 15-16) (Jiang and Edgar, 2011; Takashima et al., 2011).

Эксперименты авторов изобретения демонстрируют, что представляющая интерес мЯКРНК по изобретению способна регулировать определенные гены, такие как гены *notch*, *delta*, *JNK*, *EGFR* и т.д. (фиг. 15), нарушение регуляции которых может приводить к гиперпролиферации кишечного эпителия и, таким образом, к злокачественным опухолям (Jiang and Edgar, 2011; Takashima et al., 2011). В частности, представляющая интерес мЯКРНК по изобретению способна оказывать профилактическое действие или лечить злокачественную опухоль благодаря своей способности регулировать экспрессию *EGFR*, где путь сигнального каскада *EGFR* в регуляции пролиферации ISC в кишечнике дрозофилы и млекопитающих является, в частности, высококонсервативным (фиг. 16) (в настоящее время многие виды терапии проходят клиническое испытание для лечения злокачественной опухоли толстой кишки, среди которых, в частности, два моноклональных антитела против *EGFR* (*Cetuximab* и *Panitumumab*) (Amado et al., 2008; Di Nicolantonio et al., 2008)).

14) Участие представляющей интерес мЯКРНК ("молодость") в синдроме Хатчинсона-Гилфорда (HGPS), также известного под названием прогерия, который заключается в преждевременном и ускоренном старении человека.

Авторы изобретения продемонстрировали, что мЯКРНК "молодость" регулирует сплайсинг (количество сплайсированной РНК) гена *klarsicht* (фиг. 18A). Было продемонстрировано, что последний взаимодействует с ламинной (Patterson et al., 2004), белком, локализованным на внутренней мембране ядра и вовлеченным в прогерия (заболевание, вызывающее преждевременное и ускоренное старение человека) (фиг. 18B). Прогерия представляет собой редкое заболевание, поражающее приблизительно 1 индивидуума на 8 млн (Scaffidi and Misteli, 2006; Broers et al., 2006; Cohen et al., 2001; Cau et al., 2014; Coutinho et al., 2009). мЯКРНК "молодость" вследствие своего фенотипа (участие в продолжительности жизни) и своего участия в регуляции гена *klarsicht* обеспечивает новую перспективу лечения ламинопатий, таких как синдром Хатчинсона-Гилфорда или прогерия, мандибулоакральная дисплазия (MAD), мышечная дистрофия Эмери-Дрейфуса, атипичный синдром Вернера, рестриктивная дермопатия, летальная фетальная акинезия и LIRLLC (Generalized lipoatrophy, Generalized lipoatrophy, insulin-resistant diabetes, leukomelanodermic papules, liver steatosis and hypertrophic cardiomyopathy) (Hutchison, 2002; Broers et al., 2006), в частности синдром Хатчинсона-Гилфорда (прогерия).

15) Участие представляющей интерес мЯКРНК ("молодость") в регуляции сплайсинга гена *fatty acid 2-hydroxylase* (*fa2h*) и, как следствие, в различных формах нейродегенерации, ассоциированной с этим геном.

Авторы изобретения продемонстрировали, что мЯКРНК "молодость" регулирует сплайсинг (количество сплайсированной РНК) гена *CG30502*, кодирующего 2-гидроксилазу жирной кислоты или "*fatty acid 2-hydroxylase*" (*fa2h*) (фиг. 18B). Этот ген вовлечен в процесс биосинтеза жирных кислот и более конкретно в процесс метаболизма сложных липидов, таких как сфинголипиды и церамиды (Carvalho et al., 2010). У человека этот ген *fa2h* был ассоциирован с различными формами нейродегенерации (которые приводят к демиелинизации в головном мозге), такой как формы нейродегенерации, связанные с накоплением железа в головном мозге, определенные лейкодистрофии и, наконец, наследственная спастическая параплегия (SPG35) (Krueger et al., 2010; Pierson et al., 2012; Schneider and Bhatia, 2010). Вследствие своего фенотипа (участие в продолжительности жизни и/или гипертрофии жирового тела, наблюдаемого у мутанта F4) и своего участия в регуляции гена *fa2h* мЯКРНК "молодость" обеспечивает новую перспективу лечения указанных выше нейродегенеративных заболеваний.

16) Метаболическое и нейроэндокринное отношение кишечника и головного мозга (система головной мозг-кишечник).

Как указано выше, мутанты мЯКРНК (F4) характеризуются гипертрофией жирового тела, видимой как в брюшной полости, так и вокруг головного мозга в головной капсуле (фиг. 21). Кроме того, количественное определение триглицеридов позволяло подтверждать эту гипертрофию (где определение мушек называют "страдающие ожирением"). Этот фенотип подтверждает метаболическую и/или нейроэндокринную взаимосвязь экспрессии мЯКРНК в кишечнике, нейродегенеративных повреждений и увеличения продолжительности жизни. Более конкретно, такое метаболическое нарушение подтверждает участие пути сигнального каскада инсулина, где для последнего много раз описано, что он участвует в продолжительности жизни дрозофил (Tatar et al., 2001; Bai et al., 2012; Partridge et al., 2011; Fontana et al., 2010). Иммуногистохимические маркеры, направленные против активированной каспазы 3, позволили продемонстрировать у взрослых дрозофил, что жировое тело, локализованное на периферии головного мозга,

является в значительной степени нарушенным (т.е. гипертрофированным) у мутантов F4, тогда как оно защищено сверхэкспрессией мякРНК (трансгены G5), так же, как и во время спасения (восстановление экспрессии) (F4;G5) (фиг. 21). Эти результаты демонстрируют, что мякРНК защищает организм, в котором она экспрессируется, от изменений жирового тела, и, таким образом, от распространения ожирения. Кроме того, эксперименты генетических взаимодействий (двойные мутанты), в которых используют мутации рецептора инсулина (InR) и мутанта F4, демонстрирующего, что мутация мякРНК может спасти, по меньшей мере частично, фенотип мутации рецептора инсулина (см. фиг. 21 и подписи к ней). Эти результаты демонстрируют, что существование связей (независимо прямых или не прямых) между путем сигнального каскада инсулина, мякРНК и сроком жизни. Эти предшествующие результаты демонстрируют, что мутация и/или нарушение регуляции мякРНК нарушает метаболизм углеводов (глюкоидов) и липидов.

Таким образом, мякРНК "молодость" обеспечивает новую перспективу лечения диабета, такого как ожирение.

17) Экспрессия представляющей интерес мякРНК ("молодость") у человека и мыши.

Посредством подхода ОТ-ПЦР авторы изобретения продемонстрировали существование гомологичных последовательностей и более конкретно ортологичных последовательностей для мякРНК "молодость" (сначала идентифицированных у дрозофилы), конкретно экспрессирующихся у млекопитающих (фиг. 20). У человека мякРНК 159 п.о. (SEQ ID NO: 2) экспрессируется в кишечнике, головном мозге и незначительно в яичниках и почках. У мыши мякРНК-1 del29 п.о. (SEQ ID NO: 3) экспрессируется только в головном мозге, и мякРНК-2 122 п.о. (SEQ ID NO: 4) экспрессируется в кишечнике, головном мозге и яичниках, но не в почках. Эти данные подтверждают экспрессию, скорее всего, функциональную, этих мякРНК как у человека, так и у мыши.

Ссылки.

Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD (2008). Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer./Clin Oncol, 26, 1626-1634.

Bai H, Kang P, Tatar M. (2012). Drosophila insulin-like peptide-6 (dilp6) expression from fat body extends lifespan and represses secretion of Drosophila insulin-like peptide-2 from the brain. Aging Cell., 11, 978-985.

Brand AH, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes.

Development 118, 401-415

Broers JL, Ramaekers FC, Bonne G, Yaou RB, Hutchison CJ (2006). Nuclear lamins: laminopathies and their rôle in prématuré ageing. *Physiol Rev.*, 86, 967-1008.

Carvalho M, Schwudke D, Sampaio JL, Palm W, Riezman I, Dey G, Gupta GD, Mayor S, Riezman H, Shevchenko A, Kurzchalia TV, Eaton S. (2010) Survival strategies of a sterol auxotroph. *Development*, 137, 3675-3685.

Cau P, Navarro C, Harhour K, Roll P, Sigaudy S, Kaspi E, Perrin S, De Sandre-Giovannoli A, Lévy N. (2014). Nuclear matrix, nuclear envelope and prématuré aging syndromes in a translational research perspective. *Semin Cell Dev Biol.*, 28, S1084-9521(14)00058-5.

Cohen M, Lee KK, Wilson KL, Gruenbaum Y. (2001). Transcriptional repression, apoptosis, human disease and the functional évolution of the nuclear lamina. *Prends Biochem Sci.*, 26, 41-47.

Coutinho HD1, Falcão-Silva VS, Gonçalves GF, da Nóbrega RB (2009). Molecular ageing in progeroid syndromes: Hutchinson-Gilford progeria syndrome as a model. *Immun Ageing*, 20, 6:4.

Dick, K. J., Al-Mjeni, R., Baskir, W., Koul, R., Simpson, M. A., Patton, M. A., Raeburn, S., Crosby, A. H. (2008). A novel locus for an autosomal récessive hereditary spastic paraplegia (SPG35) maps to 16q21-q23. *Neurology* 71: 248-252.

Dick, K. J., Eckhardt, M., Paisan-Ruiz, C, Alshehhi, A. A., Proukakis, C, Sibtain, N. A., Maier,

H., Sharifi, R., Patton, M. A., Bashir, W., Koul, R., Raeburn, S., Gieselmann, V., Houlden, H., Crosby, A. H. (2010). Mutation of FA2H underlies a complicated form of hereditary spastic paraplegia (SPG35). *Hum. Mutât.* 31: E1251-1260.

Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, De Dosso S, Mazzucchelli L, Frattini M, Siena S, Bardelli A (2008). Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *Clin Oncol*, 26, 5705-5712.

Elliott DA, Brand AH. (2008) The GAL4 System: a versatile

System for the expression of genes. *Methods Mol Biol*, 420, 79-95.

Fontana L, Partridge L, Longo VL (2010). Extending healthy life span - from yeast to humans.

Science, 328, 321-326.

Huang ZP, Zhou H, He HL, Chen CL, Liang D, Qu LH. (2005) Genome-wide analyses of two families of snoRNA genes from *Drosophila melanogaster*, demonstrating the extensive utilization of introns for coding of snoRNAs. *RNA*, 11, 1303-1316.

Hutchison CJ. (2002). Lamins: building blocks or regulators of gene expression? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 848-858.

Jiang H, Edgar BA (2011). Intestinal stem cells in the adult *Drosophila* midgut. *Exp Cell Res*. 317, 2780-2788.

Kruer MCI, Paisân-Ruiz C, Boddaert N, Yoon MY, Hama H, Gregory A, Malandrini A, Woltjer RL, Munnich A, Gobin S, Polster BJ, Palmeri S, Edvardson S, Hardy J, Houlden H, Hayflick SJ. (2010). Defective FA2H leads to a novel form of neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA). *Ann Neurol*, 68, 611-618.

Martin, JR, Faure, P, Ernst, R (2002). The Power Law Distribution for Walking-Time Intervals Correlates with the Ellipsoid Body in *Drosophila*. *J, Neurogenetics*, 15, 1-15.

Martin, JR (2004). A portrait of locomotor behaviour in *Drosophila* determined by a video-tracking paradigm. *Behav. Process*, 67, 207-219.

Partridge L, Alic N, Bjedov I, Piper MD (2011). Ageing in *Drosophila*: the rôle of the insulin/Igf and TOR signalling network. *Exp Gerontol.*, 46, 376-381.

Patterson KL, Molofsky AB, Robinson C, Acosta S, Cater C, Fischer JA. (2004) The functions of Klarsicht and nuclear lamin in developmentally regulated nuclear migrations of photoreceptor cells in the *Drosophila* eye. *Mol Biol Cell.*, 15, 600-610.

Pierson TM1, Simeonov DR, Sincan M, Adams DA, Markello T, Golas G, Fuentes-Fajardo K, Hansen NF, Cherukuri PF, Cruz P, Mullikin JC, Blackstone C, Tifft C, Boerkoel CF, Gahl WA. (2012) Exome sequencing and SNP analysis detect novel compound

heterozygosity in fatty acid hydroxylase-associated neurodegeneration. *Eur J Hum Genet.*, 20, 476-479.

Rzezniczak TZ, Douglas LA, Watterson JH, Merritt TJ. (2011) Paraquat administration in *Drosophila* for use in metabolic studies of oxidative stress. *Analytical Biochem.*, 419, 345-7.

Scaffidi P, Misteli T. (2006) Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science*, 312, 1059-1063.

Schneider SA, Bhatia KP. (2010) Three faces of the same gene: FA2H links neurodegeneration with brain iron accumulation, leukodystrophies, and hereditary spastic paraplegias. *Ann Neurol.*, 68, 575-577.

Takashima S, Adams KL, Ortiz PA, Ying CT, Moridzadeh R, Younossi-Hartenstein A, Hartenstein V (2011). Development of the *Drosophila* entero-endocrine lineage and its specification by the Notch signaling pathway. *Dev Biol*, 353, 161-172.

Tatar M, Kopelman A, Epstein D, Tu MP, Yin CM, Garofalo RS (2001). A Mutant *Drosophila* Insulin Receptor Homolog That Extends Life-Span and Impairs Neuroendocrine Function. *Science*, 292, 107.

Uytterhoeven V, Kuenen S, Kasprowicz J, Miskiewicz K, Verstreken P (2011). Loss of skywalker reveals synaptic endosomes as sorting stations for synaptic vesicle proteins. *Cell*, 145, 117-132.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенная или синтетическая последовательность РНК, используемая в качестве лекарственного средства для борьбы с неблагоприятными эффектами старения или стресса у индивидуума, нуждающегося в этом, представляющая собой выделенную или синтетическую последовательность малой ядерной РНК (мякРНК), содержащую последовательность SEQ ID NO: 1 или ортологичную последовательность.

2. Последовательность РНК по п.1, отличающаяся тем, что указанная ортологичная последовательность принадлежит человеку и соответствует последовательности SEQ ID NO: 2 или принадлежит мыши и соответствует последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4.

3. Последовательность РНК по п.1 или 2 для повышения устойчивости к стрессу у индивидуума.

4. Последовательность РНК по любому из пп.1-3 для профилактики или лечения у индивидуума дегенеративного заболевания, в частности нейродегенеративного заболевания, ламинарии, диабета, ожирения или злокачественной опухоли.

5. Последовательность РНК по п.4, где злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль, вызываемую свободными радикалами.

6. Последовательность РНК по п.1 или 2 для лечения бесплодия или стимуляции фертильности индивидуума.

7. Последовательность РНК по любому из пп.3-6, отличающаяся тем, что индивидуум представляет собой животное или насекомое, как правило, млекопитающее, предпочтительно человека, еще более предпочтительно индивидуума, у которого не экспрессируется последовательность РНК по п.1 или 2 или экспрессируется аномальный вариант указанной последовательности РНК, где индивидуум подвергается условиям стресса, таким как голод, тепловой шок или окислительный стресс, и/или индивидуум страдает дегенеративным заболеванием, ламинарией, диабетом, ожирением, злокачественной опухолью или проблемой с фертильностью.

8. Последовательность РНК по п.7, отличающаяся тем, что геном индивидуума, не экспрессирующий последовательность РНК, охарактеризованную в п.1 или 2, или экспрессирующий аномальный вариант указанной последовательности РНК, содержит последовательность ДНК, содержащую мутацию, где указанная последовательность является последовательностью дикого типа, выбранной из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8, и указанная мутация предпочтительно выбрана из делеции, замены или добавления одной или нескольких пар оснований.

9. Последовательность ДНК, кодирующая последовательность РНК, охарактеризованную в любом из пп.1-8.

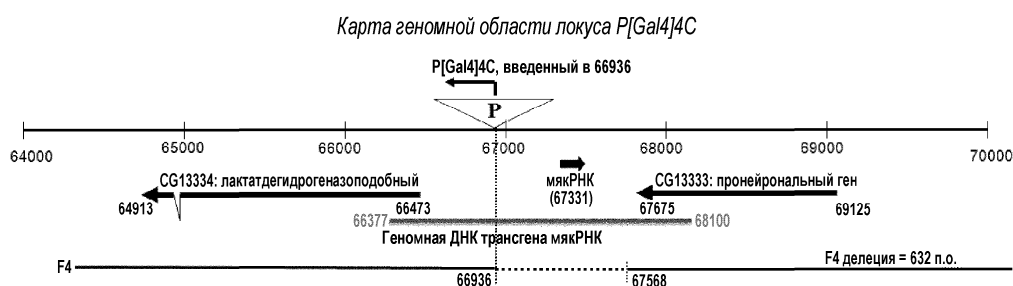
10. Вектор, обеспечивающий экспрессию последовательности РНК, охарактеризованной в п.1 или 2, выбранный из плазмиды, космиды, вирусного вектора и фага, предпочтительно содержащий промотор и/или регуляторные элементы, способствующие экспрессии указанной последовательности РНК в клетках кишечника или яйцников.

11. Клетка, содержащая последовательность РНК, охарактеризованную в любом из пп.1-3, или трансформированная с помощью вектора по п.10, для восстановления или амплификации *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo* экспрессии последовательности РНК.

12. Композиция для борьбы с неблагоприятными эффектами старения или стресса, содержащая последовательность РНК, охарактеризованную в п.1 или 2, вектор по п.10 или клетку по п.11 и носитель, приемлемый с пищевой и фармацевтической точки зрения.

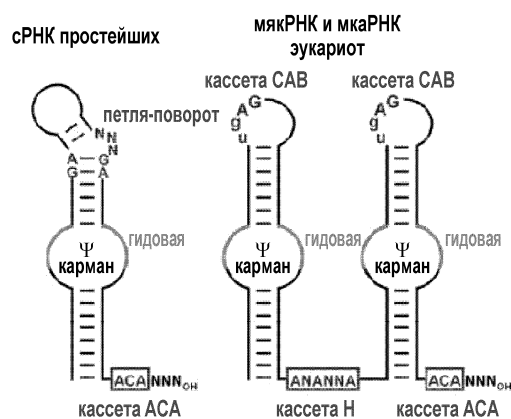
13. Применение *in vitro* или *ex vivo* последовательности РНК, охарактеризованной в любом из пп.1-8, для восстановления нормальной экспрессии аномального варианта последовательности РНК, охарактеризованной в п.1 или 2.

14. Применение *in vitro* или *ex vivo* композиции, охарактеризованной в п.12, для восстановления нормальной экспрессии аномального варианта последовательности РНК, охарактеризованной в п.1 или 2.

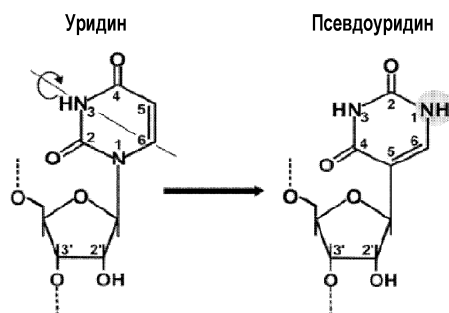


Фиг. 1

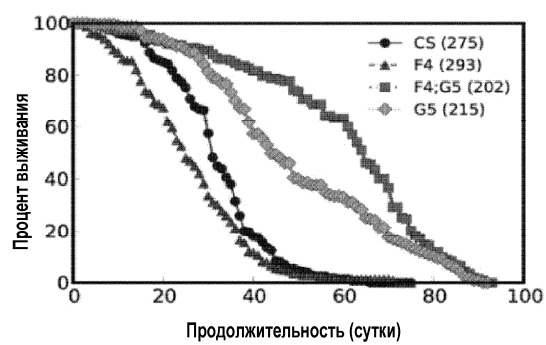
А)



В)

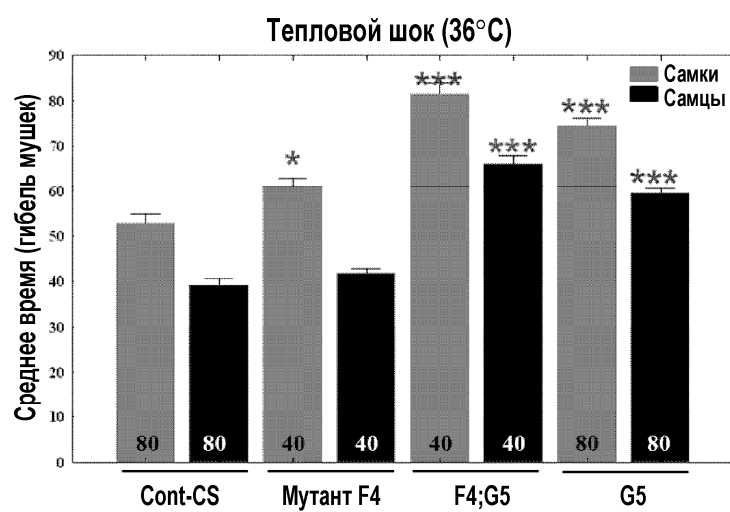


Фиг. 2

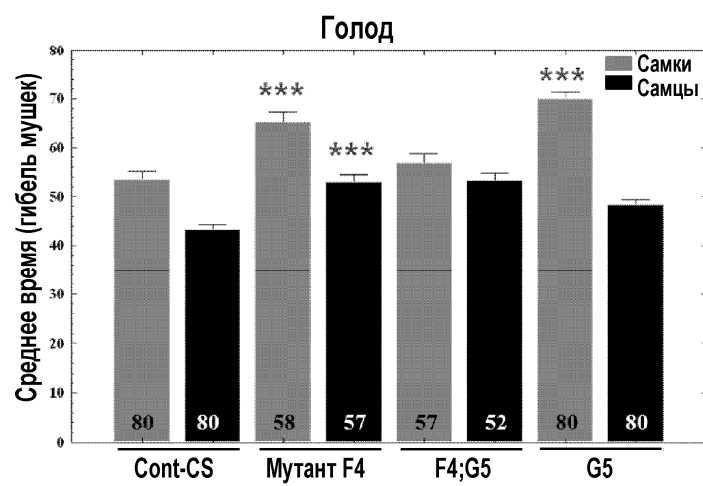


Фиг. 3

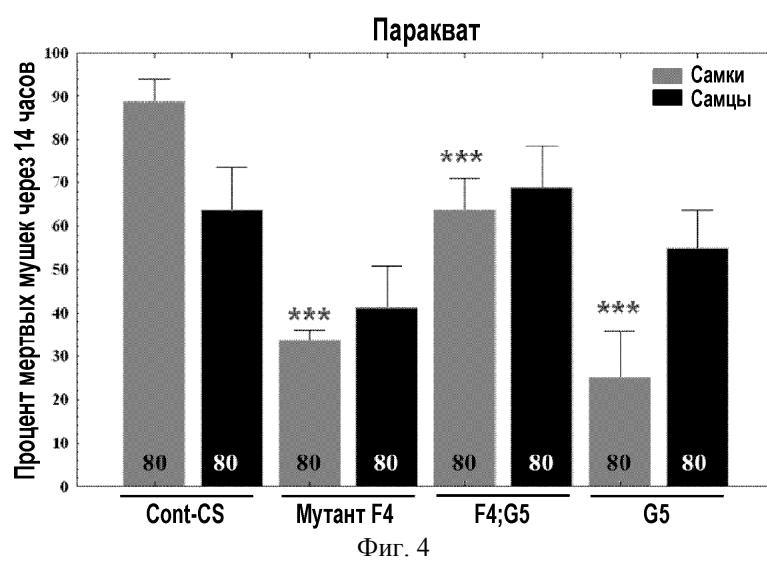
A)



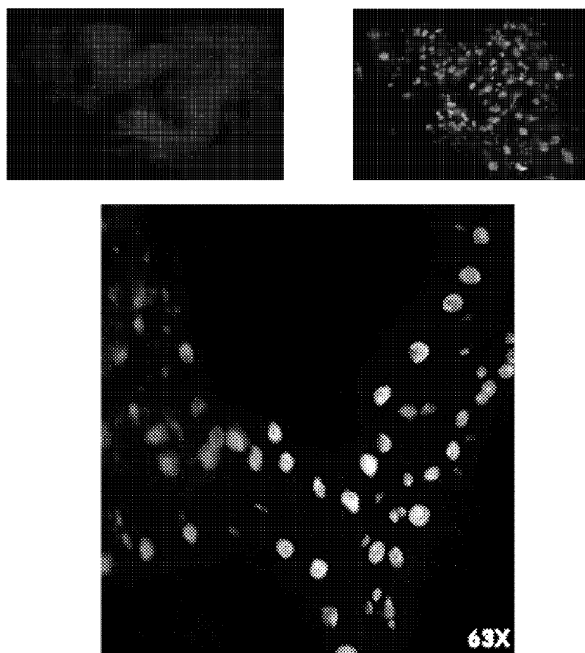
B)



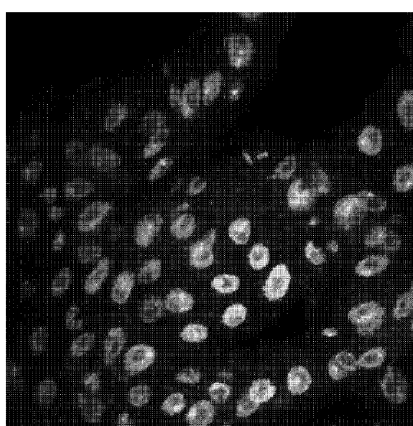
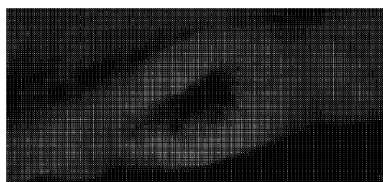
C)



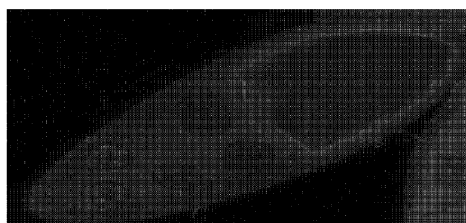
A) Контроль: CS - стенка желудка и кишечника



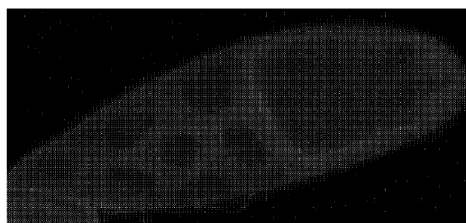
В) Мутант: F4 - стенка желудка и кишечника



С) Контроль: CS - яичники

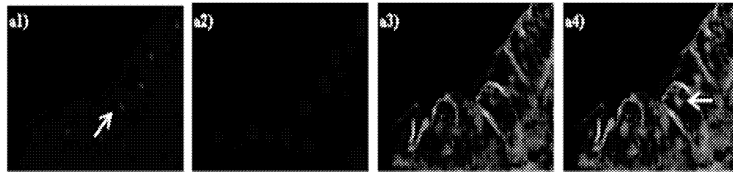


Д) Мутант: F4 - яичники

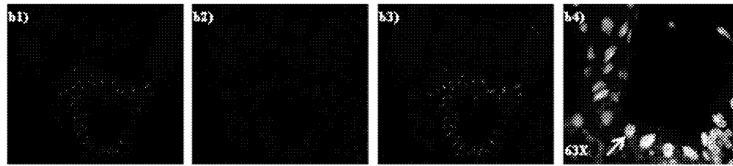


Фиг. 5

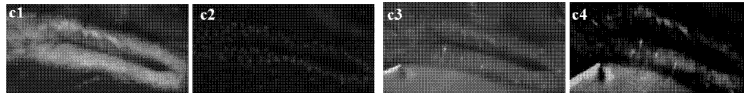
А) Целевая экспрессия мкРНК в энтероцитах под контролем Myo1A-Gal4 (Myo1A-Gal4; UAS-mCD8-GFP)



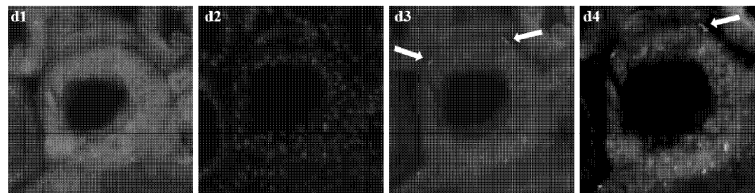
В) Целевая экспрессия мкРНК в энтероцитах посредством Myo1A-Gal4 в мутантном генотипе F4 (Myo1A-Gal4, F4/F4; UAS-8M/+)



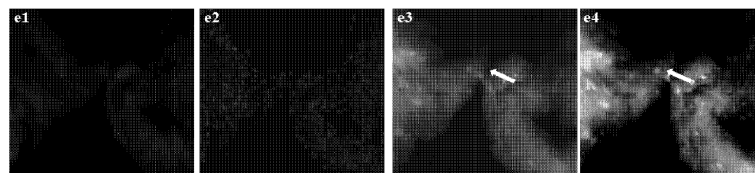
С) Целевая экспрессия в стволовых клетках кишечника (ISc) (eg-Gal4, UAS-GFP)



Д) Целевая экспрессия в энтеробластах: Su(H)-GBE-Gal4; UAS-mCD8-GFP



Е) Целевая экспрессия в стволовых клетках кишечника (ISc) (DI-Gal4, UAS-GFP)

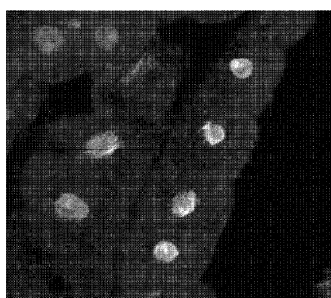


Фиг. 6

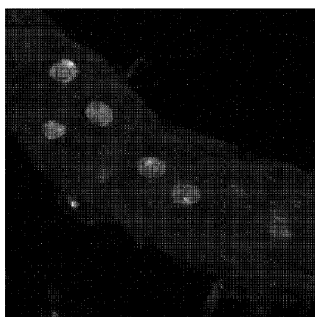
A) Целевая экспрессия под контролем *esg-Gal4* (*esg-Gal4, F4/F4;UAS-8M/+*)



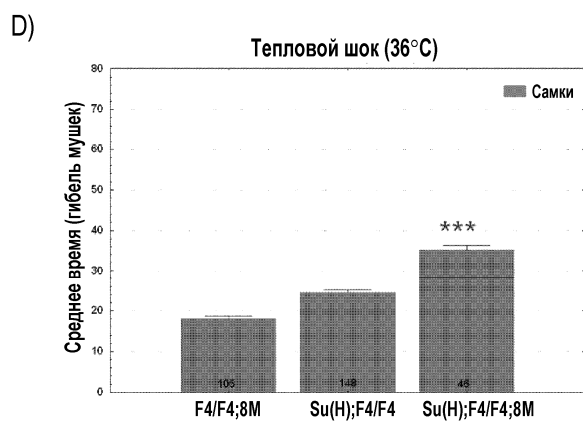
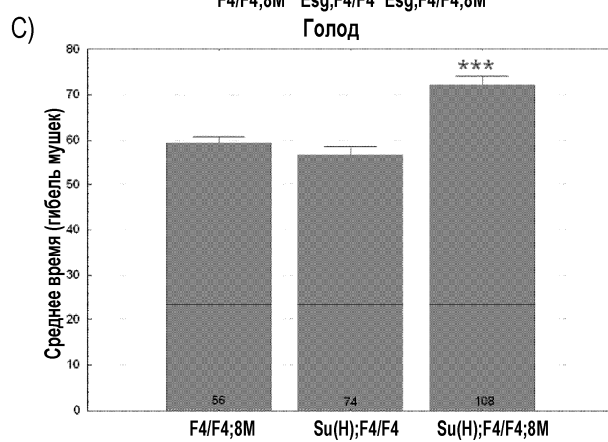
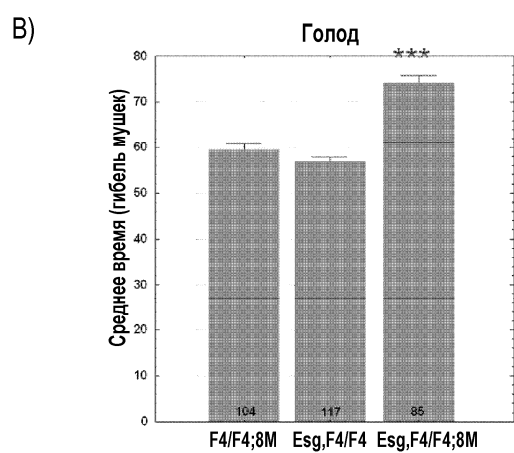
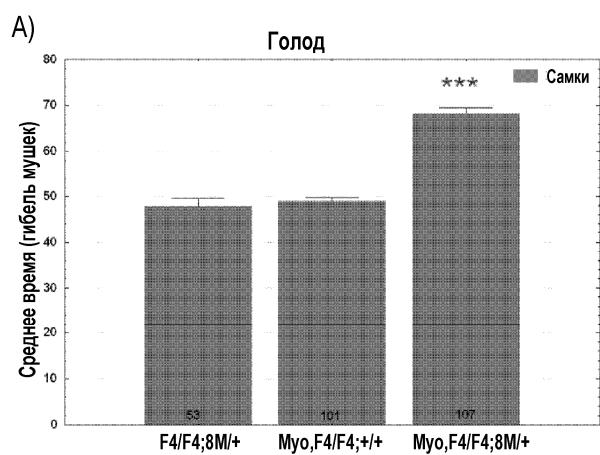
B) Целевая экспрессия под контролем *Su(H)-Gal4* (*Su(H)-GBE-Gal4,F4/F4; UAS-8M/+*)



C) Целевая экспрессия под контролем *Delta-Gal4* (*Delta-Gal4, F4/F4; UAS-8M/+*)



Фиг. 7



Фиг. 8

B)



Фиг. 9

STOCKHOLM 1.0

Dmel-psi28S1153

hg18-chr11_12822722-12822880

AAAAGCGUAGAUUUAAACUGUGGUUGAAUCCACAAAU

GUAAGUGUA-GCCUAGAAAUUGGGGCUUGAUUGAA-AAU

*** ** * *** ** ** ** ** ** ** ** *

#=GC SS_cons

...((((((.....((((((((((((.....

//

AGGCCACAGUUAUGCAAUAAACGCUAGAAAAAAAC-----GCUAGUAAUUAUAAC--GUGUUGACUAA

UAGCCCCAAUUCUGCAAUUUUCACCGCAAUAAAAGCUUCUCCAGUUAUACAUGGUGAUUGGUCUUGAUGGG

*** ** * ** ** * * * ** * * * * *

))))))))).....)))))).....((((.....((((((((((((.....

CAUCUGCGGAUA-AGAAGCUU--UGCGUUUUGAGGUACU-AACCACAGUA

CUAUUGUGGACAGAGGAGGGUGCUAGGUUGGGGUGGACGGGGCCACAGCU

* ** ** ** * * * * * * * * * *

((((((.....)))))).....)))))).....)))))).....)))))).....

Фиг. 10

A) Гомолог мыши 1

```
# STOCKHOLM 1.0

Dmel-psi28S1153      AAAAGCGUAGAUUUAAACUGUGGUUGAA
mm9-chr15_30336889-30337017 AAAAGGGGUUGAAGAAUG----GU--AUGGA
*** * * * * * * * * * * * * * *
#=GC SS_cons        ...((((((((((((((((((((((((
//

UUCACAAAUAAGGCCACAGUUAUGCAAUAAACGCUAGAAAAAAACGGUAGUAUUUAAUA
UUCAGA--AUG-----AACUAUCAGAGAAACUCCAGAGCCAGCA-GGAAACAUU--AUA
*** * * * * * * * * * * * * * *
.....)))))).....((((((((((((

ACGUGUUGACUAAACAUCUGCGGAUAAGAAGCUUUGCGUUUUGAGGUACUAACCACAGUA
GAGCCUUUGCUACAAUGUCCUGUUUC-UUUCUUGGCU--UUUAGUUCUGUCCACAGAU
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
((((((((((((((((((((((((((((((((((((
```

B) Гомолог мыши 2

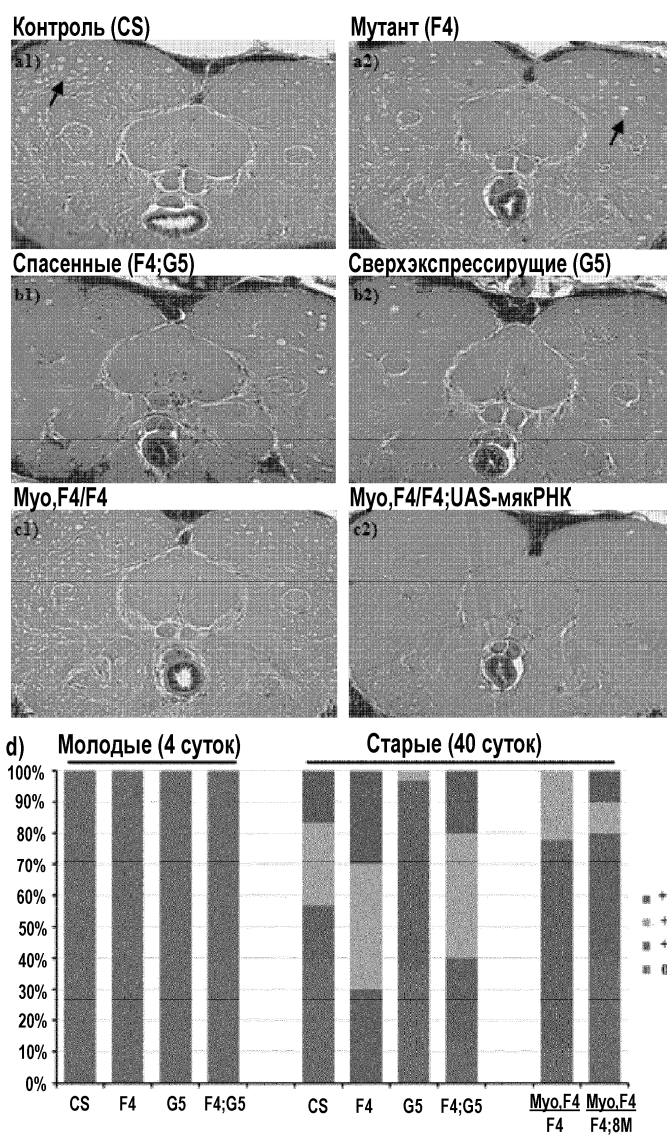
```
# STOCKHOLM 1.0

Dmel-psi28S1153      AAAAGCGUAGAUUUAAACUGUGGUUGAAUU
mm9-chr18_6495012-6495133 GAAAGCAUUUAAUAUUUACCAUAGUUUAU-U
***** * * * * * * * * * * * * *
#=GC SS_cons        ...((((((((((((((((((((((((((((
//

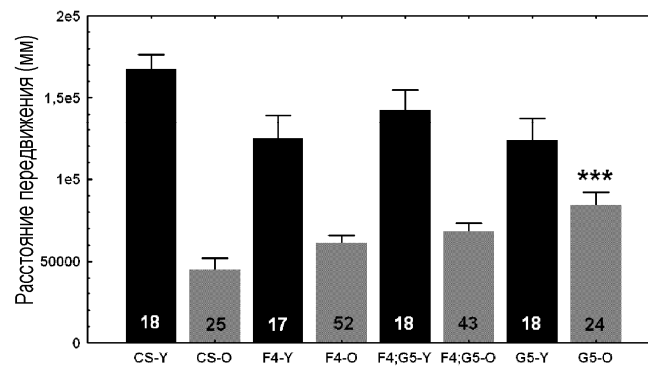
CACAAAUAAGGCCACAGUUAUGCAAUAAACGCUAGAAAAAAACGGUAGUAUUUAAUA
C-CGAGCUAG-----GGUAAAGCAGUCAGUGCUAGAAAAAUG---AGAAAACACAAUA-
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
...)))))).).....)))))).....)))))).....

CGUGUUGACUAAACAUCUGCGGAUAAGAAGCUUUGCGUUUUGAGGUACUAACCACAGUA
CAUAA-----GACCUCUCAAGGGGAGAUUCU-----GUUACUGUAUUAUCUG
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
.....((((((((((((((((((((((((
```

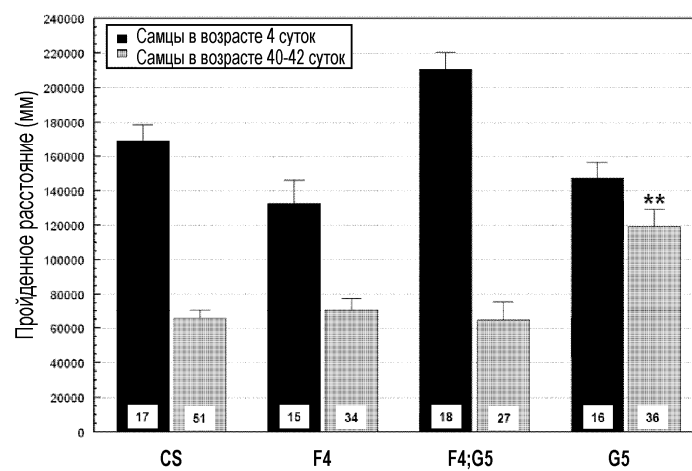
Фиг. 11



А) Самки

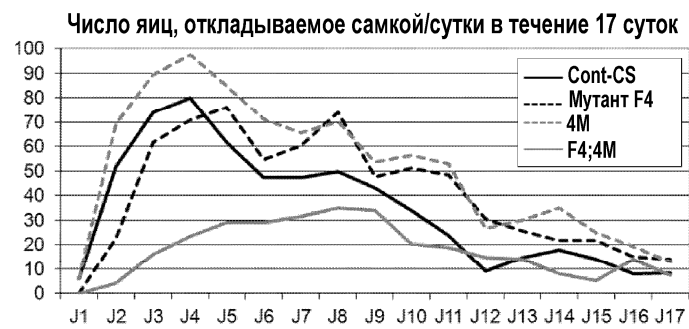


В) Самцы

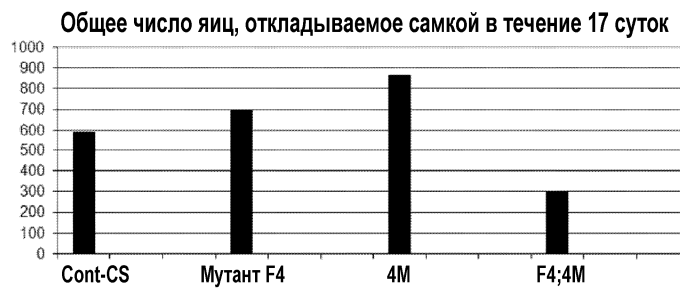


Фиг. 13

А)

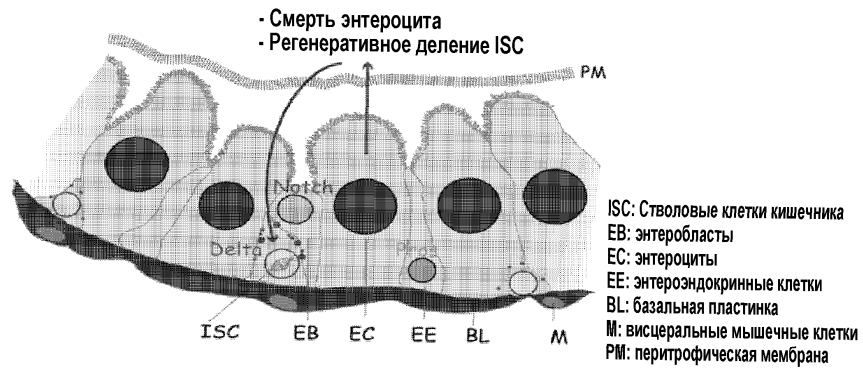


В)

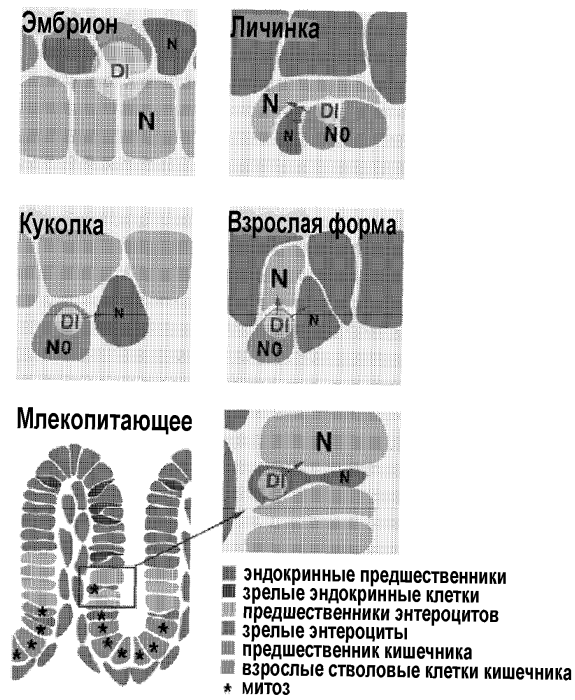


Фиг. 14

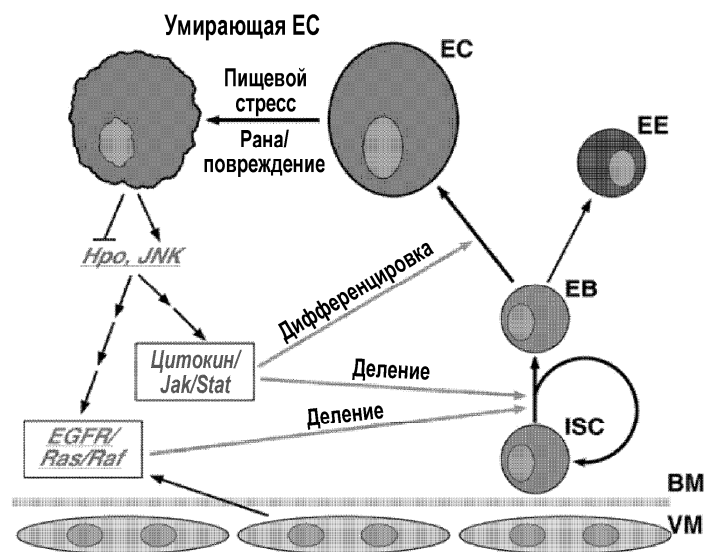
A)



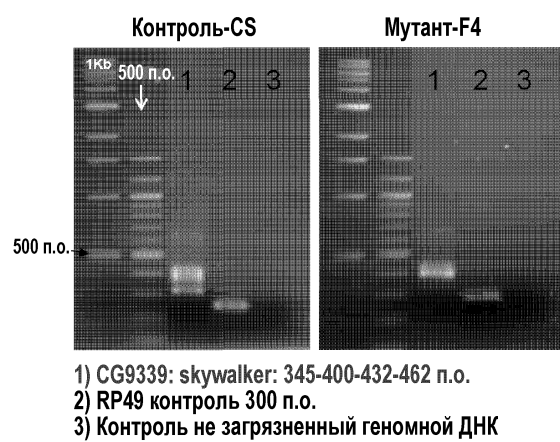
B)



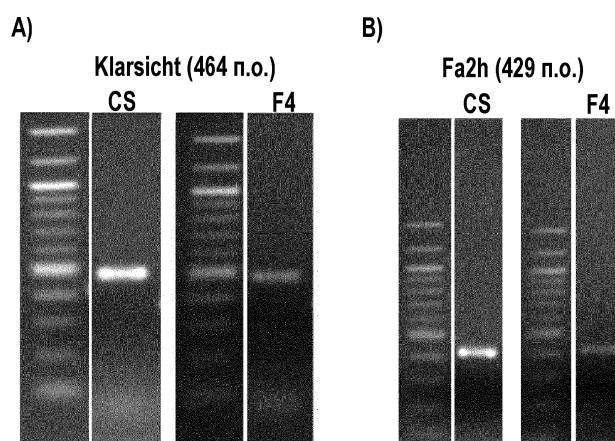
Фиг. 15



Фиг. 16

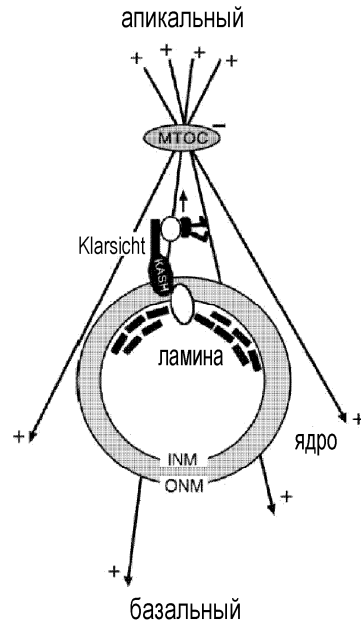


Фиг. 17

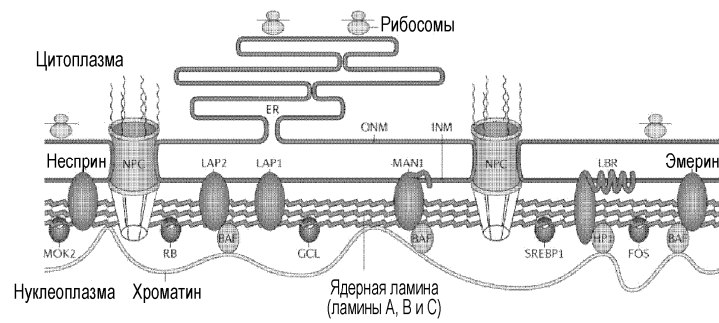


Фиг. 18

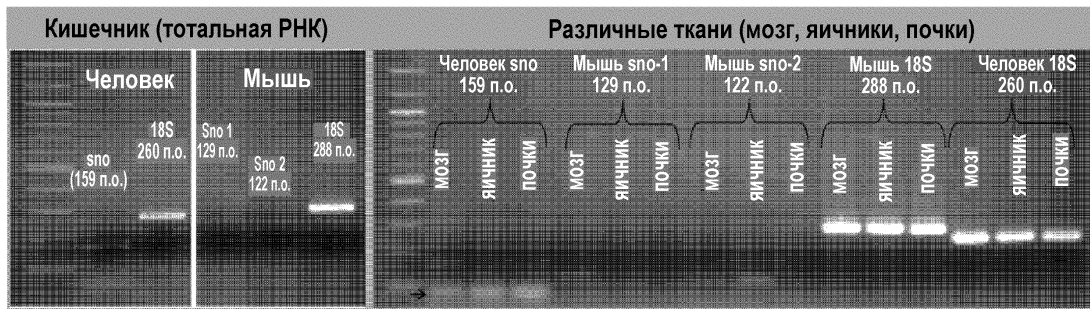
А)



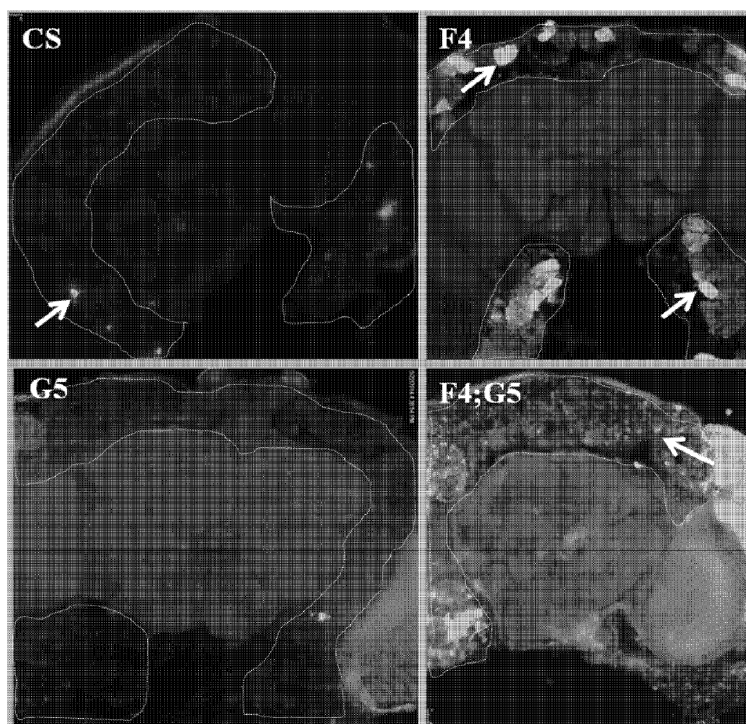
В)



Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2