



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.09.27

(21) Номер заявки
201990423

(22) Дата подачи заявки
2017.08.03

(51) Int. Cl. *C12Q 1/68* (2018.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 15/115 (2010.01)
C12N 15/113 (2010.01)

(54) ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЙ КЛЕТОЧНЫЙ СКРИНИНГ НА АПТАМЕРЫ

(31) 62/370,599

(32) 2016.08.03

(33) US

(43) 2019.09.30

(86) PCT/IB2017/001113

(87) WO 2018/025085 2018.02.08

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МЕЙРАДЖИТИЭКС ЮКЭЙ АЙАЙ
ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Го Сюэцуй, Фэн Лэй, Форбс
Александрия (US)

(74) Представитель:
Гольышко Н.Т., Вашина Г.М. (RU)

(56) WANG Z ET AL: "Systematic Identification and Analysis of Exonic Splicing Silencers", CELL, vol. 119, no. 6, 17 December 2004 (2004-12-17), pages 831-845, XP055433250, US ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/j.cell.2004.11.010 abstract p.831 col.1 par.2; p.833 col.1 par.2-p.834 col.1 par.1; figures 1A, B, E figure 3 p.838 col.2 par.1-2

US-A1-2015175981

US-A1-2011111411

CULLER S J ET AL: "Reprogramming Cellular Behavior with RNA Controllers Responsive to Endogenous Proteins", SCIENCE, vol. 330, no. 6008, 26 November 2010 (2010-11-26), pages 1251-1255, XP055434110, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1192128 p.1251 col.3 par.2; p.1252 col.1 par.2 et seq. figure 1 -& CULLER S J ET AL: "Supporting Online Material for Reprogramming Cellular Behavior with RNA Controllers Responsive to Endogenous Proteins", SCIENCE, vol. 330, no. 6008, 25 November 2010 (2010-11-25), pages 1251-1255, XP055434107, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1192128 the whole document

US-A1-2004126882

US-A1-2005197311

WO-A1-2016166303

WO-A1-2016126747

CROFT M T ET AL: "Thiamine biosynthesis in algae is regulated by riboswitches", PROCEEDINGS NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES PNAS,

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 104, no. 52, 26 December 2007 (2007-12-26), pages 20770-20775, XP002666883, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.0705786105 abstract; figures 1A, 1B, 5 p.20775, Luciferase Assays; figures 3E, 4 p.20773 col.1 par.2-col.2 par.1

WEIGAND J E ET AL: "Tetracycline aptamer-controlled regulation of pre-mRNA splicing in yeast", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, INFORMATION RETRIEVAL LTD, GB, vol. 35, no. 12, 1 June 2007 (2007-06-01), pages 4179-4185, XP002615441, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/NAR/GKM425 [retrieved on 2007-06-12] abstract Material and Methods; p.4181 col.1 par.1; figures 1-3

US-A1-2010221821

BOCOBZA S ET AL: "Riboswitch-dependent gene regulation and its evolution in the plant kingdom", GENES AND DEVELOPMENT, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, PLAINVIEW, NY, US, vol. 21, no. 22, 1 November 2007 (2007-11-01), pages 2874-2879, XP002666880, ISSN: 0890-9369, DOI: 10.1101/GAD.443907 abstract; figure 1 p.2874 col.2 par.2-3 p.2876 col.1 par.1-col.2 par.3; figure 2

US-A1-2010184810

CHEAH M T ET AL: "Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches", NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD., ETC, vol. 447, 24 May 2007 (2007-05-24), pages 497-501, XP008119355, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/NATURE05769 [retrieved on 2007-04-29] abstract; figure 1 p.500, Methods Summary -& CHEAH M T ET AL: "Supplementary Information. Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches.", NATURE, vol. 447, no. 7143, 29 April 2007 (2007-04-29), pages 497-500, XP055434005, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature05769 figure S2

THOMPSON K M ET AL: "Group I aptazymes as genetic regulatory switches", BMC BIOTECHNOLOGY, BIOMED CENTRAL LTD. LONDON, GB, vol. 2, no. 21 Cited December 27, 2002, 4 December 2002 (2002-12-04), pages 1-12, XP002615440, ISSN: 1472-6750 abstract page 8, column 1 - column 2

KOTULA J W ET AL: "Aptamer-Mediated Delivery of Splice-Switching Oligonucleotides to the Nuclei of Cancer Cells", NUCLEIC ACID THERAPEUTICS, MARY ANN LIEBERT, INC. PUBLISHERS, US, vol. 22, no. 3, 15 June 2012 (2012-06-15), pages 187-195, XP002745322, ISSN: 2159-3337, DOI: 10.1089/NAT.2012.0347 abstract page 188, column 1, paragraph 3; figure 4

-
- (57) Данное изобретение обеспечивает способы скрининга на основе эукариотических клеток для идентификации аптамера, который специфически связывает лиганд, или лиганда, который специфически связывает аптамер, с использованием полинуклеотидной кассеты для регуляции экспрессии репортерного гена, причем полинуклеотидная кассета содержит рибопереключател в контексте 5' интрона - альтернативного экзона - 3' интрона. Указанный рибопереключател содержит эффекторную область и аптамер, таким образом что, когда аптамер связывает лиганд, происходит экспрессия репортерного гена.

047916 B1

047916 B1

Область техники

Данное изобретение обеспечивает способы скрининга для идентификации аптамера, который специфически связывает лиганд, или лиганда, который специфически связывает аптамер, в эукариотической клетке с использованием полинуклеотидной кассеты регуляции экспрессии репортерного гена, причем полинуклеотидная кассета содержит рибопереключатель в контексте 5' интрона - альтернативного экзона - 3' интрона. Рибопереключатель содержит эффекторную область и аптамер, таким образом что, когда аптамер связывает лиганд, происходит экспрессия репортерного гена.

Уровень техники

Сплайсинг относится к процессу, с помощью которого интронная последовательность удаляется из растущей пре-матричной РНК (пре-мРНК), а экзоны соединяются вместе, образуя мРНК. Сайты сплайсинга представляют собой соединения между экзонами и интронами и определяются различными консенсусными последовательностями на 5' и 3'-концах интрона (то есть донорного и акцепторного сайтов сплайсинга, соответственно). Альтернативный сплайсинг пре-мРНК, или альтернативный сплайсинг, является широко распространенным процессом, происходящим в большинстве генов человека, содержащих множественные экзоны. Это осуществляется большой многокомпонентной структурой, называемой сплайсосомой, которая представляет собой совокупность малых ядерных нуклеопротеидов (snRNP) и разнообразных вспомогательных белков. Путем распознавания различных цис-регуляторных последовательностей сплайсосома определяет границы экзон/интрон, удаляет интронные последовательности и объединяет экзоны в конечный транслируемый транскрипт (то есть мРНК). В случае альтернативного сплайсинга для того, чтобы изменить конечный кодирующий транскрипт могут быть включены или исключены определенные экзоны, тем самым изменяя получаемый экспрессированный белок.

В данном изобретении используется опосредованный лигандом/аптамером контроль альтернативного сплайсинга для идентификации пар аптамер/лиганд, которые связываются в пределах целевой эукариотической клетки. До данного изобретения аптамеры генерировали против различных лигандов посредством скрининга *in vitro*, однако лишь немногие доказали свою эффективность в клетках, что подчеркивает необходимость систем для скрининга аптамеров, которые функционируют в выбранном организме.

Сущность изобретения

В одном аспекте данное изобретение относится к способу селекции аптамера, который связывает лиганд в эукариотических клетках, включающему стадии:

- (a) обеспечения библиотеки аптамеров,
- (b) введения членов библиотеки аптамеров в полинуклеотидную кассету для лиганд-опосредованной экспрессии репортерного гена для создания библиотеки рибопереключателей,
- (c) введения библиотеки рибопереключателей в эукариотические клетки и
- (d) приведения в контакт эукариотических клеток с лигандом, и
- (e) измерения экспрессии репортерного гена, причем полинуклеотидная кассета содержит альтернативно сплайсированный экзон, фланкированный 5'-интроном и 3'-интроном, и рибоперекключатель, содержащий (i) эффекторную область, содержащую ножку (stem), которая содержит 5'-сайт сплайсинга 3' интрона, и (ii) аптамер, при этом альтернативно-сплайсированный экзон содержит стоп-кодон, который находится в рамке считывания с репортерным геном, когда альтернативно сплайсированный экзон встраивается в мРНК репортерного гена.

В одном варианте библиотека аптамеров содержит аптамеры, имеющие один или более рандомизированных нуклеотидов. В одном варианте библиотека аптамеров содержит аптамеры, имеющие полностью рандомизированные последовательности. В одном варианте осуществления библиотека аптамеров содержит аптамеры, которые имеют длину от около 15 до около 200 нуклеотидов. В одном варианте осуществления библиотека аптамеров содержит аптамеры, которые имеют длину от около 30 до около 100 нуклеотидов. В одном варианте осуществления библиотека аптамеров содержит более 100000 аптамеров. В одном варианте осуществления библиотека аптамеров содержит более 1000000 аптамеров.

В одном варианте осуществления лиганд представляет собой малую молекулу. В одном варианте осуществления низкомолекулярный лиганд является экзогенным для эукариотической клетки. В другом варианте осуществления лиганд представляет собой молекулу, продуцируемую эукариотической клеткой, включающую, например, метаболит, нуклеиновую кислоту, витамин, кофактор, липид, моносахарид и вторичный мессенджер.

В одном варианте осуществления эукариотическую клетку выбирают из клетки млекопитающего, клетки насекомого, клетки растения и дрожжевой клетки. В одном варианте осуществления эукариотическую клетку получают из мыши, человека, мухи (например, *Drosophila melanogaster*), рыбы (например, *Danio rerio*) или круглого червя (например, *Caenorhabditis elegans*).

В одном варианте осуществления репортерный ген выбирают из группы, состоящей из флуоресцентного белка, люциферазы, β -галактозидазы и пероксидазы хрена. В одном варианте осуществления репортерный ген представляет собой цитокин, сигнальную молекулу, гормон роста, антитело, регуляторную РНК, терапевтический белок или пептид. В одном варианте осуществления экспрессия репортерного гена более чем в около 10 раз выше, когда лиганд специфически связывает аптамер, чем уровни

экспрессии репортерного гена, когда лиганд отсутствует. В других вариантах осуществления экспрессия репортерного гена более чем в около 20, 50, 100, 200, 500 или 1000 раз выше, когда лиганд специфически связывает аптамер, чем уровни экспрессии репортерного гена, когда лиганд отсутствует.

В одном варианте осуществления 5' и 3' интроны получают из интрона 2 гена β -глобина человека. В одном варианте осуществления 5' интрон содержит стоп-кодон в рамке считывания с целевым геном. В одном варианте осуществления каждый из 5' и 3' интронов имеет длину от около 50 до около 300 нуклеотидов. В одном варианте осуществления каждый из 5' и 3' интронов независимо имеет длину от около 125 до около 240 нуклеотидов. В одном варианте осуществления 5' и/или 3' интроны были модифицированы для включения или изменения последовательности интронного энхансера сплайсинга, интронного энхансера сплайсинга, 5'-сайта сплайсинга, 3'-сайта сплайсинга или последовательности точки ветвления.

В одном варианте осуществления ножка эффекторной области рибопереклочателя имеет длину от около 7 до около 20 пар оснований. В одном варианте осуществления ножка эффекторной области имеет длину от 8 до 11 пар оснований.

В одном варианте осуществления альтернативно сплайсированный экзон получают из экзона 2 гена дигидрофолатредуктазы человека (DHFR), экзона 5 мутанта человеческой опухоли Вильмса 1, экзона 16 мышинной кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II дельта, или экзона 6 SIRT1. В одном варианте осуществления альтернативно сплайсированный экзон представляет собой модифицированный экзон 2 DHFR. В одном варианте осуществления альтернативно сплайсированный экзон был модифицирован посредством одного или более из группы, состоящей из изменения последовательности экзонного сайленсера сплайсинга, изменения последовательности экзонного энхансера сплайсинга, добавления экзонного энхансера сплайсинга и добавления экзонного донора сплайсинга. В одном варианте осуществления альтернативно сплайсированный экзон является синтетическим (т.е. не получен из встречающегося в природе экзона).

В одном варианте осуществления библиотека аптамеров разделяется на меньшую библиотеку аптамеров перед введением в полинуклеотидные кассеты, включающим стадии:

(a) обеспечения рандомизированной библиотеки аптамеров, в которой аптамеры в библиотеке содержат множество 5' и 3' константных областей и один или более рандомизированных нуклеотидов,

(b) выполнения ПЦР с двумя циклами с использованием рандомизированной библиотеки аптамеров в качестве матрицы и первого праймера и второго праймера, которые комплементарны 5' и 3' константным областям,

(c) выделения продуктов в ПЦР с двумя циклами и

(d) ПЦР-амплификации подмножества выделенных продуктов ПЦР с двумя циклами с использованием множества праймеров, комплементарных подмножеству уникальных 5' и 3' константных областей.

В одном варианте осуществления библиотека рибопереклочателей перед введением в эукариотические клетки делится на одну или более подбиблиотек рибопереклочателей. В одном варианте осуществления способ разделения библиотеки рибопереклочателей на подбиблиотеки включает стадии:

(a) введения библиотеки аптамеров в плазмиду, содержащую полинуклеотидную кассету генной регуляции, для создания библиотеки рибопереклочателей;

(b) введения библиотеки рибопереклочателей в бактерии (например, *E. coli*); и

(c) сбора бактериальных клонов (например, путем отбора бактериальных колоний) и выделения плазмидной ДНК для получения плазмидных подбиблиотек рибопереклочателей (называемых в данном документе первичными подбиблиотеками);

В вариантах осуществления вторичные подбиблиотеки рибопереклочателей генерируют из первичной плазмидной подбиблиотеки рибопереклочателей путем введения первичной подбиблиотеки в бактерии, сбора бактериальных клонов и выделения плазмидной ДНК. Первичную или вторичную подбиблиотеку затем вводят в эукариотические клетки, эукариотические клетки приводят в контакт с лигандом и измеряют экспрессию репортерного гена, чтобы определить, связывается ли один или более аптамеров в библиотеке с лигандом в пределах эукариотической клетки.

В одном варианте осуществления данное изобретение включает аптамер, который связывает целевой лиганд, причем аптамер выбирают при помощи вышеуказанных способов. В вариантах осуществления изобретения аптамер содержит последовательность SEQ ID NO: 14-27. В одном варианте осуществления последовательность аптамера содержит последовательность SEQ ID NO: 24.

В другом аспекте изобретение относится к способу селекции лиганда, который связывает аптамер в эукариотической клетке, включающему стадии:

(a) обеспечения библиотеки лигандов,

(b) обеспечения полинуклеотидной кассеты для лиганд-опосредованной экспрессии репортерного гена,

(c) введения полинуклеотидной кассеты в эукариотическую клетку,

(d) приведения в контакт отдельных групп эукариотической клетки с членами библиотеки лигандов, и

(e) измерения экспрессии репортерного гена, причем полинуклеотидная кассета содержит альтернативно сплайсированный экзон, фланкированный 5' интроном и 3' интроном, и рибопереклочатель, содержащий (i) эффекторную область, содержащую ножку, которая содержит 5'-сайт сплайсинга 3' интро-

на, и (ii) аптамер, при этом альтернативно-сплайсированный экзон содержит стоп-кодон, который находится в рамке считывания с репортерным геном, когда альтернативно сплайсированный экзон встраивается в мРНК репортерного гена.

В одном варианте осуществления лиганд представляет собой малую молекулу. В другом варианте осуществления низкомолекулярный лиганд является экзогенным для эукариотической клетки. В другом варианте осуществления лиганд представляет собой молекулу, продуцируемую эукариотической клеткой, включающую, например, метаболит, нуклеиновую кислоту, витамин, кофактор, липид, моносахарид и вторичный мессенджер.

В одном варианте осуществления эукариотическую клетку выбирают из клетки млекопитающего, клетки насекомого, клетки растения и дрожжевой клетки. В одном варианте осуществления эукариотическая клетка получают из мыши, человека, мухи (например, *Drosophila melanogaster*), рыбы (например, *Danio rerio*) или круглого червя (например, *Caenorhabditis elegans*).

В одном варианте осуществления репортерный ген выбирают из группы, состоящей из флуоресцентного белка, люциферазы, β -галактозидазы и пероксидазы хрена. В одном варианте осуществления репортерный ген представляет собой цитокин, сигнальную молекулу, гормон роста, антитело, регуляторную РНК, терапевтический белок или пептид. В одном варианте осуществления экспрессия репортерного гена более чем в около 10 раз выше, когда лиганд специфически связывает аптамер, чем уровни экспрессии репортерного гена, когда лиганд отсутствует. В других вариантах осуществления экспрессия репортерного гена более чем в около 20, 50, 100, 200, 500 или 1000 раз выше, когда лиганд специфически связывает аптамер, чем уровни экспрессии репортерного гена, когда лиганд отсутствует.

В одном варианте осуществления 5' и 3' интроны получают из интрона 2 гена β -глобина человека. В одном варианте осуществления 5' интрон содержит стоп-кодон в рамке считывания с целевым геном. В одном варианте осуществления каждый из 5' и 3' интронов имеет длину от около 50 до около 300 нуклеотидов. В одном варианте осуществления каждый из 5' и 3' интронов имеет длину от около 125 до около 240 нуклеотидов. В одном варианте осуществления 5' и/или 3' интроны были модифицированы для включения или изменения последовательности интронного энхансера сплайсинга, экзонного энхансера сплайсинга, 5'-сайта сплайсинга, 3'-сайта сплайсинга или последовательности точки ветвления.

В одном варианте осуществления ножка эффекторной области рибопереклочателя имеет длину от около 7 до около 20 пар оснований. В одном варианте осуществления ножка эффекторной области имеет длину от 8 до 11 пар оснований.

В одном варианте осуществления альтернативно сплайсированный экзон получают из экзона 2 гена дигидрофолатредуктазы человека (DHFR), экзона 5 мутанта человеческой опухоли Вильмса 1, экзона 16 мышечной кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II дельта, или экзона 6 SIRT1. В одном варианте осуществления альтернативно сплайсированный экзон представляет собой модифицированный экзон 2 DHFR. В одном варианте осуществления альтернативно сплайсированный экзон был модифицирован в одной или более из группы, состоящей из изменения последовательности экзонного сайленсера сплайсинга, изменения последовательности экзонного энхансера сплайсинга, добавления экзонного энхансера сплайсинга и добавления экзонного донора сплайсинга. В одном варианте осуществления альтернативно сплайсированный экзон является синтетическим (т.е. не получен из встречающегося в природе экзона).

В одном варианте осуществления данное изобретение включает лиганд, выбранный при помощи вышеуказанных способов.

В другом аспекте изобретение относится к способу разделения рандомизированной библиотеки аптамеров на меньшие подбиблиотеки аптамеров, включающему стадии:

(a) обеспечения рандомизированной библиотеки аптамеров, в которой аптамеры в библиотеке содержат множество 5' и 3' константных областей и один или более рандомизированных нуклеотидов,

(b) выполнения ПЦР с двумя циклами с использованием рандомизированной библиотеки аптамеров в качестве матрицы и первых праймеров и вторых праймеров, которые комплементарны 5' и 3' константным областям,

(c) выделения продуктов в ПЦР с двумя циклами и

(d) ПЦР-амплификации подмножества выделенных продуктов ПЦР с двумя циклами с использованием праймеров, комплементарных подмножеству уникальных 5' и 3' константных областей.

В одном варианте осуществления рандомизированная библиотека аптамеров содержит аптамеры, имеющие один или более рандомизированных нуклеотидов. В одном варианте осуществления рандомизированная библиотека аптамеров содержит более чем около 100000 аптамеров. В одном варианте осуществления рандомизированная библиотека аптамеров содержит более чем около 1000000 аптамеров.

В одном варианте осуществления первый или второй праймер в ПЦР с двумя циклами содержит метку, выбранную из группы, состоящей из биотина, дигоксигенина (DIG), бромодезоксиуридина (БДУ), флуорофора, химической группы, например, тиольной группы, или химической группы, например, азидов, используемых в клик-химии.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1а. Схематическое изображение конструкта рибопереклочателя. Усеченная последовательность интрона бета-глобина была вставлена в кодирующую последовательность репортерного гена, а мутантный стоп-кодон, содержащий экзон 2 DHFR (mDHFR), был помещен во вставленный интрон, таким образом, образуя платформу для экспрессии гена из трех экзонов, с помощью которой экспрессия репортерного гена регулируется включением/исключением экзона mDHFR. Структура шпилька/ножка, содержащая сайт связывания U1 в интроне ниже по направлению (3') экзона mDHFR, формируется с помощью сконструированной последовательности, комплементарной сайту связывания U1, которая блокирует связывание U1, тем самым приводя к исключению стоп-кодона, содержащего экзон mDHFR, и экспрессии целевого гена. Последовательность аптамера прививают между сайтом связывания U1 и его комплементарной последовательностью, что позволяет контролировать образование шпильки путем связывания аптамера/лиганда.

Фиг. 1б. Дозозависимые эффекты конструктов с регуляторными кассетами, содержащими различные рибопереклочатели на основе аптамера(ов). Гуаниновые рибопереклочатели индуцировали экспрессию репортерного гена, отвечая не только на гуанин, но и на обработку гуанозином.

Фиг. 1с и 1д. График, демонстрирующий, что рибопереклочатель xrt-G17 индуцирует активность люциферазы при обработке аналогами гуанина.

Фиг. 1е. Кратность индукции активности люциферазы с помощью рибопереклочателя xrt-G17 при обработке соединениями.

Фиг. 2. Схема матрицы для генерации рандомизированных аптамерных последовательностей. Аптамерная последовательность (пустой столбец) фланкирована константными областями (черные столбцы), которые содержат сайт BsaI для облегчения клонирования аптамера в кассету генной регуляции для генерации рибопереклочателей.

Фиг. 3а-3е. Схематическое описание способа разделения большой рандомизированной библиотеки аптамеров на более мелкие подбиблиотеки.

Фиг. 3а. Схематическое представление двухэтапной стратегии разделения большой библиотеки аптамеров. Первым этапом является добавление уникальной пары меток последовательности к каждой аптамерной олигонуклеотидной матрице. После первого этапа матрицы с уникальными последовательностями меток амплифицируют, используя праймеры, которые являются специфическими для меченых последовательностей.

Фиг. 3б. Три подхода к прикреплению последовательностей меток к матрицам: последовательности меток, включенные с помощью ПЦР с использованием праймеров, которые содержат последовательности меток на 5'-конце праймеров (I); последовательности меток, прикрепленные путем лигирования одноцепочечной матричной последовательности с одноцепочечными последовательностями меток с помощью T4 РНК-лигазы (II); последовательности меток, связанные с матрицами путем лигирования двухцепочечных матричных последовательностей с двухцепочечной последовательностью метки с помощью T4 ДНК-лигазы (III).

Фиг. 3с. Принципиальная схема ПЦР с двумя циклами. Для стадии 1, только обратные праймеры JR, которые содержат последовательность метки на 5'-конце. После первого цикла вновь синтезированная цепь имеет метку последовательности на 5'-конце. Для стадии 2 в реакцию ПЦР добавляется меченый биотином прямой праймер JF, который может использовать только вновь синтезированную цепь в качестве матрицы, таким образом генерируя матрицы с последовательностями меток на 5'- и 3'-концах и молекулой биотина на 5'-конце.

Фиг. 3д. Создание библиотеки меченых аптамеров. После мечения матриц с использованием меток последовательностей и молекулы биотина, гранулы стрептавидина используются для отделения меченых/маркированных одноцепочечных матриц от остальных компонентов реакции посредством денатурации олигонуклеотидов и отмывки гранул. Затем меченые матрицы амплифицируют и увеличивают количественно, используя смесь праймеров (праймеры F и R), которые являются специфическими для меченых последовательностей, таким образом генерируя библиотеку меченых аптамеров, которые готовы для последующей ПЦР, используя одну пару праймеров, специфических для последовательности метки, для генерации подбиблиотеки библиотеки природных аптамеров.

Фиг. 3е. Подбиблиотеки аптамеров амплифицируют с помощью ПЦР с использованием стратегии разделения. Библиотека аптамеров (10^6 , полученные как в примере 2) была помечена с помощью ПЦР с использованием 2 прямых праймеров (JF1-2) и 8 обратных праймеров (JR1-8) с числом копий матриц 1, 2.3 или 4.6. Выделенные меченые матрицы увеличивали количественно смесью специфичных для метки праймеров F1-2 и R1-8, и продукты ПЦР подвергали ПЦР с использованием или универсальных праймеров (левая панель), или одной пары специфичных для метки праймеров F1 и R1 (средняя панель), или одной пары нерелевантных праймеров F3 и R1 (правая панель). Воду использовали в виде негативного контроля для матрицы.

Фиг. 4. Тест чувствительности на клеточном анализе для скрининга библиотеки рибопереклочателей. Конструкт xrt-G17 смешивали с конструктом SR-mut при различных молекулярных соотношениях, и ДНК смешанного конструкта трансфицировали в клетки НЕК-293 и обрабатывали гуанином. Крат-

ность индукции активности люциферазы рассчитывали как активность люциферазы, индуцированную гуанином, деленную на активность люциферазы, полученную без обработки гуанином.

Фиг. 5a. Схематическое изображение конструктора плазмидной библиотеки, содержащего рибопереклочатель. Одноцепочечные аптамерные олигонуклеотиды сначала амплифицируют с помощью ПЦР с использованием универсальных праймеров для преобразования одноцепочечной матрицы аптамера в двухцепочечную. Затем двухцепочечные олигонуклеотиды расщепляют с помощью BsaI и лигируют с расщепленным BsaI вектором, чтобы получить конструкторы с рибопереклочателями. Затем плазмидную ДНК электропорировать в электрокомпетентные клетки DH5a. Более 5×10^6 колоний собирают, чтобы покрыть более 99 % исходной библиотеки аптамеров (10^6).

Фиг. 5b. Схематическое изображение деления плазмидной библиотеки рибопереклочателей на подбиблиотеки. Плазмидную библиотеку рибопереклочателей трансформируют в химически компетентные клетки DH5a. Затем трансформированные бактерии высевают в чашки с агаром. Определенное количество бактериальных колоний собирают из каждой отдельной чашки с агаром, и плазмидную ДНК выделяют из совокупности единичных колоний по отдельности. Полученная плазмидная ДНК из каждой коллекции колоний образует подбиблиотеку рибопереклочателей. Подход для разделения может повторяться до тех пор, пока не будет достигнут желаемый размер подбиблиотек.

Фиг. 5c. Состав уникальных последовательностей вторичных подбиблиотек рибопереклочателей определяется при помощи секвенирования нового поколения. Последовательности с более чем 12 прочтениями из цикла секвенирования считались истинными последовательностями.

Фиг. 5d. Сравнение уникального состава последовательностей между двумя вторичными подбиблиотеками, сгенерированными из одной и той же первичной подбиблиотеки P1S_003. Круговая диаграмма демонстрирует количество уникальных последовательностей в каждой подбиблиотеке и количество перекрывающихся последовательностей между двумя библиотеками рибопереклочателей.

Фиг. 5e. Сравнение состава уникальных последовательностей между двумя вторичными подбиблиотеками, которые генерируются из разных первичных подбиблиотек P1S_003 и P1S_007, соответственно. Круговая диаграмма демонстрирует количество уникальных последовательностей в каждой подбиблиотеке и количество перекрывающихся последовательностей между двумя библиотеками рибопереклочателей.

Фиг. 6a и 6b. Плазмидную ДНК из 6 из 100 первичных подбиблиотек (60 тыс.) (фиг. 6a) или 100 вторичных подбиблиотек (размер 600) (фиг. 6b) группировали в формате 96-луночного планшета и трансфицировали в клетки НЕК-293. Кратность индукции активности люциферазы рассчитывали как активность люциферазы, индуцированную гуанином, деленную на активность люциферазы, полученную без обработки гуанином.

Фиг. 6c. Результаты скрининга библиотеки рибопереклочателей с использованием никотинамидадениндинуклеотида (НАД+) в качестве лиганда. Подбиблиотеки библиотеки рибопереклочателей P2 были сгруппированы в 96-луночном формате. Клетки НЕК 293 высевали в 96-луночный планшет и трансфицировали ДНК библиотеки рибопереклочателей. Через четыре часа после трансфекции клетки обрабатывали с использованием 100 мкМ НАД+. Активность люциферазы измеряли через 20 часов после обработки НАД+. Кратность индукции рассчитывали как отношение активности люциферазы, полученной от клеток, обработанных НАД+, и активности люциферазы, полученной от клеток без обработки НАД+. Каждая точка на точечном графике представляет кратность индукции из подбиблиотеки или конструктора G17, как указано.

Фиг. 6d. Результаты скрининга рибопереклочателей с использованием НАД+ в качестве лиганда. Каждый отдельный конструктор рибопереклочателей был в 96-луночном формате. Клетки НЕК 293 высевали в 96-луночный планшет и трансфицировали с использованием конструкторов рибопереклочателей. Через 4 часа после трансфекции клетки обрабатывали с использованием 100 мкМ НАД+. Активность люциферазы измеряли через 20 часов после обработки НАД+. Кратность индукции рассчитывали как отношение активности люциферазы, полученной от клеток, обработанных НАД+, к активности люциферазы, полученной от клеток без обработки НАД+. Каждая точка на точечном графике представляет кратность индукции от каждого отдельного конструктора рибопереклочателя или конструктора G17, как указано.

Фиг. 6e и 6f. Конструктор с новой последовательностью аптамера демонстрирует усиленный ответ на обработку НАД+ дозозависимым способом по сравнению с рибопереклочателем G17. Клетки НЕК 293 трансфицировали G17 или конструктором № 46 с новой последовательностью аптамера. Через 4 часа после трансфекции клетки обрабатывали различными дозами НАД+. Активность люциферазы измеряли через 20 часов после обработки НАД+. Кратность индукции рассчитывали как отношение активности люциферазы, полученной от клеток, обработанных НАД+, к активности люциферазы, полученной от клеток без обработки НАД+.

Подробное описание сущности изобретения

Способы скрининга аптамера/лиганда.

Данное изобретение обеспечивает способы скрининга для идентификации аптамеров, которые связываются с лигандом, и лигандов, которые связываются с аптамером, в пределах эукариотической клетки, ткани или организма. В одном аспекте данное изобретение относится к способу селекции аптамера,

который связывает лиганд в эукариотических клетках, включающему стадии:

- (a) обеспечения библиотеки аптамеров,
- (b) введения членов библиотеки аптамеров в полинуклеотидные кассеты для лиганд-опосредованной экспрессии репортерного гена,
- (c) введения аптамерсодержащих полинуклеотидных кассет в эукариотические клетки и
- (d) приведения в контакт эукариотических клеток с лигандом, и
- (e) измерения экспрессии репортерного гена.

В другом аспекте изобретение относится к способу селекции лиганда, который связывает аптамер в эукариотической клетке, включающему стадии:

- (a) обеспечения библиотеки лигандов,
- (b) обеспечения полинуклеотидной кассеты для лиганд-опосредованной экспрессии репортерного гена,
- (c) введения полинуклеотидной кассеты в эукариотическую клетку,
- (d) приведения в контакт отдельных групп эукариотической клетки с членами библиотеки лигандов, и
- (e) измерения экспрессии репортерного гена.

В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает способы идентификации аптамеров, которые связываются с внутриклеточными молекулами, включающие стадии:

- (a) обеспечения библиотеки аптамеров,
- (b) введения членов библиотеки аптамеров в полинуклеотидные кассеты для лиганд-опосредованной экспрессии репортерного гена,
- (c) введения аптамерсодержащих полинуклеотидных кассет в эукариотические клетки и
- (d) измерения экспрессии репортерного гена.

В способах скрининга согласно данному изобретению используются полинуклеотидные кассеты генной регуляции, раскрытые в РСТ/US2016/016234, полностью включенной в данное описание посредством ссылки. Эти кассеты генной регуляции содержат рибопереключатель в пределах 5'-интрон-альтернативный экзон-3'-интрон. Кассета генной регуляции относится к рекомбинантному ДНК-конструкту, который при включении в ДНК целевого гена (например, репортерного гена) обеспечивает способность регулировать экспрессию целевого гена путем опосредованного аптамером/лигандом альтернативного сплайсинга, происходящего в пре-мРНК. Кассета генной регуляции дополнительно содержит рибопереключатель, содержащий сенсорную область (например, аптамер) и эффекторную область, которые вместе отвечают за определение присутствия лиганда, связывающего аптамер, и изменение сплайсинга альтернативного экзона. Эти управляемые аптамером рибопереключатели обеспечивают регуляцию экспрессии генов млекопитающих в 2-2000-кратной индукции в ответ на обработку лигандом, связывающим аптамер. Не имеющий аналогов динамический регуляторный диапазон этого синтетического рибопереключателя используется в способах согласно данному изобретению для создания систем скрининга новых аптамеров на предмет желаемых типов лигандов, а также на оптимальные лиганды против известных и новых аптамеров в клетках, тканях и организмах.

Рибопереключатель.

Используемый в данном документе термин "рибопереключатель" относится к регуляторному сегменту полинуклеотида РНК (или ДНК, кодирующей полинуклеотид РНК). Рибопереключатель в контексте данного изобретения содержит сенсорную область (например, аптамер) и эффекторную область, которые вместе ответственны за определение присутствия лиганда (например, малой молекулы) и изменение сплайсинга к альтернативному экзону. В одном варианте осуществления рибопереключатель является рекомбинантным с полинуклеотидами из двух или более источников. Используемый в данном документе в контексте рибопереключателя термин "синтетический" относится к рибопереключателю, который не встречается в природе. В одном варианте осуществления сенсорная и эффекторная области соединены при помощи полинуклеотидного линкера. В одном варианте осуществления полинуклеотидный линкер образует ножку РНК (то есть область полинуклеотида РНК, которая является двухцепочечной).

Библиотека рибопереключателей, как описано в данном документе, содержит множество последовательностей рецепторов, которые отличаются одним или более нуклеотидами в отношении полинуклеотидных кассет для лиганд-опосредованной экспрессии репортерного гена. Таким образом, каждый аптамер в библиотеке вместе с сенсорной областью находится в пределах 5'-интрон-альтернативный экзон-3'-интрон, как описано в данном документе.

Эффекторная область.

В одном варианте осуществления эффекторная область содержит последовательность 5'-сайта сплайсинга ("5'ss") 3' интрона (то есть последовательность интронного сайта сплайсинга, которая является непосредственно 3' альтернативного экзона). Эффекторная область содержит последовательность 5'-ss 3' интрона и последовательность, комплементарную 5'-ss последовательности 3' интрона. Когда аптамер связывает свой лиганд, эффекторная область образует ножку и, таким образом, предотвращает сплайсинг доорного сайта сплайсинга на 3'-конце альтернативного экзона. При определенных условиях (например, когда аптамер не связан со своим лигандом), эффекторная область находится в таком состоянии, которое обеспечивает, который обеспечивает доступ к донорному сайту сплайсинга на 3'-конце альтернативного

экзона, что приводит к включению альтернативного экзона в мРНК целевого гена.

Часть эффекторной области, принадлежащая ножке должна иметь достаточную длину (и содержание GC), чтобы существенно предотвратить альтернативный сплайсинг альтернативного экзона при лиганде, связывающем аптамер, и одновременно обеспечивать доступ к сайту сплайсинга, когда лиганд отсутствует в достаточных количествах. В вариантах осуществления изобретения часть эффекторной области, принадлежащая ножке, содержит последовательность ножки в дополнение к последовательности 5'-ss 3' интрона и его комплементарной последовательности. В вариантах осуществления изобретения эта дополнительная последовательность ножки содержит последовательность из аптамерной ножки. Длина и последовательность части, принадлежащей ножке, могут быть изменены с использованием известных методик для идентификации ножек, которые обеспечивают приемлемую фоновую экспрессию целевого гена, если лиганд отсутствует, и приемлемые уровни экспрессии целевого гена, если лиганд присутствует. Если ножка, например, слишком длинная, она может скрыть доступ к последовательности 5'-ss 3' интрона в присутствии или отсутствии лиганда. Если ножка слишком короткая, она может не образовывать стабильную ножку, способную секвестрировать последовательность 5'-ss 3' интрона, и в этом случае альтернативный экзон будет подвержен сплайсингу в транскрипт целевого гена в присутствии или отсутствии лиганда. В одном варианте осуществления общая длина ножки эффекторной области составляет от около 7 пар оснований до около 20 пар оснований. В некоторых вариантах осуществления длина ножки составляет от около 8 пар оснований до около 11 пар оснований. В некоторых вариантах длина ножки составляет от 8 пар оснований до 11 пар оснований. В дополнение к длине ножки, содержание пар оснований GC в ножке может быть изменено для изменения стабильности ножки.

Аптамер/лиганд.

Используемый в данном документе термин "аптамер" относится к полинуклеотиду РНК (или ДНК, кодирующей полинуклеотид РНК), который специфически связывается с лигандом или полинуклеотидом РНК, который подвергается скринингу для выявления специфического связывания с лигандом (то есть потенциальным аптамером) Библиотека аптамеров представляет собой набор потенциальных аптамеров, включающий множество предполагаемых аптамеров, имеющих нуклеотидную последовательность, которая отличается от других членов библиотеки по меньшей мере одним нуклеотидом.

Термин "лиганд" относится к молекуле, которая специфически связана с аптамером, или к потенциальному лиганду, который подвергается скринингу на способность связываться с одним или более аптамерами. Библиотека лигандов представляет собой коллекцию лигандов и/или потенциальных лигандов.

В одном варианте осуществления изобретения лиганд представляет собой молекулу с низкой молекулярной массой (менее чем около 1000 дальтон), включая, например, липиды, моносахариды, вторичные мессенджеры, кофакторы, ионы металлов, другие природные продукты и метаболиты, нуклеиновые кислоты, а также большинство лекарственных препаратов. В одном варианте осуществления лиганд представляет собой полинуклеотид с 2 или более нуклеотидными основаниями.

В одном варианте осуществления лиганд выбирают из группы, состоящей из 8-азагуанина, аденозин-5'-монофосфат моногидрата, амфотерицина В, авермектина В1, азатиоприна, хлормадинона ацетата, меркаптопурина, гидрохлорида морицизина, N6-метиладенозина, надида, прогестерона, промазина гидрохлорида, пирвиния памоата, сульфатуанидина, тестостерона пропионата, тиогуанозина, тилоксапола и вориностата.

В некоторых вариантах осуществления способы согласно данному изобретению используются для идентификации лиганда, который представляет собой внутриклеточную молекулу, которая связывается с аптамером (то есть эндогенным лигандом) в полинуклеотидной кассете, вызывая тем самым экспрессию репортерного гена. Например, клетки с репортерным геном, содержащим полинуклеотидную кассету для опосредованной аптамером/лигандом экспрессии, могут находиться под действием условий, таких как тепло, рост, трансформация или мутация, что приводит к изменениям в клеточных сигнальных молекулах, метаболитах, пептидах, липидах, ионах (например, Ca^{2+}) и т.д., которые могут связываться с аптамером и вызывать экспрессию репортерного гена. Таким образом, способы согласно данному изобретению можно использовать для идентификации аптамеров, которые связываются с внутриклеточными лигандами в ответ на изменения в состоянии клетки, включая, например, изменение клеточного сигналинга, клеточного метаболизма или мутаций внутри клеток. В другом варианте осуществления данное изобретение используется для идентификации аптамеров, которые связывают внутриклеточные лиганды, присутствующие в дифференцированных клетках. Например, способы согласно данному изобретению можно использовать для идентификации лигандов или аптамеров, которые связывают лиганды, которые присутствуют в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках. В одном варианте осуществления способы согласно данному изобретению можно использовать для скрининга ответа на дифференцировку клеток *in vivo* или физиологические изменения клеток *in vivo*.

Аптамерные лиганды также могут быть эндогенными компонентами клеток, которые значительно увеличиваются при определенных физиологических/патологических состояниях, например, при онкогенной трансформации - они могут включать молекулы вторичного мессенджера, такие как GTP или GDP, кальций; жирные кислоты или жирные кислоты, которые неправильно метаболизируются, такие как 13-HODE при раке молочной железы (Flaherty, JT et al., Plos One, Vol. 8, e63076, 2013, включенный в

данный документ посредством ссылки); аминокислоты или метаболиты аминокислот; метаболиты в пути гликолиза, которые обычно имеют более высокие уровни в раковых клетках или в нормальных клетках при метаболических заболеваниях; и связанные с раком молекулы, такие как Ras или мутантный белок Ras, мутантный EGFR при раке легкого, индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) при многих типах онкологических заболеваниях. Эндогенные лиганды включают метаболиты прогестерона при раке молочной железы, как описано JP Wiebe (Endocrine-Related Cancer (2006) 13: 717-738, включенный в данный документ посредством ссылки). Эндогенные лиганды также включают метаболиты с повышенными уровнями, возникающие в результате мутаций в ключевых метаболических ферментах при раке почки, такие как лактат, глутатион, кинуренин, как описано Minton, DR and Nanus, DM (Nature Reviews, Urology, Vol. 12, 2005, включенный в данный документ посредством ссылки).

Специфичность связывания аптамера с лигандом может быть определена в терминах сравнительных констант диссоциации (Kd) аптамера для его лиганда по сравнению с константой диссоциации аптамера для неродственных молекул. Таким образом, лиганд представляет собой молекулу, которая связывается с аптамером с большей аффинностью, чем с неродственным соединением. Как правило, Kd для аптамера по отношению к его лиганду будет по меньшей мере в около 10 раз меньше, чем Kd для аптамера с неродственными молекулами. В других вариантах осуществления Kd будет по меньшей мере в около 20 раз меньше, по меньшей мере в около 50 раз меньше, по меньшей мере в около 100 раз меньше и по меньшей мере в около 200 раз меньше. Аптамер обычно имеет длину от около 15 до около 200 нуклеотидов. Чаще всего аптамер будет иметь длину от 30 до 100 нуклеотидов.

Аптамеры, которые могут быть включены как часть рибопереклювателя и подвергнуты скринингу при помощи способов согласно данному изобретению, могут представлять собой встречающиеся в природе аптамеры или их модификации, или аптамеры, которые разработаны de novo или синтетически скринированы посредством систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением (SELEX). Примеры аптамеров, которые связывают низкомолекулярные лиганды, включают, но не ограничиваются ими, теофиллин, дофамин, сульфородамин В и целлобиозу, канамицин А, ливидомицин, тобрамицин, неомицин В, биомицин, хлорамфеникол, стрептомицин, цитокины, молекулы клеточной поверхности и метаболиты. Для обзора аптамеров, которые распознают малые молекулы, см., например, Famulok, Science 9: 324-9 (1999) и McKeague, M. & DeRosa, M.C. J. Nuc. Aci. 2012. В другом варианте осуществления аптамер представляет собой комплементарный полинуклеотид.

В одном варианте осуществления аптамер предварительно подвергают скринингу, чтобы связать конкретный низкомолекулярный лиганд *in vitro*. Такие способы конструирования аптамеров включают, например, SELEX. Способы конструирования аптамеров, которые селективно связывают малую молекулу с использованием SELEX, раскрыты, например, в патентах США №№ 5475096, 5270163 и Abdullah Ozer et al. Nuc. Aci. 2014, которые включены в данный документ посредством ссылки. Модификации процесса SELEX описаны в патентах США № 5580737 и 5567588, которые включены в данный документ посредством ссылки.

Предыдущие методы селекции для идентификации аптамеров обычно включают получение большого пула молекул ДНК или РНК желаемой длины, которые содержат область, которая рандомизирована или подвергнута мутагенезу. Например, пул олигонуклеотидов для отбора аптамеров может содержать область из 20-100 рандомизированных нуклеотидов, фланкированных областями определенной последовательности, которые имеют длину около 15-25 нуклеотидов и пригодны для связывания праймеров ПЦР. Пул олигонуклеотидов амплифицируют, используя стандартные методы ПЦР или другие способы, которые позволяют амплифицировать выбранные последовательности нуклеиновых кислот. Пул ДНК может быть транскрибирован *in vitro* для получения пула РНК-транскриптов, когда желателен РНК-аптамер. Затем пул олигонуклеотидов РНК или ДНК подвергают селекции на основании их способности специфически связываться с желаемым лигандом. Методы селекции включают, например, аффинную хроматографию, хотя может использоваться любой протокол, который позволит отбирать нуклеиновые кислоты на основе их способности специфически связываться с другой молекулой. Методы селекции для идентификации аптамеров, которые связывают малые молекулы и функционируют внутри клетки, могут включать методы скрининга на основе клеток. В случае аффинной хроматографии олигонуклеотиды приводят в контакт с целевым лигандом, который был иммобилизован на субстрате в колонке или на магнитных гранулах. Олигонуклеотид предпочтительно выбирают для связывания лиганда в присутствии концентраций соли, температур и других условий, которые имитируют нормальные физиологические условия.

Олигонуклеотиды в пуле, которые связываются с лигандом, остаются на колонке или грануле, а несвязанные последовательности вымываются. Олигонуклеотиды, которые связывают лиганд, затем амплифицируют (после обратной транскрипции, если используются РНК-транскрипты) с помощью ПЦР (обычно после элюирования). Селекционный процесс повторяется для выбранных последовательностей в общей сложности от трех до десяти итерационных циклов методики селекции. Полученные в результате олигонуклеотиды затем амплифицируют, клонируют и секвенируют с использованием стандартных процедур для идентификации последовательностей олигонуклеотидов, которые способны связывать целевой лиганд. Как только последовательность аптамера была идентифицирована, аптамер может быть допол-

нительно оптимизирован путем выполнения дополнительных циклов селекции, начиная с пула олигонуклеотидов, содержащих мутировавшую последовательность аптамера.

В одном варианте осуществления аптамер или библиотека аптамеров для использования в данном изобретении содержит один или более аптамеров, идентифицированных в скрининге аптамеров *in vitro*. В одном варианте осуществления аптамеры, идентифицированные в скрининге аптамеров *in vitro*, содержат один или более нуклеотидов, рандомизированных для создания библиотеки потенциальных аптамеров для использования в способах согласно данному изобретению.

Альтернативный экзон.

Альтернативным экзоном, который является частью полинуклеотидной кассеты генной регуляции согласно данному изобретению, может быть любая полинуклеотидная последовательность, способная транскрибироваться в пре-мРНК и альтернативно встраиваться в мРНК целевого гена. Альтернативный экзон, который является частью кассеты генной регуляции согласно данному изобретению, содержит по меньшей мере одну последовательность, которая ингибирует трансляцию, так что, когда альтернативный экзон включен в мРНК целевого гена, экспрессия целевого гена из этой мРНК предотвращается или уменьшается. В предпочтительном варианте осуществления альтернативный экзон содержит стоп-кодон (TGA, TAA, TAG), который находится в рамке считывания с целевым геном, когда альтернативный экзон включен в мРНК целевого гена путем сплайсинга. В вариантах осуществления альтернативный экзон содержит, помимо стоп-кодона или в качестве альтернативы стоп-кодону, другую последовательность, которая уменьшает или существенно предотвращает трансляцию, когда альтернативный экзон включается путем сплайсинга в мРНК целевого гена, включая, например, микроРНК-связывающий сайт, что приводит к деградации мРНК. В одном варианте осуществления альтернативный экзон содержит микроРНК-связывающую последовательность, которая приводит к деградации мРНК. В одном варианте осуществления альтернативный экзон кодирует полипептидную последовательность, которая снижает стабильность белка, содержащего эту полипептидную последовательность. В одном варианте осуществления альтернативный экзон кодирует полипептидную последовательность, которая направляет белок, содержащий эту полипептидную последовательность, на деградацию.

Базовый или фоновый уровень сплайсинга альтернативного экзона может быть оптимизирован путем изменения последовательностей экзонного энхансера сплайсинга (ESE) и последовательностей экзонного супрессора сплайсинга (ESS) и/или путем введения последовательностей ESE или ESS в альтернативный экзон. Такие изменения в последовательности альтернативного экзона могут быть выполнены с использованием способов, известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь этим, сайт-направленный мутагенез. Альтернативно, олигонуклеотиды желаемой последовательности (например, содержащие весь или часть альтернативного экзона) могут быть получены из коммерческих источников и клонированы в кассету генной регуляции. Идентификация последовательностей ESS и ESE может быть выполнена способами, известными в данной области техники, включая, например, использование ESEfinder 3.0 (Cartegni, L. et al. ESEfinder: веб-ресурс для идентификации экзонных энхансеров сплайсинга. *Nucleic Acid Research*, 2003, 31(13): 3568-3571) и/или другие доступные ресурсы.

В одном варианте осуществления альтернативный экзон является экзогенным по отношению к целевому гену, хотя он может быть получен из последовательности, происходящей из организма, в котором будет экспрессироваться целевой ген. В одном варианте осуществления альтернативный экзон представляет собой синтетическую последовательность. В одном варианте осуществления альтернативный экзон представляет собой природный экзон. В другом варианте осуществления альтернативный экзон получают из всего или части известного экзона. В этом контексте "производный" относится к альтернативной экзон-содержащей последовательности, которая по существу гомологична природному экзону или его части, но может содержать различные мутации, например, для введения стоп-кодона, который будет в рамке считывания с последовательностью целевого репортерного гена, или для введения или удаления экзонного энхансера сплайсинга, и/или введения удаления экзонного супрессора сплайсинга. В одном варианте осуществления альтернативный экзон получают из экзона 2 гена дигидрофолатредуктазы человека (DHFR), экзона 5 мутанта человеческой опухоли Вильмса 1, экзона 16 мышечной кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II дельта, или экзона 6 SIRT1.

5' и 3' интронные последовательности.

Альтернативный экзон фланкирован 5' и 3' интронными последовательностями. 5' и 3' интронные последовательности, которые можно использовать в кассете генной регуляции, могут представлять собой любую последовательность, которая может быть сплайсирована из целевого гена, создавая или мРНК целевого гена или целевой ген, содержащий альтернативный экзон в мРНК, в зависимости от присутствия или отсутствия лиганда, связывающего аптамер. Каждый из 5' и 3' интронов имеет последовательности, необходимые для осуществления сплайсинга, то есть последовательности донора сплайсинга, акцептора сплайсинга и точки ветвления. В одном варианте осуществления 5' и 3' интронные последовательности кассеты генной регуляции получают из одного или более природных интронов или их частей. В одном варианте осуществления 5' и 3' интронные последовательности получают из интрона 2 усеченного бета-глобина человека (IVS2A). В других вариантах осуществления 5' и 3' интронные последовательности получают из интрона мРНК SV40 (используемого в векторе pCMV-LacZ от Clontech), интрона 6 гена

триозофосфатизомеразы (TPI) человека (Nott Ajit, et al. RNA. 2003, 9:6070617), или интрона из человеческого фактора IX (Sumiko Kurachi et al. J. Bio. Chem. 1995, 270 (10), 5276), собственного эндогенного интрона целевого гена или любого геномного фрагмента или синтетических интронов (Yi Lai, et al. Hum Gene Ther. 2006:17(10): 1036), которые содержат элементы, достаточные для регулируемого сплайсинга (Thomas A. Cooper, Methods 2005 (37): 331).

В одном варианте осуществления альтернативный экзон и рибопереключателъ согласно данному изобретению сконструированы так, чтобы находиться в эндогенном интроне целевого гена. То есть интрон (или, по существу, аналогичная интронная последовательность) естественным образом встречается в этом положении целевого гена. В этом случае интронная последовательность непосредственно перед альтернативным экзоном называется 5' интрона или 5' интронной последовательностью, а интронная последовательность непосредственно после альтернативного экзона называется 3' интрона или 3' интронной последовательностью. В этом случае эндогенный интрон модифицируется так, чтобы он содержал последовательность акцептора сплайсинга и последовательность донора сплайсинга, фланкирующую 5'- и 3'-концы альтернативного экзона.

Донорные и акцепторные сайты сплайсинга в каскаде генной регуляции согласно данному изобретению могут быть модифицированы, чтобы быть усилены или ослаблены. То есть сайты сплайсинга могут быть модифицированы так, чтобы они были ближе к консенсусу для донора или акцептора сплайсинга, при помощи стандартных методов клонирования, сайт-направленного мутагенеза и тому подобным. Сайты сплайсинга, которые больше похожи на консенсус сплайсинга, имеют тенденцию способствовать сплайсингу и поэтому усиливаются. Сайты сплайсинга, которые менее похожи на консенсус сплайсинга, имеют тенденцию препятствовать сплайсингу и поэтому ослабляются. Консенсус для донора сплайсинга наиболее распространенного класса интронов (U2) представляет собой A/C A G || G T A/G A G T (где || обозначает границу экзон/интрон). Консенсус для акцептора сплайсинга: C A G || G (где || обозначает границу экзон/интрон). Частота конкретных нуклеотидов в донорных и акцепторных сайтах сплайсинга описана в данной области техники (см., например, Zhang, M.Q., Hum Mol Genet. 1988. 7(5): 919-932). Сила 5' и 3' сайтов сплайсинга может быть изменена так, чтобы модулировать сплайсинг альтернативного экзона.

Дополнительные модификации 5' и 3' интронов в каскаде генной регуляции могут быть сделаны для модуляции сплайсинга, включая модификацию, удаление и/или добавление элементов интронного энхансера сплайсинга и/или элементов интронного супрессора сплайсинга, и/или модификацию последовательности сайта ветвления.

В одном варианте осуществления 5' интрон был модифицирован, чтобы содержать стоп-кодон, который будет в рамке считывания с репортерным геном. 5' и 3' интронные последовательности также можно модифицировать для удаления защищенных сайтов сплайсинга, которые можно идентифицировать с помощью общедоступного программного обеспечения (см., например, Kapustin, Y. et al. Nucl. Acids Res. 2011. 1-8). Длины 5' и 3' интронных последовательностей могут быть изменены, чтобы, например, соответствовать требованиям к размеру для вирусных конструкторов экспрессии. В одном варианте осуществления 5' и 3' интронные последовательности имеют длину от около 50 до около 300 нуклеотидов. В одном варианте осуществления 5' и 3' интронные последовательности имеют длину от около 125 до около 240 нуклеотидов.

Репортерные гены.

Способы скрининга согласно данному изобретению используют каскаду генной регуляции, которая используется для регуляции экспрессии целевого гена (например, репортерного гена), который может быть экспрессирован в целевой клетке, ткани или организме. Репортерным геном может быть любой ген, экспрессия которого может быть использована для обнаружения специфического взаимодействия лиганда с аптамером в каскаде генной регуляции. В одном варианте осуществления репортерный ген кодирует флуоресцентный белок, включая, например, зеленый флуоресцентный белок (ЗФБ), голубой флуоресцентный белок, желтый флуоресцентный белок, оранжевый флуоресцентный белок, красный флуоресцентный белок или переключаемый флуоресцентный белок. В другом варианте осуществления репортерный ген кодирует фермент люциферазу, включающий, например, люциферазу светлячка, люциферазу *Renilla* или секреторную люциферазу *Gaussia*. В одном варианте осуществления репортерный ген представляет собой Р-галактозидазу. В одном варианте осуществления репортер представляет собой пероксидазу хрена (HRP). В одном варианте осуществления репортерный ген выбирают из группы, состоящей из ядерного белка, транспортера, белка клеточной мембраны, белка цитоскелета, рецептора, гормона роста, цитокина, сигнальной молекулы, регуляторной РНК, антитела и терапевтических белков или пептидов.

Конструкты экспрессии.

Данное изобретение предусматривает использование рекомбинантного вектора для введения в целевые клетки полинуклеотида, кодирующего репортерный ген и содержащего каскаду генной регуляции согласно данному изобретению. Во многих вариантах осуществления конструктор рекомбинантной ДНК согласно данному изобретению содержит дополнительные элементы ДНК, включая сегменты ДНК, которые обеспечивают репликацию ДНК в клетке-хозяине и экспрессию целевого гена в этой клетке на соответствующих уровнях. Специалисту в данной области техники понятно, что последовательности

контроля экспрессии (промоторы, энхансеры и тому подобное) выбирают на основании их способности стимулировать экспрессию репортерного гена в целевой клетке. "Вектор" означает рекомбинантную плазмиду, дрожжевую искусственную хромосому (YAC), мини-хромосому, мини-кольцевую ДНК или вирус (включая последовательности, полученные из вируса), которые содержат полинуклеотид, который должен быть доставлен в клетку-хозяина или *in vitro*, или *in vivo*. В одном варианте осуществления рекомбинантный вектор представляет собой вирусный вектор или комбинацию множества вирусных векторов. Вирусные векторы для аптамер-опосредованной экспрессии репортерного гена в целевой клетке известны в данной области техники и включают аденовирусные (AV) векторы, векторы на основе аденоассоциированных вирусов (AAV), ретровирусные и лентивирусные векторы и векторы на основе вируса простого герпеса 1-ого типа (HSV1).

Способы разделения библиотек аптамеров на подбиблиотеки.

В другом аспекте данного изобретения предлагаются способы разделения больших библиотек олигонуклеотидов на более мелкие подбиблиотеки и подходы к созданию плазмидных библиотек для скрининга с помощью клеточного анализа синтетических рибопереключателей на основе аптамера. Один аспект изобретения обеспечивает способ разделения библиотеки олигонуклеотидов на более мелкие подбиблиотеки, включающий стадии:

(a) обеспечения библиотеки олигонуклеотидов, причем олигонуклеотиды в библиотеке содержат множественные 5' и 3' константные области,

(b) выполнения ПЦР с двумя циклами с использованием библиотеки олигонуклеотидов в качестве матрицы и первых праймеров, и вторых праймеров, которые комплементарны 5' и 3' константным областям,

(c) выделения продуктов в ПЦР с двумя циклами и

(d) ПЦР-амплификации подмножества выделенных продуктов ПЦР с двумя циклами с использованием праймеров, комплементарных подмножеству уникальных 5' и 3' константных областей.

В одном варианте осуществления библиотека олигонуклеотидов представляет собой рандомизированную библиотеку аптамеров, содержащую один или более рандомизированных нуклеотидов. Последовательности аптамеров фланкированы левой и правой константной областью, которая содержит сайт рестрикции для последующего клонирования.

В одном варианте осуществления первый или второй праймер в ПЦР с двумя циклами содержит метку, выбранную из группы, состоящей из биотина, дигоксигенина (DIG), бромодезоксиуридина (БДУ), флуорофора, химической группы, например, тиольной группы, или химической группы, например, азидов, используемых в клик-химии. Эти молекулы могут быть связаны с олигонуклеотидами, и их взаимодействующими молекулами, такими как стрептавидин или модифицированные формы авидина для биотина, антитела против DIG или BrdU, или флуорофора, или вторая тиоловая группа с образованием дисульфида, алкиновая группа для азидов, могут быть иммобилизованы на твердой поверхности для облегчения выделения меченых олигонуклеотидов.

Как только библиотека аптамеров разделена на подбиблиотеки аптамеров, аптамеры в одной или более подбиблиотеках вводятся в полинуклеотидную кассету генной регуляции для создания библиотеки рибопереключателей и подвергаются скринингу на связывание лиганда с помощью способов, представленных в данном документе.

Способы разделения библиотек рибопереключателей на подбиблиотеки.

В одном аспекте данное изобретение обеспечивает способ разделения библиотеки рибопереключателей на подбиблиотеки. Используемая в данном документе библиотека рибопереключателей представляет собой плазмидную библиотеку, содержащую полинуклеотидную кассету генной регуляции, например, как описано в данном документе и в PCT/US2016/016234, содержащую множество аптамеров, причем отдельные члены библиотеки содержат последовательности аптамеров, которые отличаются от других членов библиотеки. В вариантах осуществления аптамеры в библиотеке рибопереключателей содержат один или более рандомизированных нуклеотидов. В вариантах осуществления плазмидная библиотека рибопереключателей была создана из подбиблиотеки аптамеров, созданной способами, описанными в данном документе.

Способ разделения библиотеки рибопереключателей на подбиблиотеки включает стадии:

(a) введения библиотеки аптамеров в плазмиду, содержащую полинуклеотидную кассету генной регуляции, описанную в данном документе, для создания библиотеки рибопереключателей;

(b) введения библиотеки рибопереключателей в бактерии (например, *E. coli*);

(c) сбора бактериальных клонов (например, путем отбора бактериальных колоний) и выделения плазмидной ДНК для получения плазмидных подбиблиотек рибопереключателей (называемых в данном документе первичными подбиблиотеками);

(d) необязательно, генерации вторичной подбиблиотеки рибопереключателей из первичной плазмидной подбиблиотеки рибопереключателей путем введения первичной подбиблиотеки в бактерии, сбора бактериальных клонов и выделения плазмидной ДНК.

В данной области техники известны способы введения последовательностей в плазмиды для создания библиотеки, а также способы введения плазмид в бактерии и получения бактериальных клонов. Бак-

териальные клоны, содержащие член плазмидной библиотеки рибопереключателей, могут быть собраны путем посева бактерий и отбора отдельных колоний. Объединенные плазмиды из этих клонов образуют подбиблиотеку. Количество собранных бактериальных клонов определяет размер (количество уникальных членов) подбиблиотеки рибопереключателей, и может быть создано множество подбиблиотек. Одна или более первичных подбиблиотек могут быть дополнительно разделены для создания вторичных подбиблиотек для дальнейшего уменьшения размера подбиблиотек. Подбиблиотеки подвергаются скринингу с использованием способов, описанных в данном документе, путем введения одной или более подбиблиотек в эукариотические клетки, воздействия на клетки представляющим интерес лигандом и измерения экспрессии репортерного гена из полинуклеотидной кассеты регуляции генов. Увеличение экспрессии репортерного гена в ответ на лиганд указывает на то, что один или более членов библиотеки содержат аптамер, который связывается с лигандом в контексте рибопереключателей. Таким образом, размер подбиблиотеки, которая может быть подвергнута скринингу, может определяться чувствительностью анализа для измерения экспрессии репортерного гена. В вариантах осуществления изобретения подбиблиотека содержит от около 50 до около 600 уникальных членов (хотя некоторые члены могут повторяться в других подбиблиотеках).

Следует понимать и ожидать, что изменение раскрытых в данном документе принципов изобретения может быть выполнено специалистом в данной области техники, и предполагается, что такие модификации должны быть включены в объем данного изобретения. Все ссылки, цитируемые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте. Следующие примеры дополнительно иллюстрируют изобретение, но не должны истолковываться как ограничивающие объем изобретения.

Пример 1.

Скрининг на основе клеток млекопитающих на наличие аптамеров/лигандов с использованием рибопереключателей, регулирующих ген, связанный со сплайсингом.

Методики:

Конструирование рибопереключателей: Рибопереключатели были сконструированы как описано в PCT/US2016/016234 (в частности, в примерах 3-6), включенной в данный документ посредством ссылки. Усеченную последовательность интрона бета-глобина человека синтезировали и вставляли в кодирующую последовательность гена люциферазы светлячка. Экзон 2 мутантной DHFR человека был синтезирован и вставлен в середину этой усеченной последовательности интрона бета-глобина с использованием стратегии клонирования Golden Gate. Аптамеры, включающие $xpt-G/A^1$, $ydhl-G/A^2$, yxj^3 , add^4 , $gdg6-G/A^5$ (ссылки на аптамеры включены в данное описание посредством ссылки), синтезировали как олигонуклеотиды ("олиго") с 4-нуклеотидным оверхенгом на 5'-конце, который комплементарен двум различным сайтам BsaI по отдельности (IDT), отжигали и лигировали с расщепленным BsaI вектором mDHFR-Lucis-ассептор.

Трансфекция: $3,5 \times 10^4$ клеток НЕК 293 высевали в 96-луночный плоскодонный планшет за сутки до трансфекции. Плазмидную ДНК (500 нг) добавляли в пробирку или 96-луночный планшет с U-образным дном. Отдельно реагент TransIT-293 (Minis; 1,4 мкл) добавляли к 50 мкл среды Opti-mem I (Life Technologies) и оставляли на 5 минут при комнатной температуре (RT). Затем 50 мкл этого разбавленного реагента для трансфекции добавляли к ДНК, смешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 минут. Наконец, 7 мкл этого раствора добавляли в лунку с клетками в 96-луночном планшете.

Анализ люциферазы светлячка культивируемых клеток: Через 24 часа после смены среды планшеты извлекали из инкубатора и уравнивали до комнатной температуры в течение нескольких минут на лабораторном столе, затем подвергали аспирации. Добавляли лизирующий буфер Glo Lysis (Promega, 100 мкл, RT) и планшеты поддерживали при комнатной температуре в течение по меньшей мере 5 минут. Затем содержимое лунки смешивали путем суспендирования 50 мкл, и 20 мкл каждого образца смешивали с 20 мкл реагента Bright-Glo (Promega), который был разбавлен до 10% в буфере Glo Lysis. 96 лунок были расположены на непрозрачном белом 384-луночном планшете. После 5-минутной инкубации при комнатной температуре люминесценцию измеряли на приборе Тесап со временем считывания 500 мс. Активность люциферазы выражали как среднюю относительную световую единицу (ОСЕ) \pm СО, а кратность индукции рассчитывали как активность люциферазы, полученную при обработке гуанином, деленную на активность люциферазы, полученную без обработки гуанином.

Результаты:

Начиная с люциферазы в качестве репортерного гена, была создана платформа для экспрессии гена путем вставки интрона человеческого β -глобина в середину кодирующей последовательности люциферазы светлячка и содержащего мутантный стоп-кодон экзона 2 DHFR человека в интронной части. Таким образом, экспрессия репортерного гена контролируется путем включения или исключения экзона mDHFR, содержащего стоп-кодон, который находится в рамке считывания с репортерным геном. В этой системе шпилечная структура в мРНК, образованная сайтом связывания U1 и вставленной комплементарной последовательностью, блокирует включение экзона mDHFR, следовательно, обеспечивая экспрессию целевого гена (Фиг. 1а). Чтобы сделать формирование шпилечной структуры регулируемым, а

значит и контролируемой экспрессию целевого гена при помощи малых молекул, мы привили синтетические аптамеры (теофиллин) или натуральные аптамеры (аптамеры xpt-G/A, uxj, ydhl-A/G, add-A/G), или гибридный аптамер gdg6-G/A) к этой основанной на сплайсинге платформе регуляции генов между U1-связывающим сайтом и его комплементарной последовательностью, и генерировали синтетические рибопереключателы, которые регулируют экспрессию генов в клетках млекопитающих. Используя нашу основанную на сплайсинге кассету генной регуляции и вставляя различные аптамеры в наш синтетический конструкт рибопереключателы, мы продемонстрировали различные функциональные ответы на лиганд в отношении клеток млекопитающих. Эти рибопереключателы с гуаниновыми аптамерами отвечают как на гуанин, так и на гуанозин, как изображено на фиг. 1b. Xpt-гуаниновый рибопереключател, xpt-G17 (раскрытый в PCT/US2016/016234, см., например, SEQ ID NO: 15, включенную в данный документ посредством ссылки), дал высокий динамический диапазон индукции экспрессии репортерного гена в ответ на лиганд при обработке его природным лигандом.

Хотя рибопереключателы на основе природных аптамеров имеют высокий динамический диапазон в регуляции экспрессии генов в клетках млекопитающих, природа лигандов для этих природных аптамеров ограничивает их применимость *in vivo*. Используя преимущества нашей высокодинамичной платформы генной регуляции с рибопереключателами, мы сначала выбрали список аналогов гуанина, которые имеют различные химические группы в положении N2, чтобы проверить их активность на рибопереключателе xpt-G17. Как изображено на фиг. 1c, при концентрации 500 мкМ несколько соединений N2 индуцировали активность люциферазы в клетках с конструктом xpt-G17, причем N2-феноксиацетилгуанин является наиболее мощным (1303-кратная индукция), как изображено на фиг. 1d. Чтобы расширить список соединений для использования в качестве потенциальных лигандов, была использована библиотека Prestwick (коллекция из 1280 клинически одобренных лекарств) при 100 мкМ для скрининга оптимальных лигандов для активации известных аптамеров в клетках млекопитающих. Как изображено на фиг. 1e из предварительного скрининга, гуаниновый рибопереключател xpt-G17 отвечал не только на гуанин, но и на 8-азагуанин, надид, N6-метиладенозин, пропионат тестостерона, аденозин-5'-монофосфат моногидрат, амфотерицин В, тиогуанин, тилоксапол, прогестерон и ацетат хлормадинона, как изображено на фиг. 1e, а также ряд других соединений, как указано в таблице 1. Интересно, что некоторые из этих соединений, которые проявляли активность в отношении рибопереключателы xpt-G17, структурно очень отличаются от гуанина или гуанозина. Библиотека Prestwick была дополнительно подвергнута скринингу с использованием других 8 пуриновых рибопереключателы, и был получен ряд соединений, которые могут активировать рибопереключателы в индукции активности люциферазы (табл. 1). Эти результаты демонстрируют важность применения системы рибопереключателы для обнаружения потенциальных оптимальных лигандов для известного аптамера в клеточной среде, что дополнительно подчеркивает важность генерации аптамеров в клетках, в которых рибопереключател должен будет функционировать.

Таблица 1

Рибопереключател	Название соединения	Кратность индукции
xpt-G17	8-азагуанин	131,0
xpt-G17	Азатиоприн	6,2
xpt-G17	Циннаризин	3,5
xpt-G17	Пиметиксен малеата	4,7
xpt-G17	N6-метиладенозин	30,7
xpt-G17	Тиогуанозин	21,0
xpt-G17	Аденозин-5'-монофосфат моногидрат	28,4
xpt-G17	Амфотерицин В	21,5
xpt-G17	Тестостерон пропионат	29,0
xpt-G17	Галопрогин	5,1
xpt-G17	Идебенон	3,3
xpt-G17	Зотепин	4,3

xpt-G17	Прогестерон	12,0
xpt-G17	Тенатопразол	3,2
xpt-G17	Малеатная соль ацетопромазина	4,5
xpt-G17	Этофенамат	7,5
xpt-G17	Меркаптопурин	3,6
xpt-G17	Авермектин В1	4,0
xpt-G17	Промазина гидрохлорид	3,7
xpt-G17	Надид	40,9
xpt-G17	Тримепразина тартрат	4,9
xpt-G17	Прометазина гидрохлорид	5,3
xpt-G17	Тилоксапол	16,2
xpt-G17	Хлормадинона ацетат	10,3
xpt-G17	Пирвиний памоат	5,1
gdg6-A8	8-азагуанин	305,9
gdg6-A8	Циметидин	3,0
gdg6-A8	Азатиоприн	19,9
gdg6-A8	Диперодона гидрохлорид	3,0
gdg6-A8	Пиметиксен малеата	9,2
gdg6-A8	Тиогуанозин	20,1
gdg6-A8	Малеатная соль ацетопромазина	8,6
gdg6-A8	Меркаптопурин	17,2
gdg6-A8	Опипрамола дигидрохлорид	3,1
gdg6-A8	Промазина гидрохлорид	12,6
gdg6-A8	Малеатная соль метотримепазина	5,0
gdg6-A8	Диенэстрол	4,3
gdg6-A8	Малеатная соль тримипрамина	5,3
gdg6-A8	Тримепразина тартрат	8,7
gdg6-A8	Прометазина гидрохлорид	4,8
gdg6-A8	Вориностаг	6,4
gdg6-A8	Метиазол	3,8
yxj-A6	8-азагуанин	55,6

yxj-A6	Азатиоприн	6,6
yxj-A6	Пиметиксен малеата	4,9
yxj-A6	Тиогуанозин	10,2
yxj-A6	Малеатная соль ацетопромазина	3,1
yxj-A6	Меркаптопурин	10,0
yxj-A6	Промазина гидрохлорид	6,6
yxj-A6	Сульфаквиноксалин натрия	3,4
yxj-A6	Малеатная соль тримипрамина	3,3
yxj-A6	Тримепразина тартрат	7,0
yxj-A6	Прометазина гидрохлорид	7,9
yxj-A6	Мезилаг пирлиндол	3,2
add-A6	8-азагуанин	22,1
add-A6	Азатиоприн	6,5
add-A6	Пиметиксен малеата	4,2
add-A6	Тиогуанозин	5,9
add-A6	Малеатная соль ацетопромазина	3,5
add-A6	Меркаптопурин	15,0
add-A6	Опипрамола дигидрохлорид	4,3
add-A6	Промазина гидрохлорид	10,5
add-A6	Сульфаквиноксалин натрия	3,3
add-A6	Теразозина гидрохлорид	3,5
add-A6	Малеатная соль тримипрамина	3,4
add-A6	Тримепразина тартрат	4,0
add-A6	Прометазина гидрохлорид	4,5
add-A6	Цитрат дептропина	3,3
add-A6	Алкурония хлорид	4,2
ydhl-A6	Гидрохлоротиазид	3,3
ydhl-A6	8-азагуанин	3,7
ydhl-A6	Тиклопидина гидрохлорид	3,1
ydhl-A6	Цитратная соль альверина	4,2
ydhl-A6	Винкамин	3,3

ydhl-A6	Идебенон	3,5
ydhl-A6	Пепстатин А	4,0
ydhl-A6	Модафинил	3,8
ydhl-A6	Бенперидол	3,1
ydhl-A6	Дигоксигенин	4,5
ydhl-A6	Дигоксигенин	3,3
ydhl-A6	Морицизина гидрохлорид	10,3
ydhl-A6	Пивмециллинам гидрохлорид	3,2
ydhl-A6	Пиперидолата гидрохлорид	3,4
ydhl-A6	Оксапрозин	3,4
ydhl-A6	Имидомочевина	4,3
ydhl-A6	Мекамиламина гидрохлорид	3,2
xpt-A8	8-азагуанин	95,1
xpt-A8	Азатиоприн	5,9
xpt-A8	Пиметиксен малеата	3,3
xpt-A8	Тиогуанозин	11,8
xpt-A8	Меркаптопурин	3,4
xpt-A8	Промазина гидрохлорид	4,1
xpt-A8	Прометазина гидрохлорид	5,4
gdg6-G8	8-азагуанин	42,3
gdg6-G8	Азатиоприн	16,2
gdg6-G8	Пиметиксен малеата	5,1
gdg6-G8	Тиогуанозин	15,9
gdg6-G8	Амфотерицин В	3,8
gdg6-G8	Малеатная соль ацетопромазина	3,2
gdg6-G8	Меркаптопурин	16,2
gdg6-G8	Промазина гидрохлорид	6,2
gdg6-G8	Малеатная соль тримипрамина	3,3
gdg6-G8	Тримепразина тартрат	6,2
gdg6-G8	Прометазина гидрохлорид	6,5
gdg6-G8	Пенбутолола сульфат	3,3

gdg6-G8	Вориностат	10,2
gdg6-G8	Метиазол	3,3
gdg6-G8	Эстриол	4,3
add-G6	8-азагуанин	47,9
add-G6	Никлозамид	3,0
add-G6	Азатиоприн	11,4
add-G6	Линестренол	3,8
add-G6	R (-)-апоморфин гидрохлорид гемигидрата	3,4
add-G6	Даназол	3,7
add-G6	Кампотецин (S, +)	5,7
add-G6	Циннаризин	3,6
add-G6	Пиметиксен малеата	6,6
add-G6	Флунаризина дигидрохлорид	4,7
add-G6	N6-метиладенозин	20,8
add-G6	Тиогуанозин	7,9
add-G6	Аденозин-5'-монофосфат моногидрат	9,4
add-G6	Бепридила гидрохлорид	4,4
add-G6	Амфотерицин В	10,7
add-G6	Тестостерон пропионат	8,8
add-G6	Галопрогин	5,9
add-G6	Идебенон	6,7
add-G6	Меклоциклина сульфосалицилат	3,4
add-G6	Прогестерон	6,0
add-G6	Малеатная соль ацетопромазина	5,0
add-G6	Этофенамат	5,1
add-G6	Меркаптопурин	14,3
add-G6	Бензамила гидрохлорид	3,0
add-G6	Авермектин В1	11,8
add-G6	Промазина гидрохлорид	5,4
add-G6	Надид	30,8
add-G6	Малеатная соль тримипрамина	3,4

add-G6	Тримепразина тартрат	6,2
add-G6	Симвастатин	6,2
add-G6	Прометазина гидрохлорид	6,7
add-G6	Протриптилина гидрохлорид	5,0
add-G6	Хлормадинона ацетат	26,1
add-G6	Номегестрола ацетат	3,5
add-G6	Пирвиний памоат	15,8
add-G6	Сертаконазола нитрат	6,5
add-G6	Воринонат	3,6
ydhl-G8	Сульфагуанидин	13,9
ydhl-G8	8-азагуанин	35,6
ydhl-G8	N6-метиладенозин	10,7
ydhl-G8	Тиогуанозин	7,5
ydhl-G8	Аденозин-5'-монофосфат моногидрат	5,9
ydhl-G8	Амфотерицин В	6,5
ydhl-G8	Тетракаина гидрохлорид	3,6
ydhl-G8	Малеатная соль ацетопромазина	3,9
ydhl-G8	Азеластина гидрохлорид	3,0
ydhl-G8	Этофенамат	4,8
ydhl-G8	Меркаптопурин	3,6
ydhl-G8	Промазина гидрохлорид	5,2
ydhl-G8	Надид	11,7
ydhl-G8	Тримепразина тартрат	5,0
ydhl-G8	Хлормадинона ацетат	10,4
ydhl-G8	Пирвиний памоат	5,5
ydhl-G8	Воринонат	3,0

Последовательности для рибопереключателей, используемые в скрининге библиотеки Prestwick, представлены ниже с последовательностями ножек заглавными буквами и последовательностями аптамеров строчными буквами: xpt-A8 (SEQ ID NO: 1):

GTAATGTataatcgcgtggatagggcacgcaagttctaccgggcaccgtaaatgtccgattACATTAC

add-G6 (SEQ ID NO: 2):

GTAATGTGtataatcctaataatgataggtttgggagttctaccaagagccttaactcttgactaCACATTAC

add-A6 (SEQ ID NO: 3):

GTAATGTGtataatcctaataatgataggtttgggagttctaccaagagccttaactcttgattaCACATTAC

gdg6-A8 (SEQ ID NO: 4):

GTAATGTacagggtagcataatgggctactgaccccgccgggaacctatttcccgattACATTAC

gdg6-G8 (SEQ ID NO: 5):

GTAATGTacagggtagcataatgggctactgaccccgccgggaacctatttcccgactACATTAC

Ydhl-G8 (SEQ ID NO: 6):

GTAATGTataacctcaataataggtttgagggtgtctaccaggaaccgtaaaatcctgactACATTAC

Ydhl-A6 (SEQ ID NO: 7):

GTAATGTGtataacctcaataataggtttgagggtgtctaccaggaaccgtaaaatcctgattaCACATTAC

yxj-A6 (SEQ ID NO: 8):

GTAATGTGtatatgatcagtaaataggtctgattgtttctacctaagtaaccgtaaaaaactagattaCACATTAC

Пример 2.

Дизайн и синтез библиотеки аптамеров.

Методика.

Для создания библиотеки аптамеров были рандомизированы нуклеотиды в положениях в аптамере, которые идентифицированы по кристаллической структуре^{6,7} как потенциально вовлеченные в связывание лиганда. Чтобы облегчить конструирование аптамеров в рибопереклочатели, область аптамера была фланкирована константными областями с сайтами разрезания рестриктазы типа II (например, BsaI). Эти ультрамерные олигонуклеотиды размером 153 п.о., содержащие аптамерную последовательность с рандомизированными основаниями, были синтезированы с помощью IDT:

```
GACTTCGGTCTCATCCAGAGAATGAAAAAAAAATCTTCAGTAGAAGGTAATGTATA
NNNGCGTGGATATGGCACGCNNGNNNNCNCCGGGCACCGTAAATGTCCGACTACAT
TACGCACCATTCTAAAGAATAACAGTGAAGAGACCAGACGG (N представляет собой
случайные нуклеотиды) (SEQ ID NO: 9).
```

Для создания большего разнообразия последовательностей в библиотеке аптамеров, основания в большем количестве положений могут быть рандомизированы. Полностью случайная последовательность также может быть использована для создания библиотеки аптамеров.

Результаты.

Как описано в примере 1, мы успешно создали синтетические рибопереклочатели, которые регулируют экспрессию генов млекопитающих в ответ на обработку низкомолекулярными лигандами. Один из рибопереклочателей xrt-G17, который содержит гуаниновый аптамер xrt-G в основанной на сплайсинге кассете генной экспрессии. Используя люциферазу в качестве репортерного гена, мы достигли высокого динамического диапазона регуляции гена в ответ на обработку гуанином, с кратностью индукции 2000 при высокой концентрации гуанина. Этот беспрецедентный динамический диапазон активности регуляции генов при помощи конструкторов для опосредованного аптамером/лигандом альтернативного сплайсинга обеспечивает систему для скрининга аптамеров против желаемого лиганда в клетках млекопитающих или для скрининга лигандов, которые связывают и активируют известные аптамеры.

Xrt-G17 выбирали в качестве платформы для создания начальной библиотеки рибопереклочателей. Конфигурация олигонуклеотидной последовательности была разработана для замены природного гуанинового аптамера xrt-G на следующих этапах клонирования. Нуклеотиды в гуаниновом аптамере xrt-G в положениях, которые, как известно, являются критическими для связывания гуанина на основе кристаллографического анализа, были рандомизированы. Первоначально было рандомизировано 10 положений, в результате чего была создана библиотека из 1048576 аптамерных последовательностей. Когда более 10 положений рандомизированы, могут быть созданы библиотеки, содержащие более 10⁶ последовательностей. Несмотря на то, что последовательность остова гуанинового аптамера xrt-G использовали в данном документе селективно для рандомизации, аналогичный подход может быть использован для создания библиотек аптамеров с другими известными аптамерами или даже совершенно случайных последовательностей без известных лигандов. Хотя мы выбрали в данном документе xrt-G17 в качестве платформы, важно отметить, что рибопереклочатели с различными аптамерами или рибопереклочатели, основанные на механизмах, отличных от сплайсинга, также могут использоваться в качестве стартовой платформы для генерации рандомизированных аптамерных последовательностей.

Пример 3.

Разделение большой рандомизированной библиотеки аптамеров на более мелкие подбиблиотеки аптамеров.

Методики.

Олигонуклеотиды (олиго): Набор праймеров JF или JR имеет последовательность 3' части, комплементарную константным областям в синтезированных аптамерных олигонуклеотидов, и последовательность 5' части, содержащую случайные 20-мерные олигонуклеотидные последовательности. Набор праймеров F или R дополняет случайные 20-мерные олигонуклеотидные последовательности в праймерах JF или JR. Все праймеры синтезированы в IDT. Праймеры JF были помечены биотином на 5'-конце (IDT). Синтезированные олигонуклеотиды суспендировали в воде, не содержащей ДНКазу и РНКазу, до 100 мкМ в виде маточного раствора, разбавляли до желаемой концентрации и количественно определяли с помощью аппарата Nanodrop или метода OliGreen (ThermoFisher).

ПЦР-амплификация с двумя циклами: чтобы добавить биотинилированную олигонуклеотидную метку, выполняли ПЦР-амплификацию с двумя циклами с использованием набора для ПЦР Pfx Platinum, следуя протоколу производителя, в реакционном объеме 10 мкл. Олигонуклеотидные матрицы использовали в желаемых количествах копий в реакции ПЦР (от 1 до 5 копий на олигонуклеотидную последовательность в библиотеке аптамеров). Для первого цикла амплификации включали только обратные праймеры JR. Амплификацию проводили при 94°C в течение 2 минут, затем при 94°C в течение 10 секунд, отжиг с помощью программы для плавного снижения температуры от 66°C до 52°C со скоростью снижения 0,5°C в минуту. Затем полимеразную реакцию продолжали при 68°C в течение 20 секунд с после-

дующим охлаждением до 4°C. Затем 10 мкл смеси ПЦР без матрицы, но содержащей биотинилированные прямые праймеры (биотин-JF), добавляли в пробирку для первого цикла ПЦР для второго цикла амплификации с использованием тех же стадий ПЦР. Продукты ПЦР были готовы для инкубации со стрептавидиновыми гранулами.

Выделение биотинилированных олигонуклеотидов (олиго): 2× буфер для связывания и отмывки (BW-буфер) делали из буфера 1×TE (Ambion) с 2 M NaCl. Dynabeads M-270 Streptavidin (ThermoFisher) (SA-гранулы) блокировали 20 мкМ раствором тРНК дрожжей (Ambion) в течение 10 минут при комнатной температуре, дважды промывали 1×BW-буфером и повторно суспендировали в том же объеме буфера 2×BW в качестве начального объема используемых гранул. 50 мкл этих обработанных гранул добавляли к продуктам ПЦР вместе со 100 мкл 2×BW-буфера и 30 мкл воды. 200 мкл смеси биотинилированных олигонуклеотидов и SA-гранул инкубировали при комнатной температуре в течение 60 минут, затем гранулы денатурировали при 95°C в течение 5 минут, сразу охлаждали на льду и один раз промывали 1×BW-буфером, дважды водой в течение 5 минут, следуя протоколу производителя. Промывочный раствор удаляли в максимально возможной степени, и промытые гранулы были готовы к ПЦР-реакции.

ПЦР, специфические к олигонуклеотидному тэгу последовательности: Гранулы с биотинилированными продуктами ПЦР добавляли к общей 50 мкл смеси ПЦР с использованием набора для ПЦР Pfx Platinum. Праймеры представляют собой смесь набора праймеров F и R. ПЦР предварительно нагревали при 94°C в течение 2 минут, подвергая 28 циклам при 94°C в течение 15 секунд, 62°C в течение 30 секунд, 68°C в течение 20 секунд и дополнительному удлинению при 68°C в течение 2 минут. Продукт ПЦР охлаждали до 12°C и готовили для второго раунда ПЦР. Для второго раунда ПЦР-амплификации 1 мкл продукта ПЦР из первого раунда ПЦР использовали в качестве матрицы, а одну пару праймеров F и R использовали для амплификации матриц, помеченных комплементарными последовательностями. Реакционную смесь ПЦР предварительно нагревали до 94°C и амплифицировали с помощью 25 циклов: 94°C в течение 15 секунд, 60°C в течение 30 секунд, 68°C в течение 20 секунд и дополнительно удлиняли при 68°C в течение 2 минут.

Результаты.

Хотя селекцию *in vitro* с использованием систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением (SELEX)^{8,9} широко применяли для скрининга больших библиотек аптамеров, обычно с последовательностями от 10¹³ до 10¹⁴, для генерации многочисленных аптамеров против широкого спектра лигандов, включая метаболиты, кофакторы витаминов, ионы металлов, белки и даже целые клетки¹⁰, способы скрининга на основе клеток таких больших рандомизированных библиотек аптамеров не были разработаны. Более того, немногие аптамеры, генерируемые при помощи SELEX, оказались эффективными в клеточной среде, что подчеркивает важность скрининга аптамеров в клеточной среде, где они должны будут функционировать. Для того чтобы выбранные аптамеры работали в клетках, связывание специфического аптамера с его лигандом должно иметь функциональное следствие - которое нельзя проверить с помощью SELEX, которая отбирает аптамеры только на основе связывания лиганда в условиях *in vitro*. Одной из проблем разработки скрининга аптамеров на основе клеток млекопитающих является низкий динамический диапазон регуляции генов рибопереключателей на основе аптамера(ов) в ответ на обработку лигандом. В дополнение к этому фундаментальному ограничению, собственная низкая эффективность генной трансдукции в клетках млекопитающих создает еще один барьер для скрининга библиотек, содержащих более 10 последовательностей. Тем не менее, мы разработали синтетические рибопереключатели, которые могут генерировать кратность индукции экспрессии генов вплоть до нескольких тысяч при обработке лигандом. Этот высокий динамический диапазон генной регуляции обеспечивает основу клеточной системы для скрининга аптамеров/лигандов. Для выбора аптамеров в эукариотических клетках из больших библиотек аптамеров, которые имеют высокое разнообразие последовательностей, данное изобретение предлагает множество стратегий и подходов для разделения/разбивки больших библиотек аптамеров на более мелкие подбиблиотеки, которые могут быть клонированы в кассету рибопереключателей для генерации библиотек плазмид, которые можно подвергнуть скринингу с помощью анализов на основе клеток млекопитающих.

Стратегия разделения больших библиотек аптамеров заключается в том, чтобы сначала добавить пару уникальных последовательностей как на 5'-, так и на 3'-концах синтезированных рандомизированных олигонуклеотидных последовательностей аптамеров (как описано в примере 2). На втором этапе этой стратегии последовательности аптамеров, прикрепленных (помеченных/маркированных) к уникальным олигонуклеотидным последовательностям, могут быть амплифицированы с использованием одной пары праймеров, комплементарных каждой паре меток последовательности, таким образом генерируя различные подбиблиотеки аптамеров (фиг. 3а). Этот двухэтапный процесс мечения и ПЦР может быть повторен, чтобы разделить библиотеку до желаемых размеров.

Чтобы прикрепить уникальные пары последовательностей к матрице, мы разработали несколько подходов (фиг. 3б). Один из подходов заключается в использовании ПЦР для включения уникальных последовательностей в матрицу (метод ПЦР). Другие подходы включают лигирование метки одноцепочечной последовательности в одноцепочечную матрицу с использованием T4 РНК-лигазы и лигирование

меток двухцепочечной последовательности при помощи Т4 ДНК-лигазы в двухцепочечные матрицы, которые генерируются путем ПЦР-амплификации одноцепочечных олигонуклеотидных матриц (метод лигирования). Мы разработали и протестировали метод ПЦР с двумя циклами (фиг. 3с), и в настоящее время мы тестируем методы лигирования для добавления уникальных меток последовательностей.

Для использования метода ПЦР для присоединения меток последовательности для создания меченой библиотеки аптамеров был разработан один набор праймеров для ПЦР (JF и JR). Этот набор праймеров содержит последовательность меток в 5'-части праймеров и в 3'-части праймеров, последовательность, которая комплементарна константной области в синтезированных аптамерных олигонуклеотидах. Чтобы избежать неоднородности, генерируемой многоцикловой традиционной ПЦР¹¹ с использованием большого количества копий матриц, была разработана ПЦР с двумя циклами для прикрепления метки последовательности на одном конце матрицы в каждом цикле (Фиг. 3с). В этой ПЦР с двумя циклами количество копий рандомизированных олигонуклеотидных матриц было минимальным, чтобы уменьшить вероятность присоединения каждой матрицы к более чем одной паре последовательностей меток. Чтобы выделить и очистить меченые матрицы, мы поместили JF-праймеры молекулами биотина, чтобы можно было использовать магнитные гранулы стрептавидина для отделения биотинилированных меченых матриц от остальных компонентов реакции (фиг. 3d). Из-за низкого количества копий матриц, которые мы начали с мечения ПЦР, выделенные биотинилированные, меченые матрицы были амплифицированы и размножены с помощью ПЦР с использованием смеси набора праймеров (праймеров J и F), специфических для последовательностей меток, прикрепленных к матрицам, генерирующим библиотеку аптамеров, которые имеют уникальную пару последовательностей на концах (меченая библиотека рандомизированных аптамеров). Этот продукт ПЦР затем служит в качестве матрицы для ПЦР с одной парой праймеров J и R для амплификации каждой меченой матрицы, создавая таким образом подбиблиотеку исходной библиотеки аптамеров.

В пилотном исследовании, где были использованы 2 меченных биотином праймера JF (JF1 и JF2) и 8 обратных праймеров JR (JR1-JR8), в результате было получено всего 16 уникальных пар меток последовательности. После создания меченой библиотеки с помощью ПЦР с матрицами в 1, 2,3 или 4,6 копий, представляющих 63%, 90% или 99% исходной рандомизированной библиотеки аптамеров, соответственно, для тестирования стратегии разделения использовали разные праймеры. Как изображено на левой панели фиг. 3е, меченые матрицы были амплифицированы праймерами, комплементарными константной области (универсальные праймеры) в аптамере, которые амплифицируют каждую матрицу в библиотеке. Когда использовали одну пару праймеров (F1 и R1), которые являются специфическими для добавленных последовательностей меток (средняя панель), но не пару праймеров (F3 и R1), которая не была включена в мечение (правая панель), меченые матрицы были амплифицированы в значительно меньшем количестве по сравнению с продуктом, амплифицированным с помощью универсального праймера, что указывает на то, что амплифицирована только часть (1/16) библиотеки. Таким образом, исходная библиотека была разделена на более мелкие подбиблиотеки.

Пример 4.

Чувствительность клеточного анализа для скрининга библиотеки.

Методики:

ДНК-конструкты: Плазмидные ДНК-конструкты, содержащие рибоспереключатель xrt-G17, разводили в ДНК-конструкте SR-Mut до различного соотношения этих двух ДНК-конструктов. Смешанные конструкты G17 и ДНК плазмид SR-mut затем трансфицировали в клетки НЕК 293. Трансфекцию и анализ люциферазы проводили, как описано в примере 1.

Результаты:

Чувствительность клеточного анализа для скрининга библиотеки определяет, насколько может быть большим размер или сложной плазмидная библиотека аптамеров-рибоспереключателей, чтобы минимум 1 положительное попадание выделяло из остальной части библиотеки в скрининге. Анализ может быть на активность люциферазы, интенсивность флуоресценции флуоресцентного белка или высвобождение гормона/цитокина в зависимости от выбранного репортерного гена, и генетические элементы могут быть доставлены или при помощи транзientной трансфекции, или при помощи вирусной трансдукции, например, AAV (аденоассоциированного вируса), аденовируса, лентивируса и т.д.

В данном случае мы выбрали транзientную трансфекцию для доставки плазмидной ДНК и использовали люциферазу светлячка в качестве репортерного гена, используя конструкт xrt-G17 в качестве положительного контрольного вектора с рибоспереключателем, анализ, который был тщательно протестирован и использован во время разработки рибоспереключателя xrt-G17 в клетках млекопитающих. Конструкт SR-mut использовали в качестве отрицательного контрольного вектора, который имеет те же генетические элементы, что и конструкт xrt-G17, за исключением того, что отсутствует последовательность гуанинового аптамера, поэтому он не активирует генную экспрессию в ответ на обработку гуанином. Эти два конструкта были смешаны друг с другом, чтобы имитировать случай объединенной библиотеки, хотя фактическая библиотека рибоспереключателей является более сложной из-за большого молекулярного разнообразия, генерируемого рандомизацией нуклеотидов. Клетки, трансфицированные 100% ДНК конструкта xrt-G17, давали 2000-кратную индукцию активности люциферазы при обработке 500 мкМ гуа-

нина по сравнению с необработанными клетками. Когда ДНК конструкта xrt-G17 разбавляли ДНК конструкта SR-mut, клетки, трансфицированные смешанной ДНК, проявляли меньшую кратность индукцию активности люциферазы. Как изображено на фиг. 3, кратность индукции уменьшалась, когда отношение конструкта, отвечающего на гуанин xrt-G17, к неотвечающему отрицательному конструкту SR-mut уменьшалось, но все же могло генерировать 2,3-кратную индукцию, когда присутствовал 1 положительный конструкт из 2000 молекул. с указанием вероятности восстановления 1 лиганд-отвечающего рибопереключателя из смеси лиганд-неотвечающих рибопереключателей.

Для анализов, отличных от описанного выше, чувствительность анализа должна быть проверена для обеспечения методических указаний в определении размера пулов подбиблиотек, подлежащих скринингу.

Пример 5.

Создание объединенной плазмидной библиотеки рибопереключателей на основе аптамеров и расщепление большей библиотеки рибопереключателей на меньшие скринируемые подбиблиотеки.

Методики:

Создание объединенной плазмидной библиотеки рибопереключателей: Аптамерные последовательности, содержащие ультрамерные олигонуклеотиды, с рандомизированными основаниями (см. Пример 2 для определения последовательности и состава) амплифицировали с помощью ПЦП с использованием набора Platinum Pfx (Invitrogen) для получения двухцепочечных фрагментов ДНК, и полученный продукт ПЦП разгоняли в 4% агарозном геле. ДНК размером 153 п.н. очищали в геле (Qiagen) и расщепляли ферментом BsaI (NEB). Затем расщепленный BsaI фрагмент ДНК лигировали с расщепленным BsaI акцепторным вектором (mDHFR-Luci-Акцептор), как описано в примере 1, с соотношением вектора к вставке 1:5 с использованием T4 ДНК-лигазы (Roche). Компетентные клетки ElectroMAX DH5 α -E трансформировали в соответствии с инструкциями производителя (Invitrogen) с помощью продукта лигирования и высевали на чашки с агаром. Бактериальные колонии объединяли и собирали, и ДНК экстрагировали для получения плазмидной библиотеки рибопереключателей (P1).

Аналогичный подход был использован для создания меньшей библиотеки плазмидных рибопереключателей (P2), в которой нуклеотидные основания в 5 положениях аптамера были рандомизированы с образованием в общей сложности 1024 различных последовательностей аптамера (где N обозначает рандомизированное положение):

```
GACTTCGGTCTCATCCAGAGAATGAAAAAAAAAATCTTCAGTAGAAGGTAATGTATA
NNNGCGTGATATGGCAGCNGGTTTCTACCGGCACCGTAAATGTCCGACTACATT
ACGCACCATTCTAAAGAATAACAGTGAAGAGACCAGACGG (SEQ ID NO: 10)
```

Трансформацию химически компетентных DH5 α : 227 пг плазмидной ДНК использовали для трансформации 50 мкл компетентных клеток для получения соотношения 1:10 плазмидной ДНК и бактериальных клеток. Трансформированные клетки высевали на чашки с агаром после инкубации при 37°C без встряхивания в течение 30 минут, и колонии объединяли и собирали для выделения ДНК с использованием набора для выделения ДНК в 96-луночном формате miniprep kit (Qiagen) для получения объединенных плазмидных подбиблиотек рибопереключателей.

Секвенирование нового поколения (NGS): Плазмидную ДНК из вторичных или третичных подбиблиотек рибопереключателей использовали в качестве матриц, и следующие праймеры использовали для генерации ПЦП-ампликонов, которые содержат рандомизированные аптамерные последовательности:

DHFR_F: 5'-

```
GACTTCGGTCTCATCCAGAGAATGAAAAAAAAAATCTTCAGTAGAAGGTAATG-3'
```

(SEQ ID NO: 11); IVS_R: 5'-CCGTCTGGTCTCTCACTGTTATTCTTTAGAATGGTGCG-3'

(SEQ ID NO: 12).

Продукты ПЦП подвергали NGS с использованием платформы для секвенирования спаренных концов Illumina MiSeq 2x150 п.о. для генерации приблизительно 700 тыс. прочтений для каждого образца и последующего биоинформатического анализа для идентификации уникальной последовательности и вычисления относительного содержания (Seervice предоставлен Genewiz). Последовательности, которые продемонстрировали 12 или более 12 прочтений из цикла секвенирования, считаются истинными последовательностями.

Результаты.

Для скрининга аптамеров с помощью клеточного анализа плазмидную библиотеку рибопереключателей генерировали путем клонирования библиотеки аптамеров в вектор mDHFR-Luci-акцептор (фиг. 5a). Генерируемые конструкты содержат ту же конфигурацию генетического элемента, что и в конструкте xrt-G17, с единственным отличием в последовательностях аптамеров. Мы начали с библиотеки аптамеров, созданной, как описано в примере 2, рандомизированной библиотеки аптамеров, включающей 10 уникальных последовательностей. Чтобы обеспечить более чем 99,9%-ное представление исходной библиотеки аптамеров, из чашек с агаром было собрано в общей сложности 7,5x10⁶ колоний, что в 7,5 раз

превышает количество последовательностей в библиотеке аптамеров. Плазмидная ДНК, выделенная из собранных колоний, образует плазмидную библиотеку (P1), состоящую из 10^6 уникальных рибопереключателей.

Чтобы разделить плазмидные библиотеки на подбиблиотеки, которые достаточно малы для скрининга с использованием разработанного клеточного анализа, была использована стратегия, как изображено на фиг. 5b, включающая объединение меньшего количества трансформированных бактериальных колоний и выделение ДНК, чтобы сделать плазмидные библиотеки рибопереключателей. Данный процесс деления плазмидных библиотек может быть выполнен в течение нескольких раундов, чтобы получить требуемый размер подбиблиотек, в которых может быть обнаружено одно положительное событие (т.е. специфическое связывание аптамера/лиганда, приводящее к экспрессии репортерного гена) на основе чувствительности клеточного анализа, разработанного для скрининга библиотеки, генерации первичных, вторичных или третичных подбиблиотек, соответственно. Размер подбиблиотек рассчитывали как n (подбиблиотека) = m (кратность представления) * N (начальный размер библиотеки)/ d (кратность деления). "Кратность деления" представляет собой общее количество подбиблиотек, которые можно получить, и может быть любым числом по желанию. В данном случае мы выбрали 100 в качестве кратности деления для простоты расчета. Для первого раунда деления было собрано 6×10^6 колоний, что в 6 раз превышает количество рибопереключателей в исходной плазмидной библиотеке, чтобы получить представление более 99% (10^6). Для второго раунда деления было выбрано 1-кратное представление первичной подбиблиотеки. Для плазмидной библиотеки с 10^6 рибопереключателями мы построили (P1), где $N=10^6$, $m=6$, $d=100$, размер каждой отдельной подбиблиотеки равен $n=6 \times 10^4$. В общей сложности в 100 отдельных пробирок собрали 6×10^6 бактериальных колоний и из каждой отдельной пробирки для генерации первичной плазмидной подбиблиотеки рибопереключателей (P1S_001-P1_S100) выделили ДНК. Используя ту же стратегию и начав с подбиблиотеки P1S_001, в качестве примера, первичная подбиблиотека была дополнительно разделена на 100 даже более мелких вторичных подбиблиотек с названиями от P1S_001_001 до P1S_00_1100. Таким образом, выполняя два раунда деления, генерировали вторичные плазмидные подбиблиотеки с 600 рибопереключателями в каждой. Подбиблиотеки рибопереключателей могут быть дополнительно разделены при помощи 3 раундов процессов деления для создания третичных плазмидных подбиблиотек.

Тот же подход был использован для разделения плазмидной библиотеки рибопереключателей P2, которая содержит 1024 уникальных аптамерных последовательности. Собрав 100 частей из 5000 колоний, было сгенерировано 100 первичных подбиблиотек от P2S_001 до P2S_100, каждая из которых содержала около 50 рибопереключателей.

Чтобы определить состав и качество созданных выше библиотек рибопереключателей, проводили секвенирование нового поколения (NGS) на вторичных плазмидных подбиблиотеках рибопереключателей, которые предположительно содержат 600 последовательностей рибопереключателей в каждой подбиблиотеке. Четыре вторичных подбиблиотеки были выбраны случайным образом, причем две вторичные подбиблиотеки были сгенерированы из первичной подбиблиотеки P1S_003, а две другие вторичные подбиблиотеки были сгенерированы из первичных подбиблиотек P1S_007 и P1S_048, соответственно. Как изображено на фиг. 5c, каждая из вторичных подбиблиотек содержит приблизительно 500 или 600 уникальных последовательностей, что соответствует количеству колоний, которые были собраны для создания вторичных подбиблиотек. Дополнительный анализ данных NGS демонстрирует, что между двумя вторичными подбиблиотеками (P1S_003_004 и P1S_003_041), которые были сгенерированы из одной и той же первичной подбиблиотеки (P1S_003), 39 последовательностей содержатся в обеих библиотеках (фиг. 5d). При сравнении двух вторичных подбиблиотек P1S_003_004 и P1S_007_021, которые были получены из разных первичных подбиблиотек P1S_003 и P1S_007, только 3 последовательности являются общими для обеих библиотек (фиг. 5e). Эти результаты указывают на то, что с использованием описанной выше стратегии были созданы подбиблиотеки плазмидных рибопереключателей с желаемым количеством уникальных последовательностей, которые готовы для скрининга на основе клеток млекопитающих.

Пример 6.

Скрининг на основе клеток млекопитающих на новые аптамеры против выбранных лигандов.

Как описано в примере 5, были сконструированы 100 первичных плазмидных подбиблиотек (от P1S_001 до P1S_100), включающих 60 тыс. рибопереключателей в каждом пуле, и 100 дополнительных вторичных плазмидных подбиблиотек (от P1S_001_001 до P1S_001_100), состоящих из 600 рибопереключателей в каждой, были получены путем дальнейшего деления первичной подбиблиотеки P1S_001 с использованием той же стратегии. Объединенные библиотеки могут быть упорядочены в 96-луночном формате для облегчения высокоэффективного скрининга. Предварительный скрининг проводили с использованием анализа репортера гена люциферазы, как описано в примере 1, в первичных подбиблиотеках P1S_001-006, а также в подбиблиотеках P1S_001, против гуанина, который против исходной аптамерной последовательности, в качестве тестируемого лиганда. Исходный уровень активности люциферазы, генерируемый конструктами из первичных подбиблиотек или вторичных подбиблиотек, значительно

отличался от такового у конструкта xrt-G17 (данные не показаны), что позволяет предположить, что изменения в аптамерной последовательности путем рандомизации оснований в выбранных положениях в различной степени повлияли на включение/исключение экзона, содержащего стоп-кодон, следовательно, влияя на исходный уровень экспрессии люциферазы. После обработки гуанином, хотя клетки, трансфицированные 60 тыс. первичной подбиблиотекой P1S_005, вызывали 1,8-кратную индукцию активности люциферазы по сравнению с необработанными клетками (Фиг. 6а), при использовании гуанина в качестве лиганда не была обнаружена более чем 2-кратная индукция люциферазы. Тем не менее, 7 из 100 вторичных подбиблиотек дали более чем 2-кратную индукцию активности люциферазы при обработке гуанином, при этом подбиблиотека P1S_001_075 вызывала 7,8-кратную индукцию (фиг. 6б). В анализе чувствительности, описанном в примере 4, если был 1 рибопереключателю xrt-G17 среди 500 лиганд-неотвечающих молекул, определяли 6,3-кратную индукцию. Основываясь на этом тесте чувствительности, результат (7,8-кратный) этого предварительного скрининга подбиблиотеки P1S_001_075 демонстрирует, что существует или 1 рибопереключателю из 600, который функционально эквивалентен xrt-G17, или существует несколько более слабых рибопереключателю, из которых сумма индуцированной активности люциферазы сопоставима с таковой у xrt-G17.

Чтобы дополнительно продемонстрировать применимость скрининга на основе клеток млекопитающих согласно данному изобретению для функциональных рибопереключателю, содержащих аптамеры, и обнаружить новые аптамеры с улучшенной активностью в ответ на желаемый лиганд, подбиблиотеки плазмидной библиотеки рибопереключателю P2 были подвергнуты скринингу в 96-луночном формате с НАД+. Нуклеотидные основания в рандомизированных положениях в xrt-гуаниновом аптамере были связаны с регуляцией активности рибопереключателю и названы блоком регуляции (Stoddard, et al. *J Mol Biol.* 2013 May 27;425(10): 1596-611). Следовательно, изменения нуклеотидов в этих положениях потенциально генерируют последовательности, которые изменяют активность рибопереключателю в ответ на обработку лигандом. Из-за природы гуанина и его низкой применимости *in vivo*, НАД+ был выбран в качестве лиганда для потенциальных новых аптамерю. Этот выбор лиганда был основан на вышеупомянутых результатах скрининга библиотеки соединений Prestwick против исходного рибопереключателю xrt-G17 и обнаружения того, что НАД+ может регулировать гуаниновый рибопереключателю, генерируя приблизительно 40-кратную индукцию при концентрации 100 мкМ. В попытке создать аптамерные последовательности, которые обладают улучшенной активностью рибопереключателю против НАД+, мы создали и подвергли скринингу подбиблиотеки P2 (имеющие изменения нуклеотидов в вышеупомянутых 5 положениях в аптамере), используя люциферазу в качестве репортерного гена. Как изображено на фиг. 6с, несколько подбиблиотек, приблизительно по 50 рибопереключателю в каждой, дали более чем 10-кратную индукцию экспрессии люциферазы в ответ на обработку 100 мкМ НАД+ с одной из подбиблиотек P2S_002, генерирующей 37-кратную индукцию тогда как один конструкт рибопереключателю xrt-G17 продемонстрировал 32-кратную индукцию в ответ на обработку НАД+ в той же концентрации.

Эти результаты скрининга демонстрируют, что среди приблизительно 50 рибопереключателю в подбиблиотеках, которые привели к более чем 10-кратной индукции экспрессии люциферазы, есть рибопереключателю, которые могут вызывать минимально 10-кратную индукцию, при условии, что все рибопереключателю в библиотеке отвечают на обработку НАД+. В подбиблиотеке P2S_002, которая дала 37-кратную индукцию, которая выше, чем кратная индукция, генерируемая G17, есть по меньшей мере 1 рибопереключателю, который работает намного лучше, чем G17. Чтобы доказать это, 96 отдельных конструктю, полученных из подбиблиотеки P2S_002, подвергали скринингу. Как изображено на фиг. 6д, несмотря на то что несколько конструктю потеряли или произвели меньшую индукцию, чем G17, ряд отдельных конструктю вызывал более высокую кратность индукции, чем конструкт G17, что указывает на то, что нуклеотидные изменения в блоке регуляции резко влияют на активность рибопереключателю в ответ на обработку лигандом в клетках. Используя этот подход, мы идентифицировали ряд различных последовательностей блока регуляции (как показано в табл. 2), с помощью которых рибопереключателю продуцировали люциферазу с более высокой кратностью, чем конструкт G17 при обработке НАД+, с множественными последовательностями аптамерю, вызывающими более чем 100-кратную индукцию.

Таблица 2

Рибопереключатели с улучшенной экспрессией репортерного гена в клетках млекопитающих в ответ на лиганд, НАД⁺
Последовательности блока регуляции подчеркнуты

SEQ ID NO:	Конструкт	Последовательность
13	G17	ATA <u>ATCGCGTGGATATGGCACGCAAGTTTCTACCGGGCACC</u> GTAAATGTCCGACT
14	№ 02	ATA <u>ACCGCGTGGATATGGCACGCGGGTTTCTACCGGGCAC</u> CGTAAATGTCCGACT
15	№ 16	ATA <u>GCCGCGTGGATATGGCACGCGGGTTTCTACCGGGCAC</u> CGTAAATGTCCGACT
16	№ 17	ATA <u>AGGGCGTGGATATGGCACGCTCGTTTCTACCGGGCACC</u> GTAAATGTCCGACT
17	№ 21	ATA <u>AAATGCGTGGATATGGCACGCATGTTTCTACCGGGCACC</u> GTAAATGTCCGACT
18	№ 26	ATA <u>AGCGCGTGGATATGGCACGCGCGTTTCTACCGGGCAC</u> CGTAAATGTCCGACT
19	№ 29	ATA <u>GTGGCGTGGATATGGCACGCCAGTTTCTACCGGGCACC</u> GTAAATGTCCGACT
20	№ 31	ATA <u>AAAGCGTGGATATGGCACGCCGGTTTCTACCGGGCAC</u> CGTAAATGTCCGACT
21	№ 33	ATA <u>GTTGCGTGGATATGGCACGCAAGTTTCTACCGGGCACC</u> GTAAATGTCCGACT
22	№ 36	ATA <u>GCGGCGTGGATATGGCACGCTGGTTTCTACCGGGCACC</u> GTAAATGTCCGACT
23	№ 41	ATA <u>ATGGCGTGGATATGGCACGCTAGTTTCTACCGGGCACC</u> GTAAATGTCCGACT
24	№ 46	ATA <u>ATTGCGTGGATATGGCACGCAAGTTTCTACCGGGCACC</u> GTAAATGTCCGACT
25	№ 54	ATA <u>ATTGCGTGGATATGGCACGCGAGTTTCTACCGGGCACC</u> GTAAATGTCCGACT
26	№ 61	ATA <u>ATCGCGTGGATATGGCACGCGAGTTTCTACCGGGCACC</u> GTAAATGTCCGACT
27	№ 69	ATA <u>ACTGCGTGGATATGGCACGCGGGTTTCTACCGGGCACC</u> GTAAATGTCCGACT

Один из новых конструктов, № 46, был дополнительно протестирован. Как изображено на фиг. 6e и фиг. 6f, новый конструкт № 46 отвечал на обработку НАД⁺ дозозависимым образом и продемонстрировал превосходное улучшение уровня индуцированной экспрессии репортерного гена, а также кратности индукции по сравнению с конструктом G17. Новые конструкты также имеют улучшенную генную регуляцию в ответ на обработку гуанином (данные не показаны).

Таким образом, данное изобретение обеспечивает подход, при котором относительно большая библиотека рибопереключателей может быть разделена на меньшую подбиблиотеку рибопереключателей, которая может быть подвергнута скринингу посредством анализа на основе клеток млекопитающих. Кроме того, из библиотеки рибопереключателей были обнаружены новые последовательности, которые улучшили активность рибопереключателей в клетках млекопитающих.

Список литературы

1. Mandal, Maumita, Benjamin Boese, Jeffrey E. Barrick, Wade C. Winkler, and Ronald R. Breaker. "Riboswitches Control Fundamental Biochemical Pathways in *Bacillus Subtilis* and Other Bacteria." *Cell* 113, no. 5 (May 30, 2003): 577–86.
2. Mandal, Maumita, and Ronald R. Breaker. "Adenine Riboswitches and Gene Activation by Disruption of a Transcription Terminator." *Nature Structural & Molecular Biology* 11, no. 1 (January 2004): 29–35. doi:10.1038/nsmb710.
3. Mulhbachner, Jerome, and Daniel A. Lafontaine. "Ligand Recognition Determinants of Guanine Riboswitches." *Nucleic Acids Research* 35, no. 16 (2007): 5568–80. doi:10.1093/nar/gkm572.
4. Serganov, Alexander, Yu-Ren Yuan, Olga Pikovskaya, Anna Polonskaia, Lucy Malinina, Anh Tuan Phan, Claudia Hobartner, Ronald Micura, Ronald R. Breaker, and Dinshaw J. Patel. "Structural Basis for Discriminative Regulation of Gene Expression by Adenine- and Guanine-Sensing mRNAs." *Chemistry & Biology* 11, no. 12 (December 2004): 1729–41. doi:10.1016/j.chembiol.2004.11.018.
5. Edwards, Andrea L., and Robert T. Batey. "A Structural Basis for the Recognition of 2'-deoxyguanosine by the Purine Riboswitch." *Journal of Molecular Biology* 385, no. 3 (January 23, 2009): 938–48. doi:10.1016/j.jmb.2008.10.074.
6. Batey, Robert T., Sunny D. Gilbert, and Rebecca K. Montange. "Structure of a Natural Guanine-Responsive Riboswitch Complexed with the Metabolite Hypoxanthine." *Nature* 432, no. 7015 (November 18, 2004): 411–15. doi:10.1038/nature03037.
7. Serganov, Alexander, Yu-Ren Yuan, Olga Pikovskaya, Anna Polonskaia, Lucy Malinina, Anh Tuan Phan, Claudia Hobartner, Ronald Micura, Ronald R. Breaker, and Dinshaw J. Patel. "Structural Basis for Discriminative Regulation of Gene Expression by Adenine- and Guanine-Sensing mRNAs." *Chemistry & Biology* 11, no. 12 (December 2004): 1729–41. doi:10.1016/j.chembiol.2004.11.018.
8. Ellington, A. D., and J. W. Szostak. "In Vitro Selection of RNA Molecules That Bind Specific Ligands." *Nature* 346, no. 6287 (August 30, 1990): 818–22. doi:10.1038/346818a0.
9. Tuerk, C., and L. Gold. "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase." *Science (New York, N.Y.)* 249, no. 4968 (August 3, 1990): 505–10.
10. Ozer, Abdullah, John M. Pagano, and John T. Lis. "New Technologies Provide Quantum Changes in the Scale, Speed, and Success of SELEX Methods and Aptamer Characterization." *Molecular Therapy. Nucleic Acids* 3 (2014): e183. doi:10.1038/mtna.2014.34.
11. Kebschull, Justus M., and Anthony M. Zador. "Sources of PCR-Induced Distortions in High-Throughput Sequencing Data Sets." *Nucleic Acids Research* 43, no. 21 (December 2, 2015): e143. doi:10.1093/nar/gkv717.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ селекции аптамера, который связывает лиганд в эукариотических клетках, включающий стадии:

- (a) обеспечения библиотеки аптамеров,
- (b) введения членов библиотеки аптамеров в полинуклеотидную кассету для лиганд-опосредованной экспрессии репортерного гена для создания библиотеки рибопереключателей,
- (c) введения библиотеки рибопереключателей в эукариотические клетки, и
- (d) приведения в контакт эукариотических клеток с лигандом, и

(е) измерения экспрессии репортерного гена, причем полинуклеотидная кассета содержит альтернативно сплайсированный экзон, фланкированный 5' интроном и 3' интроном, и рибопереключателем, содержащий (i) эффекторную область, содержащую ножку (stem), которая содержит последовательность 5'-сайта сплайсинга 3' интрона и последовательность комплементарную последовательности 5'-сайта сплайсинга 3' интрона, и (ii) аптамер, расположенный между последовательностью 5'-сайта сплайсинга 3' интрона и комплементарной последовательностью, при этом альтернативно сплайсированный экзон содержит стоп-кодон, который находится в рамке считывания с репортерным геном, когда альтернативно сплайсированный экзон встраивается в мРНК репортерного гена.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что библиотека аптамеров содержит аптамеры, имеющие один или более рандомизированных нуклеотидов.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что лиганд представляет собой малую молекулу.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что лиганд представляет собой молекулу, продуцируемую эукариотической клеткой, выбранную из группы, состоящей из метаболита, нуклеиновой кислоты, витамина, кофактора, липида, моносахарида и вторичного мессенджера.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что эукариотическую клетку выбирают из клетки млекопитающего, клетки насекомого, клетки растения и дрожжевой клетки.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что репортерный ген выбирают из группы, состоящей из флуоресцентного белка, люциферазы, β -галактозидазы и пероксидазы хрена.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что экспрессия репортерного гена более чем в около 10 раз выше, когда лиганд специфически связывает аптамер, чем уровни экспрессии репортерного гена, когда лиганд отсутствует.

8. Способ по п.1, отличающийся тем, что 5' и 3' интроны получают из интрона 2 гена β -глобина человека.

9. Способ по п.1, отличающийся тем, что 5' и 3' интроны каждый независимо имеют длину от около 50 до около 300 нуклеотидов.

10. Способ по п.1, отличающийся тем, что 5' и 3' интроны каждый независимо имеют длину от около 125 до около 240 нуклеотидов.

11. Способ по п.1, отличающийся тем, что ножка эффекторной области имеет длину от около 7 до около 20 пар оснований.

12. Способ по п.1, отличающийся тем, что ножка эффекторной области имеет длину от около 8 до около 11 пар оснований.

13. Способ по п.1, отличающийся тем, что альтернативно сплайсированный экзон получают из группы, состоящей из экзона 2 гена дигидрофолатредуктазы (DHFR) человека, экзона 5 мутанта человеческой опухоли Вильмса 1, экзона 16 мышинной кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II дельта и экзона 6 SIRT1.

14. Способ по п.1, отличающийся тем, что альтернативно сплайсированный экзон представляет собой модифицированный экзон 2 из DHFR человека.

15. Способ по п.1, отличающийся тем, что альтернативно сплайсированный экзон является синтетическим.

16. Способ по п.1, отличающийся тем, что альтернативно сплайсированный экзон содержит одну или несколько групп, состоящих из измененного экзонного энхансера сплайсинга, измененного экзонного сайленсера сплайсинга, добавленного экзонного энхансера сплайсинга и добавленного экзонного сайленсера сплайсинга.

17. Способ по п.1, отличающийся тем, что библиотеку аптамеров разделяют на меньшую библиотеку аптамеров перед введением в полинуклеотидные кассеты, который включает стадии:

а) обеспечения рандомизированной библиотеки аптамеров, в которой аптамеры в библиотеке содержат множество 5' и 3' константных областей и один или более рандомизированных нуклеотидов,

б) выполнения ПЦР с двумя циклами с использованием рандомизированной библиотеки аптамеров в качестве матрицы и первого праймера, и второго праймера, которые комплементарны 5' и 3' константным областям, каждый из праймеров включает одну из множества маркерных последовательностей,

с) выделения продуктов ПЦР с двумя циклами, и

д) ПЦР-амплификации подмножества выделенных продуктов ПЦР с двумя циклами с использованием праймеров, комплементарных подмножеству-5' и 3' маркерных последовательностей.

18. Способ по п.17, отличающийся тем, что первый или второй праймер в ПЦР с двумя циклами содержит метку, выбранную из группы, состоящей из биотина, дигоксигенина (DIG), бромодезоксиуридина (БДУ), флуорофора и химической группы, используемой в клик-химии.

19. Способ по п.1, отличающийся тем, что библиотеку рибопереключателей перед введением в эукариотические клетки разделяют на одну или более подбиблиотек рибопереключателей.

20. Способ по п.19, отличающийся тем, что библиотеку рибопереключателей подразделяют на подбиблиотеки, включающий стадии:

- (a) введения библиотеки рибопереключателей в бактерии;
- (b) сбора бактериальных клонов и выделения плазмидной ДНК для получения плазмидных подбиблиотек рибопереключателей для генерации одной или более первичных подбиблиотек;
- (c) необязательно, генерации вторичных подбиблиотек рибопереключателей из первичной плазмидной подбиблиотек рибопереключателей путем введения первичной подбиблиотек в бактерии, сбора бактериальных клонов и выделения плазмидной ДНК.

21. Способ селекции лиганда, который связывает аптамер в эукариотической клетке, включающий стадии:

- (a) обеспечения библиотеки лигандов,
- (b) обеспечения полинуклеотидной кассеты для лиганд-опосредованной экспрессии репортерного гена,
- (c) введения полинуклеотидной кассеты в эукариотическую клетку,
- (d) приведения в контакт индивидуальных групп эукариотической клетки с членами библиотеки лигандов, и
- (e) измерения экспрессии репортерного гена,

причем полинуклеотидная кассета содержит альтернативно сплайсированный экзон, фланкированный 5' интроном и 3' интроном, и рибопереключателем, содержащий (i) эффекторную область, содержащую ножку, которая содержит последовательность 5'-сайта сплайсинга 3' интрона и последовательность комплементарной последовательности 5'-сайта сплайсинга 3' интрона, и (ii) аптамер, расположенный между последовательностью 5'-сайта сплайсинга 3' интрона и комплементарной последовательностью, при этом альтернативно-сплайсированный экзон содержит стоп-кодон, который находится в рамке считывания с репортерным геном, когда альтернативно сплайсированный экзон встраивается в мРНК репортерного гена.

22. Способ по п.21, отличающийся тем, что лиганд представляет собой малую молекулу.

23. Способ по п.21, отличающийся тем, что лиганд представляет собой молекулу, продуцируемую эукариотической клеткой.

24. Способ по п.23, отличающийся тем, что лиганд представляет собой метаболит, нуклеиновую кислоту, витамин, кофактор, липид, моносахарид и вторичный мессенджер.

25. Способ по п.21, отличающийся тем, что эукариотическую клетку выбирают из группы, состоящей из клетки млекопитающего, клетки насекомого, клетки растения и дрожжевой клетки.

26. Способ по п.21, отличающийся тем, что репортерный ген выбирают из группы, состоящей из флуоресцентного белка, люциферазы, β -галактозидазы и пероксидазы хрена.

27. Способ по п.21, отличающийся тем, что репортерный ген выбирают из группы, состоящей из цитокина, сигнальной молекулы, гормона роста, антитела, регуляторной РНК, терапевтического белка или пептида.

28. Способ по п.21, отличающийся тем, что экспрессия репортерного гена более чем в 10 раз выше, когда лиганд специфически связывает аптамер, чем уровни экспрессии репортерного гена, когда лиганд отсутствует.

29. Способ по п.21, отличающийся тем, что 5' и 3' интроны получают из интрона 2 гена β -глобина человека.

30. Способ по п.21, отличающийся тем, что 5' и 3' интроны каждый независимо имеют длину от около 50 до около 300 нуклеотидов.

31. Способ по п.21, отличающийся тем, что 5' и 3' интроны каждый независимо имеют длину от около 125 до около 240 нуклеотидов.

32. Способ по п.21, отличающийся тем, что ножка эффекторной области имеет длину от около 7 до около 20 пар оснований.

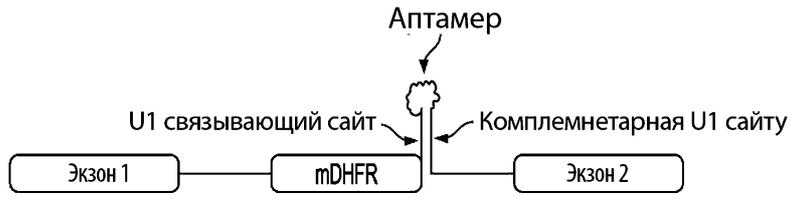
33. Способ по п.21, отличающийся тем, что ножка эффекторной области имеет длину от 8 до 11 пар оснований.

34. Способ по п.21, отличающийся тем, что альтернативно сплайсированный экзон получают из группы, состоящей из экзона 2 гена дигидрофолатредуктазы человека, экзона 5 мутанта человеческой опухоли Вильмса 1, экзона 16 мышины кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II дельта и экзона 6 SIRT1.

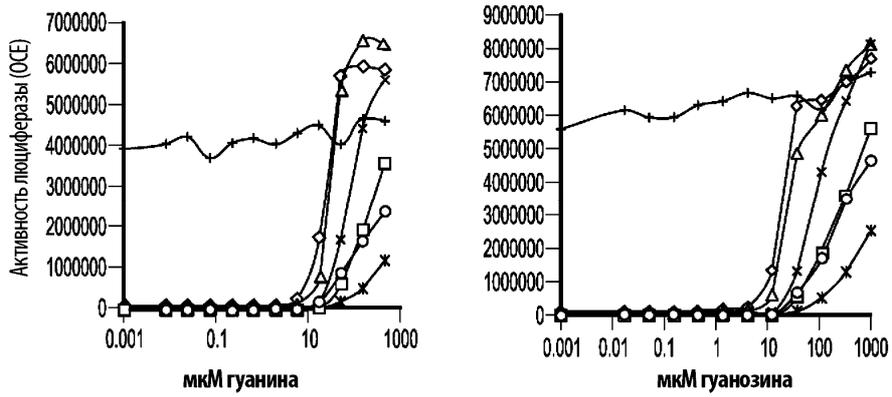
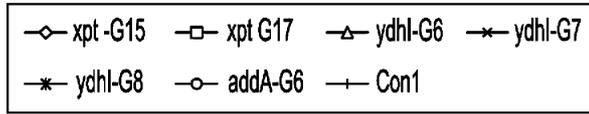
35. Способ по п.21, отличающийся тем, что альтернативно сплайсированный экзон представляет собой модифицированный экзон 2 из DHFR человека.

36. Способ по п.21, отличающийся тем, что альтернативно сплайсированный экзон является синтетическим.

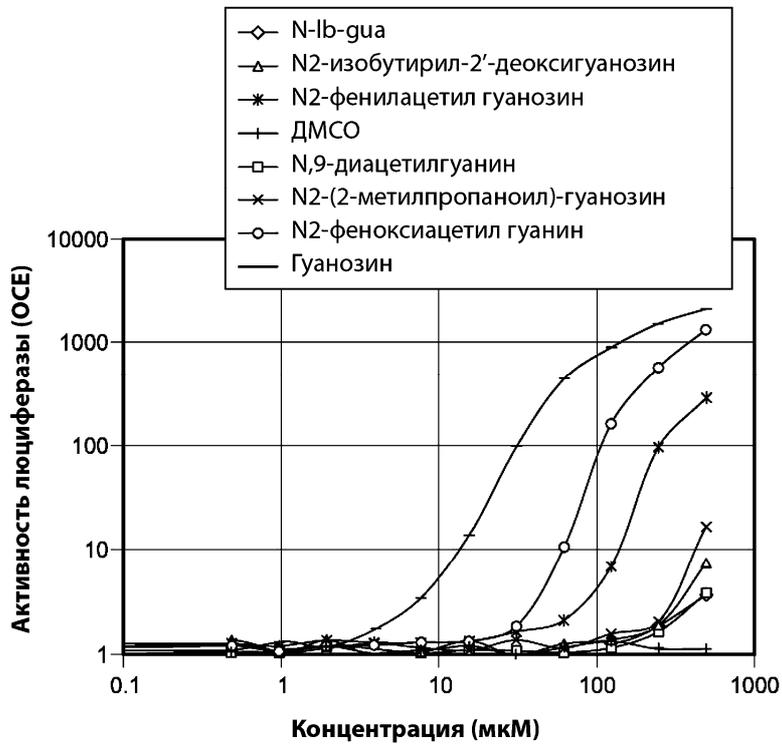
37. Способ по п.21, отличающийся тем, что альтернативно сплайсированный экзон содержит одну или несколько групп, состоящих из измененного экзонного энхансера сплайсинга, измененного экзонного сайленсера сплайсинга, добавленного экзонного энхансера сплайсинга и добавленного экзонного сайленсера сплайсинга.



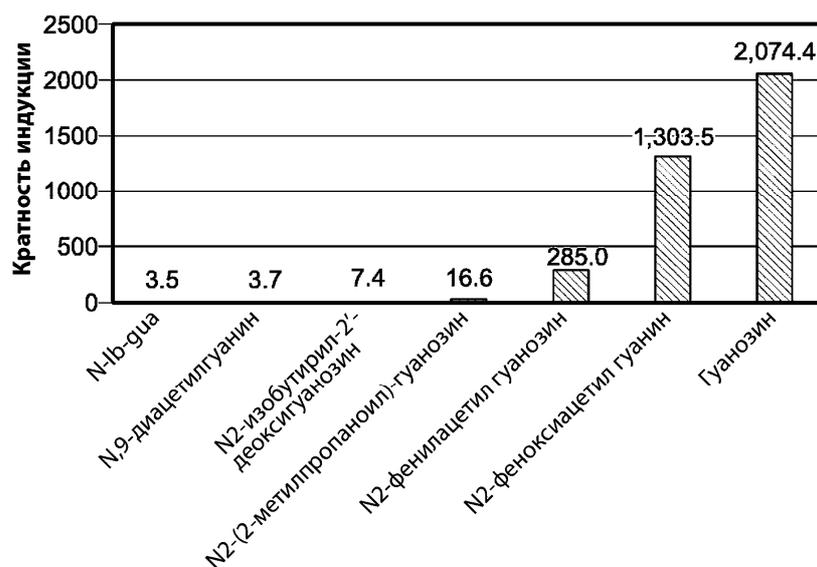
Фиг. 1а



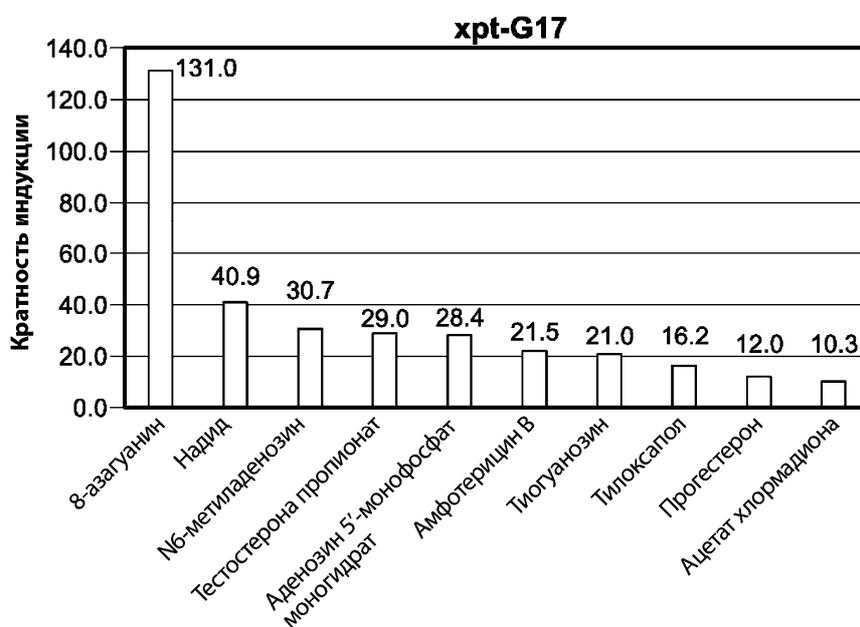
Фиг. 1б



Фиг. 1с



Фиг. 1d



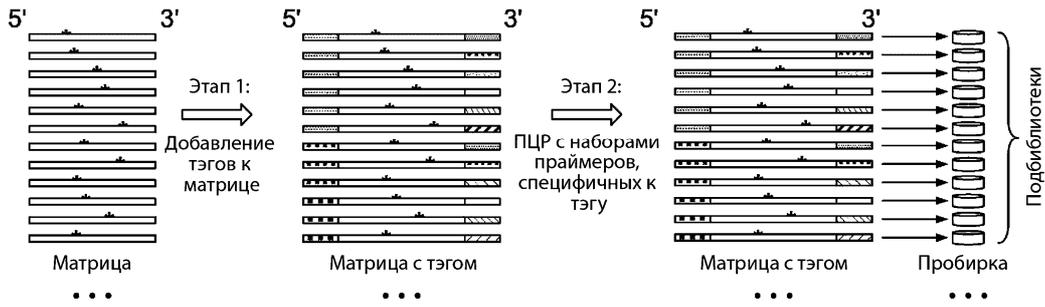
Фиг. 1e



* Обозначает рандомизированную область

Матрица для генерации рандомизированной аптамерной последовательности

Фиг. 2

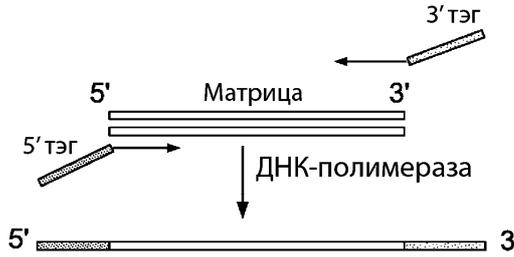


* обозначает рандомизированную область

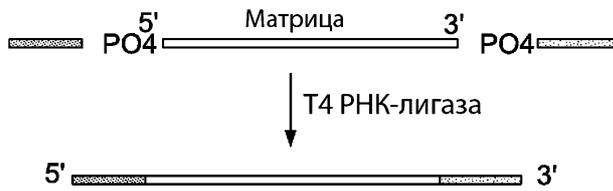
Стратегия разделения библиотеки рандомизированных аптамеров путем сиквенирования
Тэгирование и ПЦР-амплификация

Фиг. 3а

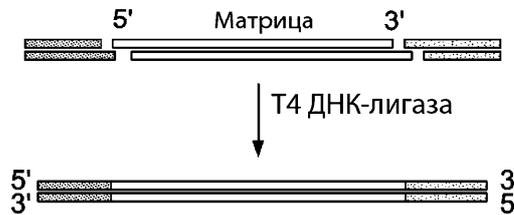
I.



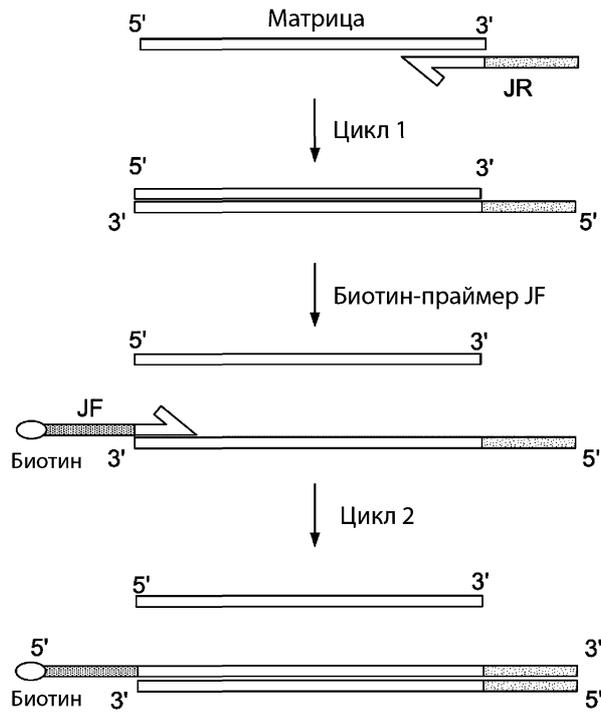
II.



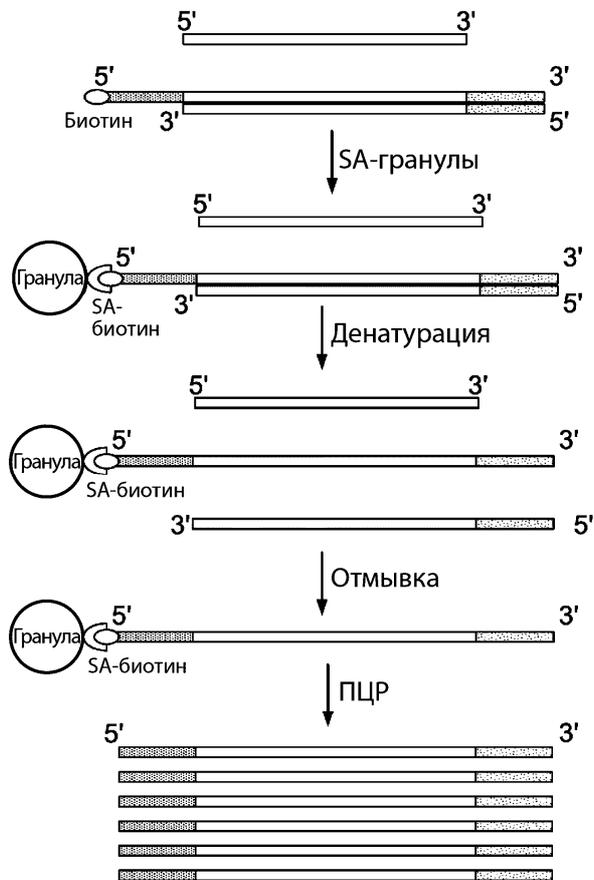
III.



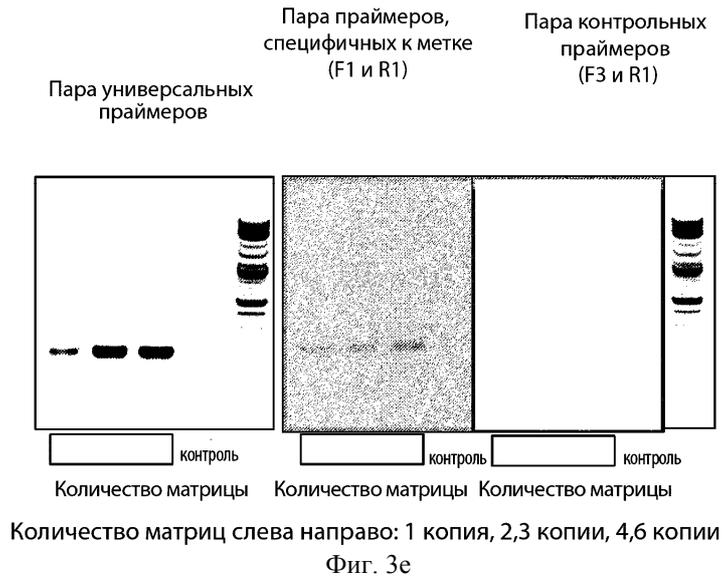
Фиг. 3б

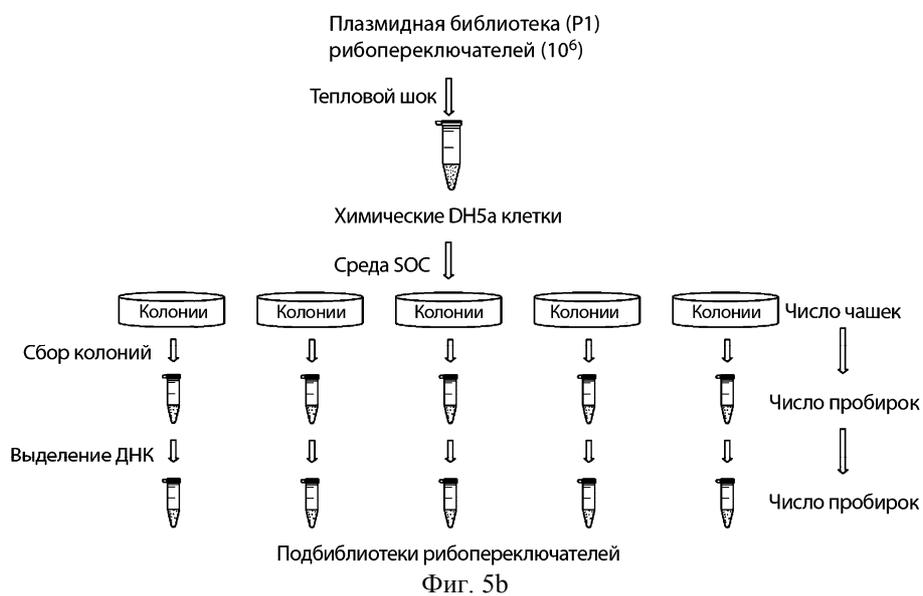
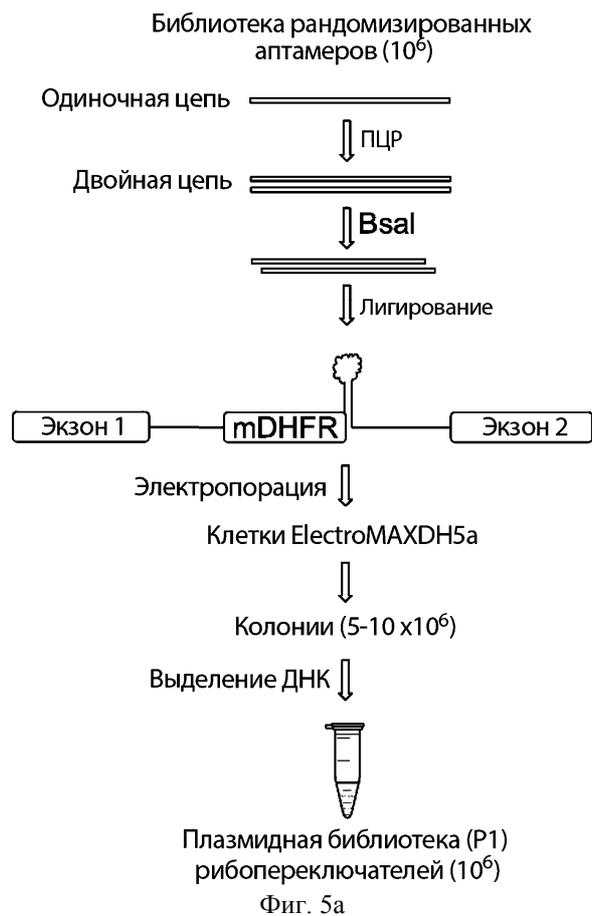


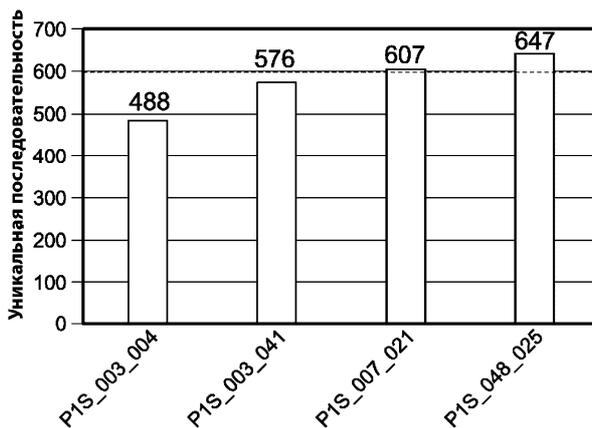
Два цикла ПЦР для добавления меток последовательности
Фиг. 3с



Матрица с тэгом
Генерация библиотеки аптамеров с тэгами
Фиг. 3d

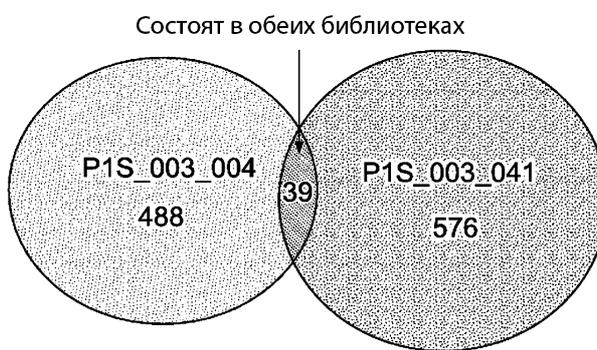




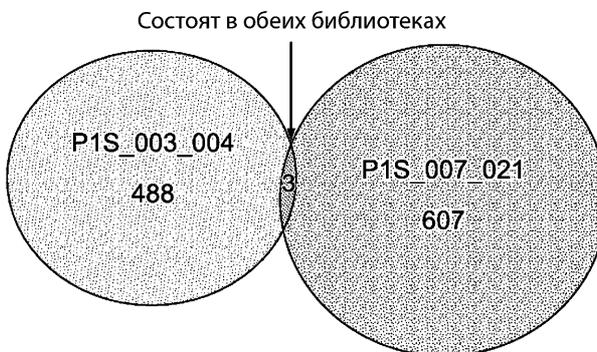


Вторичные подбиблиотеки (600)

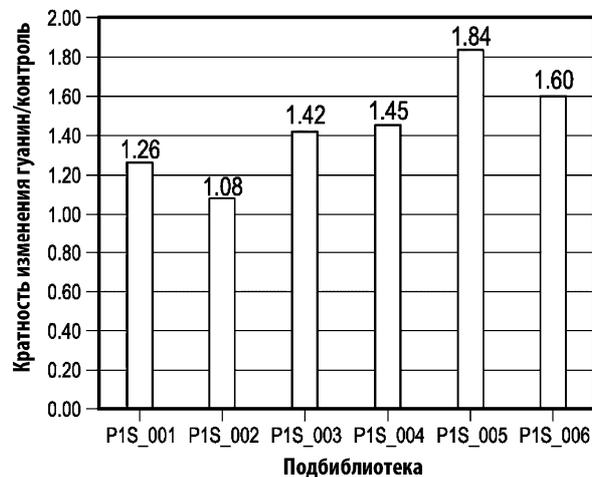
Фиг. 5с



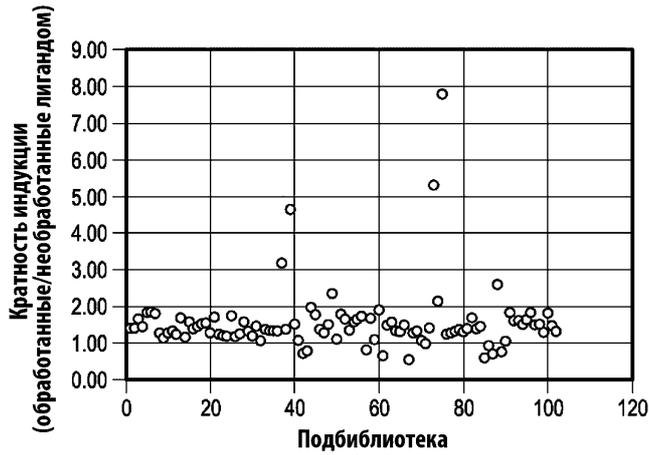
Фиг. 5d



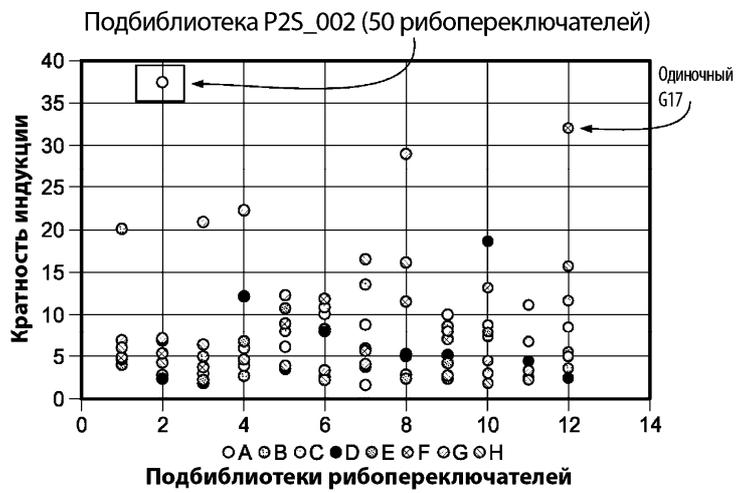
Фиг. 5е



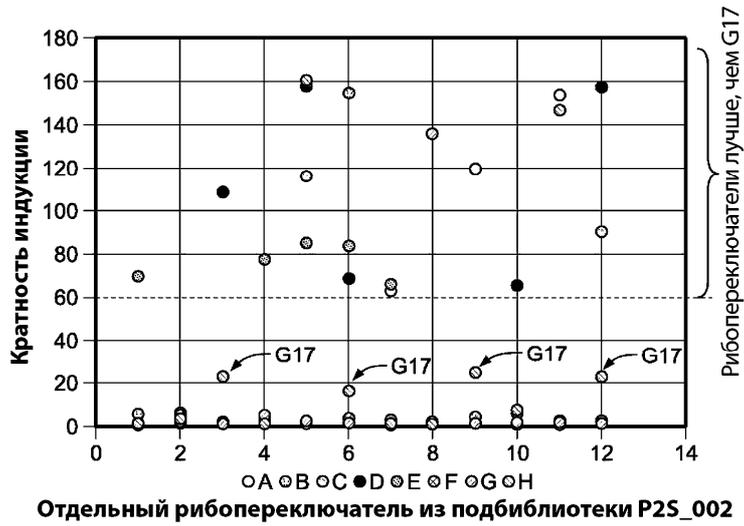
Фиг. 6а



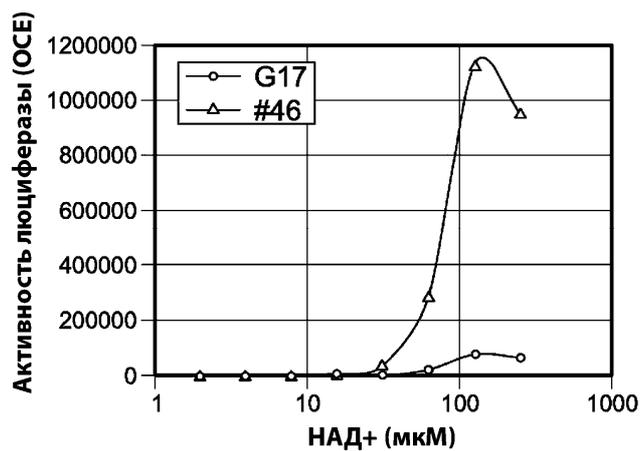
Фиг. 6b



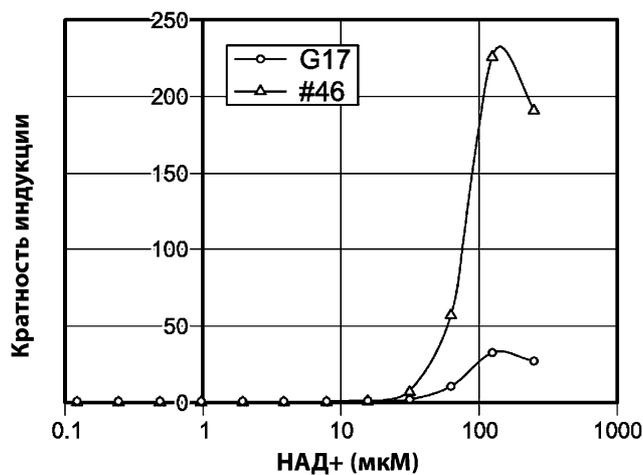
Фиг. 6с



Фиг. 6d



Фиг. 6e



Фиг. 6f

